

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en biologie
Option : biochimie appliquée

Thème

*Les métabolites primaires et secondaires à activité
biologique d'Urtica dioïca (la grande ortie)*

Et

*Contrôle de qualité de quelques produits
alimentaires commercialisés.*

Travail réalisé par :

- MAOUEL Sabrina
- MAHFOUF Fatima

Devant le jury composé de :

M. SEBBANE Hillal	Maitre assistant classe A	Président
M ^{me} SALMI Djouza	Maitre assistante classe B	Promotrice
M ^{me} SENANI-OULARBI Nassima	Maitre assistante classe A	Examinatrice
M ^{me} SENOUSI-GHEZALI Chahra	Maitre assistante classe A	Examinatrice

Année universitaire : 2015/2016



Remerciements

Avant tout, je remercie dieu tout puissant de nous avoir donné la volonté, le courage et la patience pour terminer ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de biochimie, Hassnaoua II de l'université M. Mammeri de Tizi-Ouzou. Sous la direction du professeur MATI Abderrahmane directeur du laboratoire et responsable du master de Biochimie Appliquée. Nous tenons à lui adresser nos remerciements les plus sincères d'avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de la partie pratique de ce travail.

Nous adressons nos vifs remerciements à notre promotrice M^{me} SALMI Djouza pour avoir accepté de nous encadré et de nous avoir aidé et suivi le long de notre travail.

Enfin nous tenons à remercier les membres du jury qui nous feront l'honneur de juger notre travail.





« Dédicaces »

Je tiens en premier lieu à dédier ce travail à mes chères parents qui m'ont toujours soutenue et encouragée durant toute mes « études », en espérant que ce travail sera digne de leurs espoirs et de leur confiance.

A mes frères et mes sœurs pour leur encouragement

A mon grand-père que j'aime beaucoup

A toute ma famille qui m'a soutenue

A tous mes amis, Lyes, Ahmed, Sonia, Tilleli, Lydia, Millila et Ouarda

Et enfin à toute la promo biochimie 2015-2016

Sabrina. M

« Dédicaces »

J'offre ce modeste travail :

A mes chères parents, que je respect et qui m'honorent, ma mère et mon père

A ma sœur Silya et mon frère Ahmed qui m'ont soutenue

A mes grands-mères que j'aime

A mes cousins et cousines et toute ma grande famille

A tous mes amis Amar, Lynda, Melissa et Rima et Marzouka

A tous ceux qui m'ont encouragé tout au long de mes Etudes

Fatima. M



Avant-propos

Ce travail est composé de deux parties, une synthèse bibliographique portée sur les métabolites primaires et secondaires à activités biologique d'*Urtica dioica* et une partie expérimentale dans le but d'effectuer une évaluation physicochimique et un contrôle de qualité de quelques produits alimentaires commercialisés.

Urtica dioica appartient à la famille des urticaceae, elle est une plante rurale très envahissante, elle représente un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites primaires qui sont indispensables à son existence et qui englobent les protéines, les lipides et les glucides et aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques, utilisée principalement pour son effet anti-inflammatoire, antioxydant, antivirale et antimicrobien.

L'évaluation des paramètres physicochimiques des produits alimentaires constitue une étape importante pour le contrôle de la qualité de ces derniers. Dans notre partie expérimentale, nous avons effectué une évaluation physicochimique afin de s'assurer de la qualité de quelques produits alimentaires commercialisés et cela par le dosage de différents paramètres physicochimiques, à savoir, la vitamine C, l'indice d'iode, l'indice d'acidité, dosage des sucres réducteurs et des protéines ; et par des méthodes chromatographiques et électrophorétique.

Résumé

Dans le cadre des études portant sur l'identification des métabolites primaires et secondaires à activité biologique des différentes plantes, le présent travail porte sur l'étude de l'*Urtica dioica* de la famille des urticaceae qui fait partie des plantes spontanées largement réparties dans le monde.

L'*Urtica dioica* est une plante annuelle, rurale très envahissante, herbacée mais vivace, elle a été largement utilisée dans divers domaines depuis la préhistoire à savoir dans l'alimentation humaine et l'industrie de textile, elle a aussi été largement exploitée dans le domaine médical et pharmaceutique.

L'*Urtica dioica* représente une source importante de métabolites primaires. En effet, les teneurs en métabolites primaires indiquent un taux important en protéines qui sont composées d'acides aminés essentiels ainsi que en lipides qui ont une forte proportion d'acide gras insaturés, plus spécialement l'acide palmitique, et une faible quantité d'acide linoléique (oméga 3) et en polysaccharides formant des mucilages. Aussi, elle est qualifiée d'être une plante de très grande valeur nutritive vu sa richesse en minéraux et en vitamine.

L'*Urtica dioica* représente un réservoir immense de métabolites secondaires repartis dans les différentes parties de la plante principalement dans les feuilles et la racine. Ces métabolites sont de structure chimique très variable à l'origine de ces propriétés médicinales. Ces derniers sont constitués de polyphénols, subdivisés principalement en trois classes de composés, les composésphénoliques et les flavonoïdes dont l'activité antioxydante et antiinflammatoire ont été mises en évidence, bien que les molécules impliquées dans chaque activité soient différentes, principalement la quercétine pour les flavonoïdes, les composés terpéniques et les alcaloïdes.

Vu sa richesse en métabolites primaires et secondaires ainsi que sa composition chimique très variée, l'ortie dioïque a de nombreuses activités biologiques. Elle est principalement utilisée pour son effetanti-inflammatoire, antioxydant, antivirale et antimicrobien.

Mots clés : *Urtica dioica*, métabolites primaires, métabolites secondaires, composition chimique, activité biologique.

Abstract

As part of studies regarding the identification of primary and secondary metabolites having biological activity of different plants, this work focuses on the study of stinging nettle, a plant in the Urticaceae family which is a spontaneous plant widely distributed in the world.

Stinging nettle is an annual plant, highly invasive rural, herbaceous perennial, but it has been widely used in various areas since prehistory namely in food and textile industry and it has been widely exploited in the medical and pharmaceutical field.

Stinging nettle represents an important source of primary and secondary metabolites. Indeed, the primary metabolites contents indicate significant rate in proteins which consist of essential amino acids and lipids which have a high proportion of unsaturated fatty acid, in particular palmitic, and a small amount of linoleic fatty acid (omega 3) and polysaccharides forming mucilage. Also, it is qualified to be a very high nutritional value plant as it is rich with minerals and vitamins.

Stinging nettle is a huge reservoir of secondary metabolites found in different parts of the plant mainly in the leaves and root. These metabolites are of very variable chemical structure responsible for these medicinal properties. Polyphenols mainly subdivided into three classes of compounds, phenolic compounds and flavonoids with antioxidant and anti-inflammatory activity have been identified, although the molecules involved in each activity are different, mainly quercetin for flavonoids, terpene compounds and alkaloids.

See its wealth in primary and secondary metabolites and its variable chemical composition, Stinging nettle has many biological activities. It's mainly used for its anti-inflammatory, antioxidant, antiviral and antimicrobial effects.

Key words : Stinging nettle, primary metabolites, secondary metabolites, biological activities, chemical composition.

TABLE DES MATIERES

1. Synthèse bibliographique

Introduction	01
1.1. Botanique de l'<i>Urtica dioica</i>	02
1.1.1. Historique	02
1.1.2. Origine et répartition dans le monde	02
1.1.3. Dénomination de la plante	03
1.1.4. Taxonomie	03
1.1.5. Description de l' <i>Urtica dioica</i>	04
1.2. Composés primaires et secondaires des végétaux	05
1.2.1. Métabolites primaires	06
1.2.1.1. Les protéines	06
1.2.1.2. Les lipides	06
1.2.2.3 Les glucides	06
1.2.2. Métabolites secondaires	07
1.2.2.1. Composés phénoliques	07
1.2.2.2. Terpènes	12
1.2.2.3. Composés azotiques (alcaloïdes)	13
1.3. Composition chimique de l'ortie dioïque	14
1.3.1. Composition de la feuille	14
1.3.2. Composition chimique des racines	16
1.3.3. Composition des poils urticants	18
1.3.4. Composition des fleurs	18
1.3.5. Composition de fruit et de la graine	18
1.4. Activité biologique de l'<i>Urtica dioica</i>	19
1.4.1. Activités des parties aériennes	19
1.4.1.1. Activité anti-inflammatoire	19
1.4.1.1.1. Action sur le métabolisme de l'acide arachidonique	19
1.4.1.1.2 .Action sur les cytokines pro-inflammatoires	20
• Action sur le facteur de nécrose tumorale et l'interleukine 1 β	20
• Action sur l'interleukine2 et l'interféron γ	20
1.4.1.1.3. Activité antioxydantes	21
1.4.1.1.4. Action sur l'agrégation plaquettaire	21
1.4.2. Activité des racines	21
• Interaction avec la protéine de transport des hormones sexuelles (SHBG)	22
• Inhibition de l'aromatase	22
• Inhibition de l'élastase	22
• Effet sur la prolifération cellulaire	23
1.4.3. Autres activités d'<i>Urtica dioica</i>	23
1.4.3.1. Action antifongique	23
1.4.3.2. Action antivirale et antimicrobienne	23
1.4.3.3. Action sur la glycémie	24
Conclusion	

2. Partie expérimentale

Introduction

2.1. Matériels et méthodes	26
2.1.1. Matériels	
2.1.1.1. Matière première	26
2.1.1.2. Appareillage	26
2.1.1.3. Autres matériels	27
2.1.1.4. Produit chimiques et réactifs	27
2.1.1.5. Verrerie	27
2.1.2. Méthodes	27
2.1.2.1. Méthodes physicochimique	27
2.1.2.1.1. Mesure de pH.....	27
2.1.2.1.2. Dosage de la vitamine C.....	27
2.1.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse	28
2.1.2.1.3.1. Indice d'acidité d'une matière grasse	28
2.1.2.1.3.2. Indice d'iode d'une matière grasse	28
2.1.2.1.4. Dosage des glucides	29
2.1.2.1.5. Dosage des protéines par la méthode de BRADFORD.....	30
2.1.2.2. Méthodes de purification et d'identification	31
2.1.2.2.1. La dialyse des protéines sériques et des caséines du lait de vache	31
2.1.2.2.2. La lyophilisation.....	31
2.1.2.2.3. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200.....	32
2.1.2.2.4. Hydrolyse enzymatique des protéines lyophilisées du lait de vache : les caséines et les protéines sériques par la trypsine.....	34
2.1.2.3. Méthodes électrophorétiques : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	35
2.1.2.3.1. Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native).....	36
2.1.2.3.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS).....	37
2.1.2.4. Révélation des bandes de migration électrophorétiques	38
2. 2. Résultats et discussion	39
2.2.1 Qualité physicochimique	39
2.2.1.1. Mesure de pH.....	39
2.2.1.2. Teneur en vitamine C dans un jus de fruit.....	39
2.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acide d'une matière grasse	40
2.2.1.3.1. Indice d'acidité	40
2.2.1.3.2. L'indice d'iode	41
2.2.1.4. Teneur en glucides dans un jus de fruit méthode utilisant le DNS	41
2.2.1.5. Teneur en protéines	42
2.2.2. Méthodes chromatographiques	43
2.2.2.1. Purification des protéines par chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200.....	43
2.2.3.1. Isolement et caractérisation électrophorétiques des protéines sériques du lait de vache en PAGE-native.....	44
2.2.3.2. Isolement et caractérisation électrophorétiques des caséines et protéines sériques lyophilisées du lait de vache en PAGE-SDS	45

Conclusion

Liste des figures

N° des figures	pages
Figure 01 : <i>Urtica dioica</i>	04
Figure 02 : Les différentes parties d' <i>Urtica dioica</i> ; les fleurs mâle et femelle (A), le rhizome (B) et le fruit d'ortie (C).....	05
Figure 03 : structure chimique de l'acide caféique (A) et de l'acide gallique (B).....	08
Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes	08
Figure 05 : Structure de l'apégénine (A) et de la lutéoline (B)	09
Figure 06 : Structure de la quercétine (A) et de kaempférol (B).....	09
Figure 07 : Structure de la catéchine.....	10
Figure 08 : Structure de base des chalcones.....	10
Figure 09 : Structure de cyanidine (2-(3,4-dihydroxyphényl) chroménylium-3, 5,7 triol).....	11
Figure 10 : Structure de coumarine (1-benzopyrane-2-one).....	11
Figure 11 : Exemple de structure de base des tanins condensés.....	12
Figure 12 : Structure de lignane.....	12
Figure 13 : Isoprène (C_5H_8) (2-méthyl-1,3-butadiène).....	13
Figure 14 : Structures chimiques de Colchicine.....	14
Figure 15 : Structure chimique d' <i>Urtica Dioica</i> Agglutinin (UDA).....	17
Figure 16 : Métabolisme de l'acide arachidonique.....	19
Figure 17 : Réaction de l'oxydation de la vitamine C.....	28
Figure 18 : Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs.....	29
Figure 19 : Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme standard.....	29
Figure 20 : Structure du bleu de coomassie.....	30
Figure 21 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de BRADFORD <i>et al</i> (1976), réalisée avec la BSA comme protéines de référence.....	31
Figure 22 : Elution des protéines à travers le gel de Séphacryl S200.....	32
Figure 23 : Unité de chromatographie basse pression	33
Figure 24 : Etapes suivies de l'hydrolyse trypsique des protéines du lait de vache.....	34
Figure 25 : Mécanisme de polymérisation du gel de polyacrylamide.....	35
Figure 26 : Dépôt des échantillons en électrophorèse.....	36
Figure 27 : Unité d'électrophorèse. A : générateur de courant ; B : cuve de migration.....	36
Figure 28 : Principales étapes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour la séparation des protéines.....	38
Figure 29 : Teneur en glucides dans différents jus de fruit.....	42
Figure 30 : Chromatogramme des PS du lait de vache sur séphacryle S200 ; F1, F2, F3 : les fractions éluées respectivement à : 11, 21, 51 ml d'éluant.....	43
Figure 31 : Electrophorégramme des fractions récupérées par la chromatographie de perméation (PAGE-native) ; gel à T = 12 %, C = 2,7 %.....	44

Figure 32 :Électrophorégramme des hydrolysats (protéines sériques lyophilisées du lait de vache) en PAGE-SDS ; gel de concentration (T= 4% et C= 2.7%), gel de séparation (T= 17% et C= 2.7%)... 45

Liste des tableaux

N° des tableaux	Page
Tableau I : Dosage moyen en différents élément dans 100 g de feuilles fraîches de l' <i>Urtica dioica</i>	15
Tableau II : Teneur en acides aminés essentiels d' <i>Urtica dioica</i>	15
Tableau III : Tneur en métabolites primaires et secondaires d' <i>Urtica dioica</i>	17
TableauIV : Les pH et les teneurs en vitamine C (g/l) dans différents jus de fruit commercialisé.....	39
Tableau V : Indice d'iode et d'acide de l'huile d'olive et de tournesol.....	41
Tableau VI : Concentration en protéines totales et protéines sériques des échantillons par BRADFORD <i>et al</i>	43

Liste des annexes

- Annexe 01 :** Dosage de la vitamine C dans un jus de fruit
- Annexe 02 :** Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse
- Annexe 03 :** Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)
- Annexe 04 :** Détermination de la teneur en protéines par la méthode de BRADFORD *etal* (1976)
- Annexe 05 :** Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200
- Annexe 06 :** Hydrolyse enzymatique des protéines du lait de vache (caséines et protéines lyophilisées) par la trypsine

LISTE DES ABREVIATIONS

HBP : Hypertrophie de la prostate bénigne

UDA : *Urtica dioica* agglutinin

Il : Interleukine

BSA : sérumalbumine bovin

CN : caséines

DCPIP : dichloro-2,6dichlorophénolindophénol

DO : densité optique

Da : dalton

DNS : dinitrosalysilique

F : fraction

H : hydrolysate

Ia : indice d'acidité

Ii : indice d'iode

PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide

pH : potentiel d'hydrogène

PM : poids moléculaire

SDS : dodécyl sulfate de sodium

T% : % d'Acrylamide et de bis Acrylamide dans le volume V du tampon

TCA : acide trichloroacétique

TEMED : tétraméthyle éthylène diamine

Tris : tris-hydroxy-amino-méthane

α -La : alpha lactalbumine

β -Lg : beta lactoglobuline

Introduction

La phytothérapie repose sur l'utilisation des substances naturelles d'origine végétal qui possèdent une action thérapeutique sur l'organisme, en effet l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, c'est pourquoi des études se multiplient notamment sur les plantes indigènes. Certaines de ces plantes ont la réputation d'être une panacée et d'autre un produit miracle, l'*Urtica dioica* à l'originalité de correspondre à ces deux catégories.

L'*Urtica dioica* appartient à la famille des urticaceae, elle est une plante rurale très envahissante, herbacée mais vivace, considérée comme une des plantes les plus précieuses, elle a été consommée comme légume depuis la préhistoire. L'ortie dioïque ne fait pas uniquement partie de l'histoire alimentaire, elle est aussi présente dans l'histoire médicinale. Les propriétés médicinales d'*Urtica dioica* sont vantées depuis l'antiquité ; elle a été considérée comme un puissant aphrodisiaque et laxatif, elle a été utilisée aussi pour soigner les plaies et les ulcères. Elle est aussi présente dans le domaine pharmacologique et industriel (textile et papier), elle est donc utilisée comme aliment et médicament. Son utilisation s'est élargie, au fil du temps, à d'autres domaines tels que la cosmétique, l'agriculture ou encore peut être utilisée comme plante fourragère.

L'*Urtica dioica* représente un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites primaires qui sont indispensables à son existence et qui englobent les protéines, les lipides et les glucides et aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques.

L'*Urtica dioica* est en réalité une source d'une formidable diversité de composés, possédant des propriétés thérapeutiques et pouvant être considérée comme des molécules actives. Cette plante pourtant exceptionnelle d'une part la qualité de ces protéines et d'autre part sa richesse en vitamines et minéraux.

La partie chimique active de l'ortie dioïque comprend près de cinquante composés de la fraction lipophile et dont la structure chimique est connue. On trouve des stérols, des acides triterpéniques, des coumarines, des phénols, des lignanes, des céramides, des acides gras, etc., tous ces constituants trouvent leur répartition dans les divers organes de la plante.

L'ortie dioïque est une plante aux nombreuses vertus, qui agissent sur l'ensemble du métabolisme de l'organisme ; et son activité biologique dépend des différents composés. En effet de nombreuses études ont été menées ces dernières années pour déterminer et identifier les différents composés impliqués ; à fin de mieux comprendre ses activités ainsi que ses mécanismes d'action.

Le but principal de cette recherche bibliographique, c'est de faire le point de connaissance sur l'ensemble des métabolites primaires et secondaires à activité biologique d'*Urtica dioica* ainsi que sa composition chimique très diversifiée à l'origine de son utilisation dans divers domaines, thérapeutiques, cosmétique, textile, alimentaire et agriculture.

1.1. Botanique de l'*Urtica dioica*

1.1.1. Historique

Réputée être une mauvaise herbe, *Urtica dioica* LINEE (L.), a des applications médicinales qui remontent à l'Antiquité. Elle figure, en effet, depuis des siècles dans les différentes pharmacopées traditionnelles. Au premier siècle, le médecin, pharmacologue et botaniste grec, DIOSCORIDE la considérait comme un puissant aphrodisiaque. Une décoction d'ortie et de raisin secs dans du vin donnait, selon lui, d'excellents résultats (BERTRAND, 2008). Mélangées dans du miel, ces grains sont expectorantes (BOULLARD, 2001), un siècle plus tard, GALIEN énumère les mêmes propriétés. L'urtication ou la flagellation thérapeutique avec des tiges d'ortie, préconisée pour soigner les rhumatismes chroniques, la léthargie, le coma, la paralysie, le typhus et le choléra, remonte à l'Antiquité.

Au Moyen Âge, l'ortie dioïque est considérée comme une panacée et toutes les parties de la plante sont utilisées : les parties aériennes, les racines, les graines et même le suc frais, en topique contre les douleurs articulaires, les plaies enflammées et les hémorragies, et ceci, jusqu'au XVII^{ème} siècle. Au début du XIX^{ème} siècle, l'ortie retombe dans l'oubli jusqu'à ce que deux médecins français GINESTET (1845) puis JOSEPH CAZIN (1846) redécouvrent ses vertus antihémorragiques, CAZIN rapporte l'utilisation du suc d'ortie dioïque pour soigner notamment les hémorragies utérines (BERTRAND, 2010 ; TISSIER, 2011).

L'*Urtica dioica* a été largement exploitée pour ses fibres, notamment au XIX^{ème} siècle. Dans les années 1950, l'industrie textile a cependant dû abandonner cette plante au profit du coton pour des raisons techniques (la faible longueur des fibres fait que sa transformation est difficilement mécanisable) et de rentabilité (le rendement de la culture de la grande ortie est inférieur à celui du coton).

L'*Urtica dioica* fut utilisée dans l'alimentation dès les débuts de l'agriculture. Elle a été consommée en tant que légume de la préhistoire jusqu'au XVI^{ème} siècle (FLEURENTIN, 2008). Dans les années 1950, les marchés des villes d'Europe orientale étaient encore abondamment approvisionnés en ortie, que ce soit pour l'alimentation animale, mais aussi la consommation humaine (BERTRAND, 2008).

Aujourd'hui encore, l'*Urtica dioica* reste largement utilisée dans différents domaines : thérapeutique, cosmétique, alimentation, agriculture...

1.1.2. Origine et répartition dans le monde

Originaire d'Eurasie, l'ortie dioïque s'est répandue dans toutes les régions tempérées du monde. On la rencontre plus en Europe du Nord qu'en Europe du Sud, en Afrique du nord, en Asie et largement distribuée en Amérique du Nord et du Sud (BRISSE *et al.*, 2003).

Elle est très commune en France, bien que plus rare en région méditerranéenne. Elle est présente jusqu'à 2400 mètres d'altitude. Elle peut atteindre les sommets du Jura et du Massif Central, on la rencontre encore dans les Alpes et les Pyrénées (FLEURENTIN, 2008).

L'Ortie dioïque est une plante annuelle qui pousse au voisinage des habitations, les décombres et lieux incultes : c'est une plante qualifiée de rudérale, on la retrouve également dans les sols fumés riche en azote, sur tous les terrains argileux ou sablonneux, calcaires ou siliceux (BERTRAND, 2008).

Elle supporte tous les sols, surtout ceux contenant des matières organiques fraîches; elle fait partie des plantes nitrophiles. Symbole de milieux riches et fertiles, l'*Urtica dioica* ne pousse jamais seule, mais en grands massifs compacts à l'abri desquels s'installe de nombreux insectes (BERTRAND, 2002).

1.1.3. Dénomination de la plante

L'ortie dioïque est aussi appelée grande ortie, ortie commune ou ortie vivace. Le nom latin de l'ortie est *Urtica dioica* L. L'ortie se disait *Urtica* en latin, mot venant lui-même du verbe *ureres* signifiant bruler. Par extension, urticaire, urticant, urtication se disent de toute espèce de démangeaisons similaires à celles provoquées par les piqures d'orties.

Le nom d'espèce *dioica*, dioïque en français, concerne un végétal dont les fleurs, mâles et femelles sont portées par des pieds différents (BERTRAND, 2008 ; VALNET, 1992).

1.1.4. Taxonomie

L'*Urtica dioica* appartient à la famille des urticaceae, cette dernière comprend une cinquantaine de genres et près de 700 espèces réparties à travers le monde.

Les principales espèces du genre *Urtica* sont (DRAGHI, 2005) :

Urtica dioica;

Urtica urens;

Urtica pilulifera;

Urtica cannabina.

D'après la troisième version de la classification botanique des angiospermes établie par AngiospermsPhylogeny Group (APGII) en 2009, la position systématique de l'ortie est la suivante (DELAHAYE, 2015) :

Règne	Végétale
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Magnoliophyta
Sous- embranchement	Magnoliophytina
Super -division	spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Rosidaeae
Sous classe	Rosidaeaedialecarperllées
Ordre	Rosales
Famille	Urticaceae
Genre	<i>Urtica</i>
Espèce	<i>dioica</i>



Figure 01 : *Urtica dioica* (REAUME, 2010).

1.1.5. Description de l'*Urtica dioica*

L'*Urtica dioica* considérée comme plante rurale très envahissante, elle est herbacée mais vivace, de 60 à 120 cm de haut. Les parties souterraines sont constituées par des rhizomes cylindriques de 3 à 10 mm d'épaisseur et de longues racines de 1 à 5 mm d'épaisseur portant d'autres plus fines, ils sont jaunâtres, traçants et abondamment ramifiés qui développent chaque année de nouvelles pousses, d'où le caractère parfois envahissant de l'ortie. Ils fixent l'azote de l'air grâce à l'action de micro-organismes (*rhizobium frankia*) qui vivent en symbiose avec l'ortie dioïque (MOUTSIE, 2008).

Les feuilles sont grandes et opposées deux par deux, de couleur vert foncée en raison de leur richesse en chlorophylle et généralement longues de plus de 5 cm (SCHAFFNER, 1993 ; MOUTSIE, 2008), ovale, charnues, tombantes, dentelées, grossièrement en forme de cœur et terminée par une pointe.

Les fleurs, apparaissant de juin à septembre, sont disposées à l'aisselle des feuilles, en grappes ramifiées, dans toute la partie supérieure de la plante. Que les fleurs soient mâles ou femelles, elles sont vert gris, verdâtres, petites et discrètes. Les fleurs des pieds mâles évoquent de petits amas de perles, souvent teintés de rouge (FLETCHER, 2007). Les fleurs femelles ont 4 sépales et un ovaire velu de couleur verdâtre. Les grappes qui les portent pendent, en particulier lorsque les graines se forment (MOUTSIE, 2008).

Le fruit d'*Urtica dioica* est constitué d'un akène ovale enfermé dans un calice persistant contenant une graine. Provenant des panicules à maturité, il est de couleur sable à jaune-brun, de forme aplatie, ovoïde et pointue, mesure 1 à 1,5 mm de long sur 0,7 à 1 mm de large. Ses extrémités pointues portent des restes de stigmates pénicillées, les fruits sont très souvent entourés de deux petites feuilles extérieures, étroites, et de deux feuilles intérieures plus grandes, larges et ovales de couleur verte (WICHTL et ANTON, 2003).

Urtica dioica est caractérisée par la présence de poils unicellulaires de forme conique sur la face supérieure des feuilles et sur la tige, constituée d'un bulbe incrusté de silice et surmonté par une pointe recourbée.

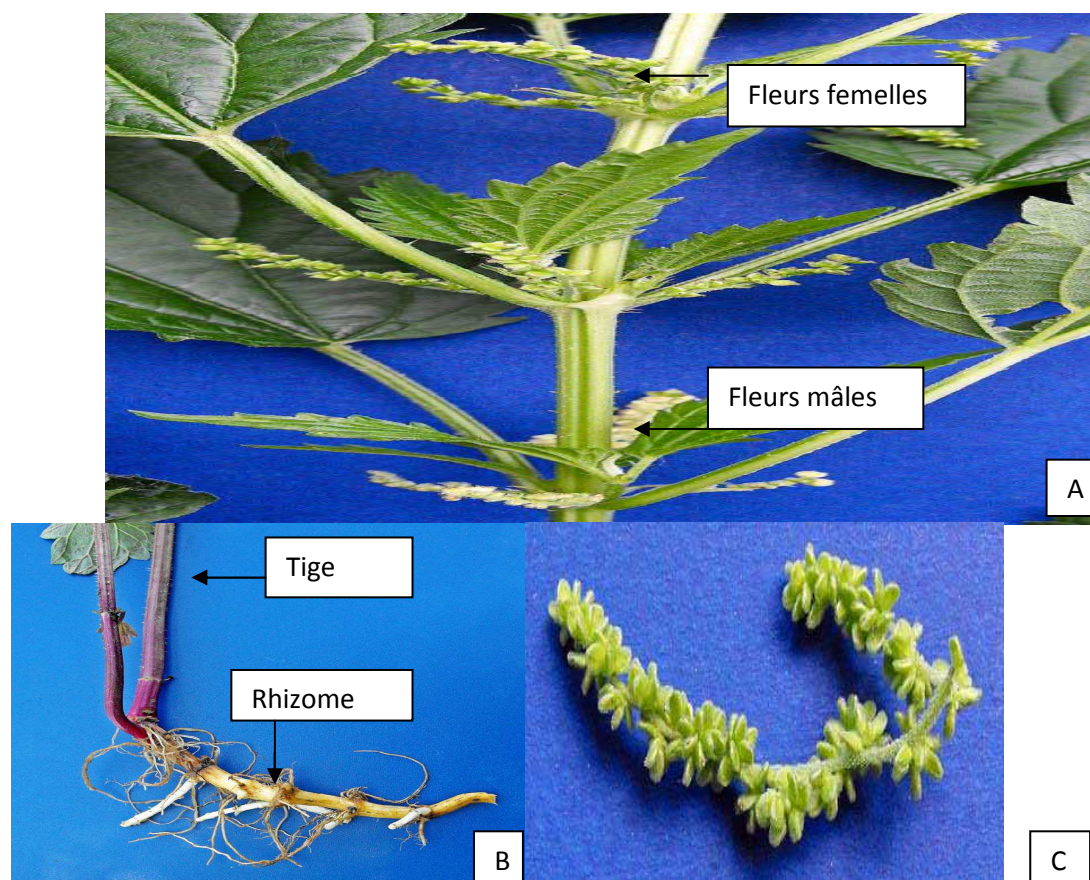


Figure 02 : Différentes parties d'*Urtica dioica* les fleurs mâles et femelles (A), le rhizome (B) et le fruit (C) (REAUME, 2010).

1.2. Composés primaires et secondaires des végétaux

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des composés chimiques. Parmi ces derniers nous avons de nombreux composés appelés métabolites primaires qui sont indispensables à leurs existences, ceux-ci englobent des protéines, des lipides, des fibres alimentaires et des hydrates de carbone qui exercent une fonction directe au niveau des activités fondamentale de l'organisme végétal (MERGHEM, 2009). Ils servent aussi 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. Ces derniers ne sont pas nécessaires pour leurs événements biochimiques essentiels, et diffèrent en fonctions des espèces. Leur rôle intervient dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent (parasites, pathogènes, prédateurs...) (MERGHEM, 2009).

En effet, ces métabolites secondaires représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (HERBERT, 1989).

1.2.1. Métabolites primaires

1.2.1.1. Les protéines

Les protéines sont des macromolécules formées par succession d'une chaîne de plusieurs acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques, qui peuvent représenter sous forme de plusieurs conformations pour donner la forme appropriée pour chaque type de protéine.

Les protéines sont de valeurs nutritives indispensables pour les humains et les animaux. Sont présentes dans les produits d'origines végétales, animales et les organismes unicellulaires. Elles présentent non seulement les constituants fondamentaux des organismes vivants, mis aussi jouent un rôle moteur dans leur fonctionnement et même dans la protection.

1.2.1.2. Les lipides

Les lipides sont des substances naturelles, esters d'acide gras et d'un polyol. Les acides gras comportent généralement un nombre paire d'atome de carbone entre 4 et 40, ils se répartissent en deux groupes: acides gras saturés et acides gras insaturés.

Les lipides ou corps gras sont réservés dans les fruits et dans les feuilles, plus rarement dans les tiges et encore dans le mésocarpe du fruit (olive, palmier huile) ; comme les plantes dites oléagineuses (BENSLAMA, 2015).

Les teneurs en matières grasses sont sujettes à variation, étant influencées par les facteurs saisonniers et géographiques, d'une part, et par les facteurs génétiques, d'autre part.

➤ Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances volatiles qui diffèrent par leurs propriétés physicochimiques des huiles fixes. Ces substances se trouvent généralement liées à d'autres composés comme les gommes et les résines et ont d'ailleurs même la tendance de se transformer en résine quand elles sont exposées à l'air libre (EVAN et TREASE, 2002).

1.2.2.3 Les glucides

Les glucides ou les saccharides sont les biomolécules les plus abondantes dans la matière vivante. Ils représentent environ 70 % du poids sec des végétaux. Les plantes synthétisent des quantités d'hydrates de carbone excédant de beaucoup leur besoin ; qui sont principalement la cellulose, l'hémicellulose, la pectine et l'amidon.

Les glucides sont rencontrés sous forme de sucres simples tels que l'arabinose, le glucose ou encore le galactose, ils peuvent aussi être polymérisés comme l'inuline, l'amidon, la cellulose et les mucilages (BARNES *et al.*, 2007).

Les mucilages sont des substances végétales possédant une composition intéressante au regard de ses propriétés pharmaceutiques. Ils sont composés pour 68% de leur poids sec de fructosane, polymère de fructose, et 5,1% d'acides uroniques.

L'inuline, polymère de polysaccharides composé de chaînes de fructose, tout comme l'amidon, polysaccharide à base de D-glucose, sont présents en quantité moindre mais jouent un rôle essentiel comme moyen de stockage de l'énergie, notamment dans les racines de la plante (APOLINARIO *et al.*, 2014).

1.2.2. Métabolites secondaires

On appelle métabolites secondaires des composés bio synthétisés naturellement par les végétaux mais qui ne participent pas directement au métabolisme végétal. De nombreux métabolites secondaires possèdent des propriétés thérapeutiques (GUILLAUME et CHARROUF, 2005).

Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites (ou moins 30000 structures caractérisées) et sont classés selon leur appartenance chimique en 3 grandes classes :

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

1.2.2.1. Composés phénoliques

Les composés phénoliques ou polyphénols représentent un groupe de substances variées et ubiquistes. Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu' aux fruits (LANGLADE, 2010). Bien qu'étant très diversifiés, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

Les composés phénoliques se différencient d'abord par la complexité du squelette de base allant d'un simple phénol en C6 à des formes très polymérisées en C15. Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) (MACHEIX *et al.*, 2005). Ils sont divisés en plusieurs classes :

- les phénols simples ou acides phénoliques ;
- les flavonoïdes ;
- les tanins obtenus par polymérisation des flavonoïdes ;
- les lignanes avec les isoflavones sont nommés phyto-œstrogènes.

➤ Les phénols simples ou acide phénoliques

Les phénols simples sont rares dans la nature (catéchol, phloroglucinol ...). Les acides phénols sont des dérivés de l'acide benzoïque (composés en C6-C1) tels que l'acide gallique élément constitutif des tanins hydrolysables ou de l'acide cinnamique (composés en C6-C3) comme l'acide caféique qui sont souvent estérifiés.

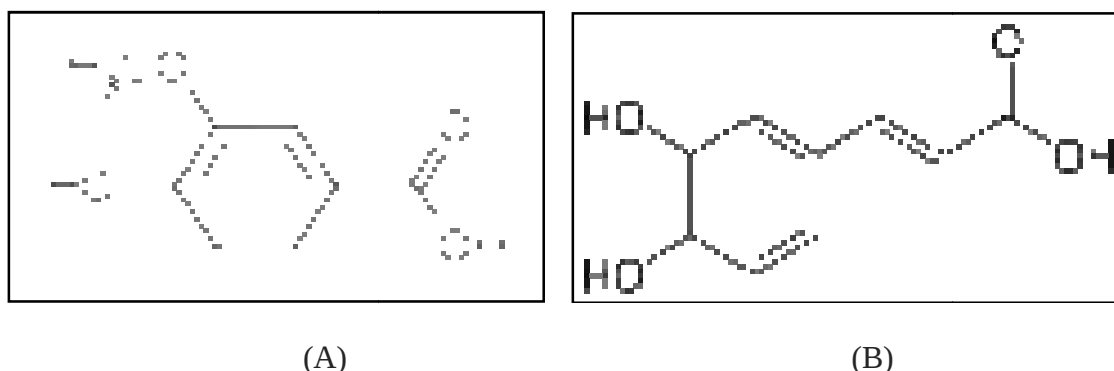


Figure 03 : Structure chimique de l'acide caféique (A) et de l'acide gallique (B) (GIULIA *etal.*, 1999).

➤ Flavonoïdes

Le nom flavonoïde est dérivé du mot *Flavus* latin, qui signifie jaune. Les flavonoïdes appartenant à la famille des polyphénols, sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux.

Les flavonoïdes assurent principalement deux rôles : ils sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles, ainsi la protection des tissus contre les ultraviolets (BRUNETON, 1993).

Les flavonoïdes sont des composés solubles dans l'eau et dans le méthanol mais insolubles dans les solvants organiques. Ils ont une très haute solubilité en milieu alcalin donnant généralement une coloration jaune qui disparaît par l'addition d'acides (EVANS et TREASE, 2002).

D'un point de vue structural, la structure de base des flavonoïdes est celle d'un diphenyle propane à 15 atome de carbone, constitué de deux noyaux aromatiques que désignent des lettres A qui provient de la voie d'acétate et B qui provient de la voie de l'acide shikimique (SARKER et NAHAR, 2007), reliés par un hétérocycle oxygène, que désigne la lettre C (HARBONE, 1998) (figure 04).

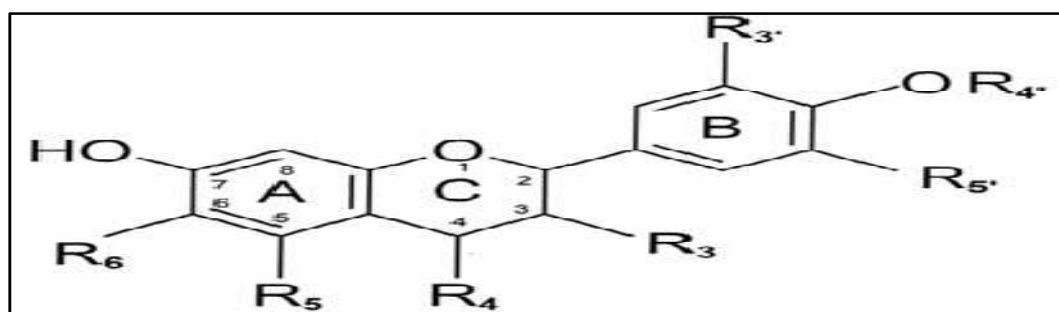


Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes (GIULIA *et al.*, 1999).

R : radical

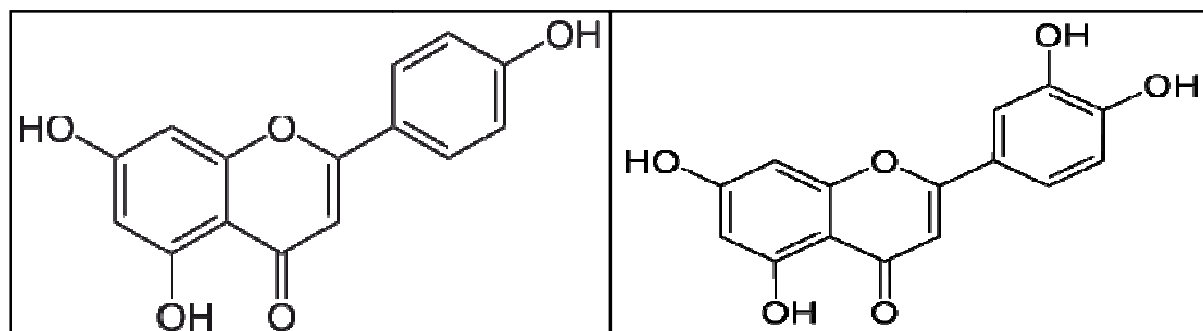
Les flavonoïdes se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme d'hétérosides, résultant d'une combinaison du groupe réducteur d'un ose avec une substance non glucidique qui est l'aglycone ou la génine. La liaison génine-ose existe entre un hydroxyle phénolique ou un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné et un -OH ou un -CH de la fonction hémiacétalique des oses. On obtient alors des O-hétérosides ou des C-hétérosides (MILANE, 2004).

Les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanonols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes (HARBONE, 1998 ; KURESH *et al.*, 2002). Les composés de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle intermédiaire (JULIES et CHRISTIN, 2002). On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

• Les flavones

Le noyau flavone dérivé du noyau flavane de base, dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) par la

fixation à la position 4 d'un atome d'oxygène relié au carbone par une double liaison, les principaux flavones sont : l'apigénine et la lutéoline, elles ont dans la majorité des cas la forme de glycosides (HARBONE, 1998 ; KURESH *et al.*, 2002).



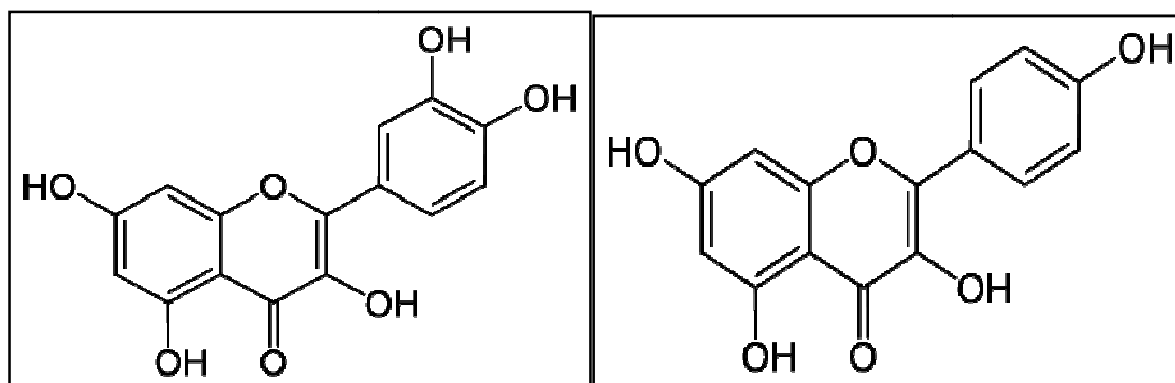
A) 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)
4H-1-benzopyran-4-one

B) 5, 7-dihydroxy-2-(3, 4-dihydroxyphényl)-
chromèn-4-one

Figure 05: Structure de l'apigénine (A) et de la lutéoline (B) (GIULIA *et al.*, 1999).

- **Les flavonols**

Les flavonols sont caractérisées par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3. Ils sont beaucoup plus abondants dans le règne végétal que les flavones et leurs concentrations sont plus élevées. Les principaux sont la quercétine, kaempférol, myricétine (KURESH *et al.*, 2002).



A) 3,3',4', 5,7-pentahydroxy-2 phénylchromén-
4-one ou 2-(3,4-dihydroxyphényl)-3, 5,7-
trihydroxy-4H-chromén-4-one

B) 3, 5, 7-trihydroxy-2-(4-
hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one

Figure 06 : Structure de la quercétine (A) et de kaempférol (B) (GIULIA *et al.*, 1999).

- **Les flavonones**

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en C2 et C3 et par la présence d'un centre d'asymétrie. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylées. Sous forme libre, les carbones en position 5 et 7 sur le cycle A peuvent être hydroxylés ou méthoxylés (groupement O-CH₃ à la place des seules fonctions phénoliques), le cycle B peut aussi être substitué en position 3', 4', 5' et 6'. La principale flavonone est : la marigénine.

- **Les flavanonols**

Ils se distinguent des flavonones par l'absence à la position 4 d'un atome d'oxygène relié ou carbone par une double liaison la plus rencontré est : la catéchine (figure 07).

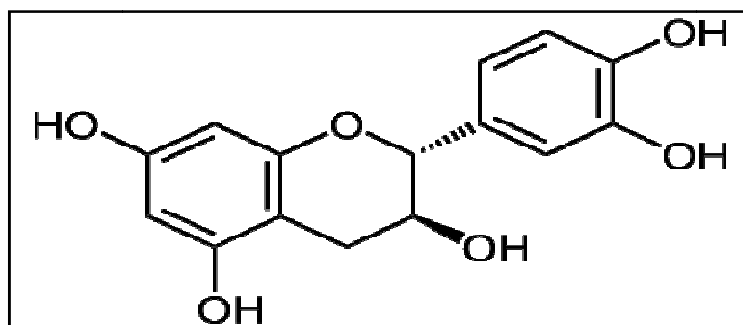


Figure 07 : Structure de la catéchine (GIULIA *et al.*, 1999).

- **Les chalcones**

Les chalcones dérivent des flavanones par isomérisation réversible en milieu alcalin, ce qui traduit par l'ouverture de l'hétérocycle C avec formation d'une double liaison en position C2-C3 (figure 08). Les chalcones sont peu présentes dans l'alimentation en raison de leur transformation en flavanones en milieu acide, principalement au cours des étapes d'extraction. Les plus abondants sont : la butéine et la phlorétine.

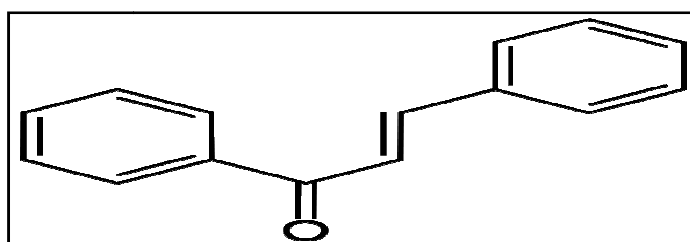


Figure 08 : Structure de base des chalcones (GIULIA *et al.*, 1999).

- **Les anthocyanidines**

Les anthocyanidines ne possèdent pas de groupe OH à la position 4 et ont une double liaison entre les positions 3 et 4 par contre, ils sont toujours hydroxylés en position 3. Les plus importants sont : la pélagonidine, la cyanidine et la pénonidine (BENGUERBA, 2008).

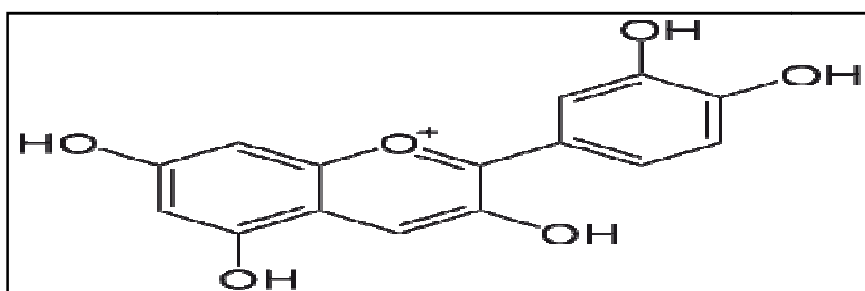


Figure 09 : Structure de cyanidine (2-(3,4-dihydroxyphényl) chroménylium-3, 5,7-triol) (GIULIA *et al.*, 1999).

- **Coumarines**

Les coumarines sont des dérivés d'acides cinnamiques par cyclisation de la chaîne latérale de l'acide o-coumarique (figure 10) (KURESH *et al.*, 2002).

Ce groupe peut être trouvé libre dans la nature ou à la forme combiné avec les sucres comme l'hétéroside et glycosides dans beaucoup de familles du dicotylédones.

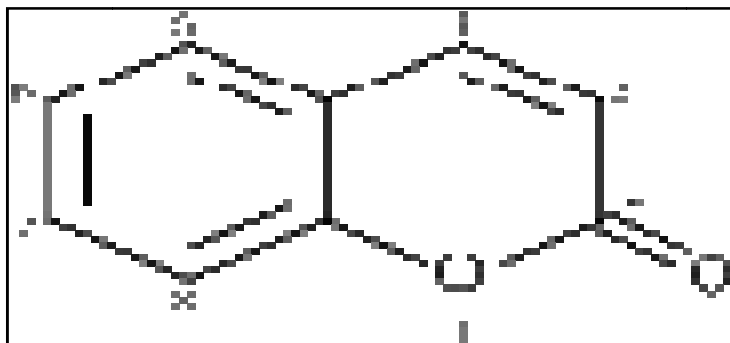


Figure 10 : Structure de coumarine (1-benzopyrane-2-one)(GIULIA *et al.*, 1999).

➤ **Tanins**

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton (Da). Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides, et essentiellement les protéines (COWAN, 1999).

Selon leur nature chimique ces composés sont divisés en deux classes ; les tanins hydrolysable et les tanins condensées (COWAN, 1999).

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucose et d'acide gallique (GUIGNARD, 2000). Ils sont d'abord caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide (GUIGNARD, 2000).

Les tanins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ol dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères (HARBORNE, 1998) (figure 11). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (GUIGNARD, 2000).

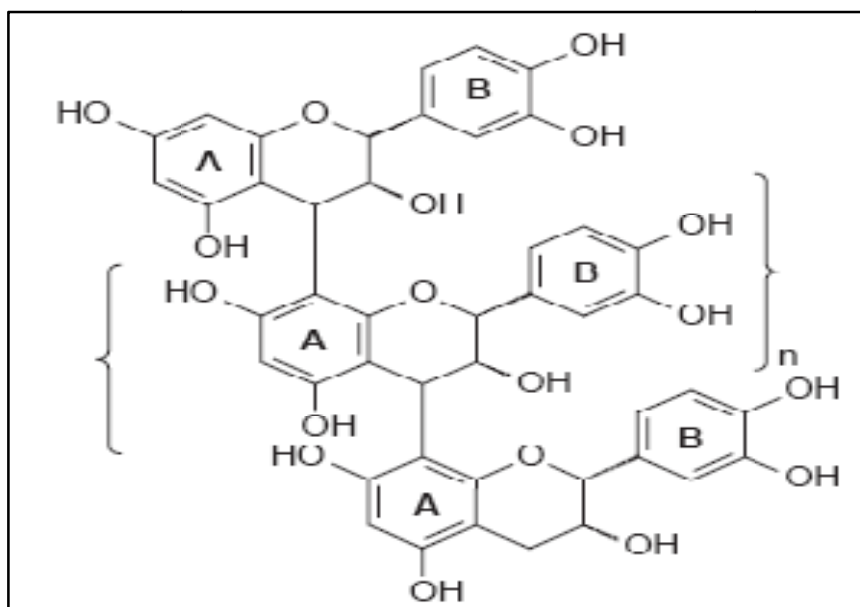


Figure 11 : Exemple de structure de base des tanins condensés (LEE *et al.*, 2004).

➤ Les lignanes

Les lignanes résultent de la condensation d'unités phénylpropaniques. Quatre groupes peuvent être considérés : les lignanes avec une liaison entre deux carbones β des chaînes latérales de deux unités dérivées du phénylpropane, les néolignanes qui présente un seul carbone β , les oligomères formé par la condensation de 2 à 5 unités phénylpropaniques et enfin les norlignanes avec un squelette en C17.

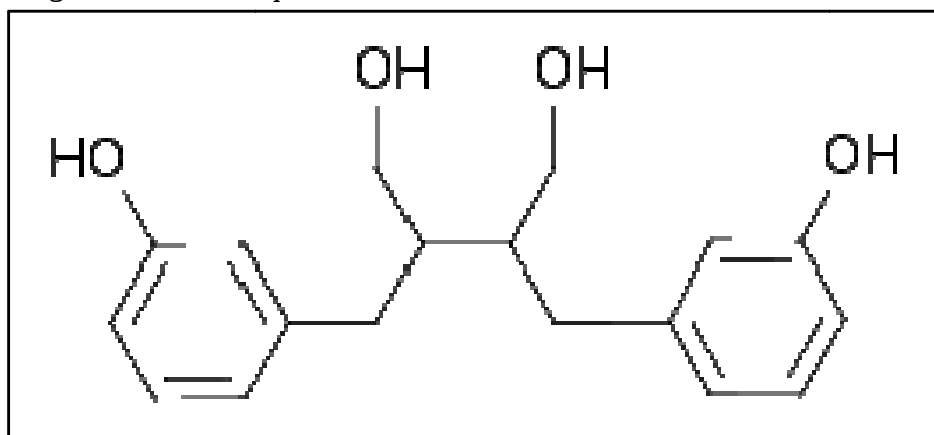


Figure 12 : Structure de lignane (GIULIA *etal.*, 1999).

1.2.2.2. Terpènes

Les terpènes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux, notamment les plantes supérieures. Ils sont également rencontrés dans les autres types d'organismes vivants (algues, mousses, champignons, insectes. (KRIEF, 2003). En effet, plus de 36000 structures différentes ont été identifiées. Plusieurs sont isolés à partir des fleurs, des tiges, des racines et différentes parties de la plante.

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unités isopréniques à 5 atomes de carbones (C_5H_8) (figure 13). Ils sont subdivisés selon le

nombre d'entités isoprènes en mono terpènes formés de deux isoprènes ($C_{10}H_{16}$). Les sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$). Les di terpènes, formés de quatre isoprènes ($C_{20}H_{32}$). Le tétra terpènes avec huit isoprènes qui conduisent aux caroténoïdes. Les poly terpènes (C_5H_8)_n ou n peut être de 9 à 30 (AFIF CHAOUCHE, 2015).

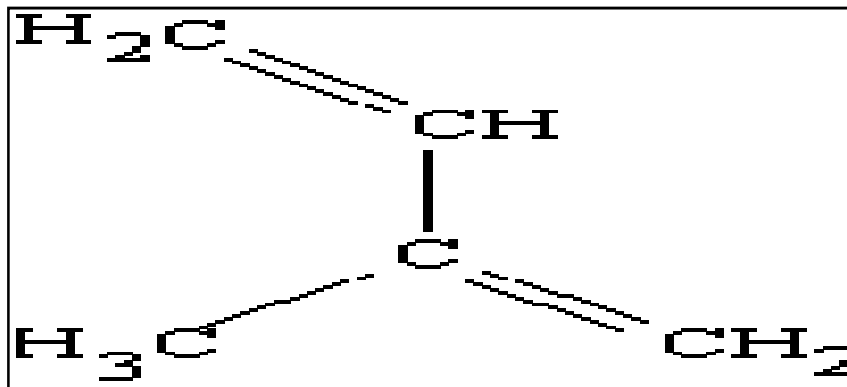


Figure 13 : Isoprène(C_5H_8) (2-méthyl-1,3-butadiène) (LEE *et al.*, 2004).

- ✓ **Les terépénoïdes** : sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide etc.) (KRIEF, 2003).
- ✓ **Les monoterpènes** : peuvent être acycliques (myrcène, ocymène), monocyclique (terpinène, p-cimène) ou bicyclique (pinène, sabinène). A ces terpènes se rattachent un certain nombre de substances à fonction chimique : alcools (géraniol, menthone), aldéhydes (géraniol, citronellal, sinensal), cétones (carvone, menthone, β -vétinone) et des esters (acétate de géranyle, acétate de linalyle, acétate de cédryle, acétate α -terpinyle) (KRIEF, 2003).
- ✓ **Les sesquiterpènes** : il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes. Elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple : β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humullène, α -bisabolol, farnesol (BRUNETON, 1999)
- ✓ **Les caroténoïdes** : ce sont des molécules tétra terpéniques, constituées de l'enchaînement de 8 unités isopréniques, possédant un chromophore caractéristique (au moins 10 doubles liaisons conjuguées) expliquant leur couleur jaune-orangée et leur sensibilité à l'oxydation. Les caroténoïdes sont employés en industrie agro-alimentaire principalement pour leur pouvoir colorant mais on peut aussi noter qu'ils sont préconisés en cas de photodermatose puisqu'ils interfèrent avec les processus de photo-oxydation (KRIEF, 2003).

1.2.2.3. Composés azotiques (alcaloïdes)

Les alcaloïdes sont des produits d'origine végétale, molécules organiques hétérocycliques azotées, ils se caractérisent par un goût assez amer. Chimiquement ils sont constitués de carbone, de l'hydrogène et de l'azote, et le plus souvent de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre) (BRUNETON, 1999).

Il en existe environ 12000 répertoriés à ce jour; les principaux précurseurs sont des acides aminés simples comme la tyrosine(Tyr), le tryptophane (Trp), l'arginine (Arg.) ou la lysine (Lys). Ils sont stockés dans les cellules végétales au niveau des vacuoles. Ils possèdent

de nombreuses propriétés pour la plante jouant un rôle de défense et sont également utilisés en médecine et en pharmacie (DJAHRA, 2015).

La teneur en alcaloïdes se différencie d'une partie à une autre et selon la période de récolte et les conditions de croissances, ainsi que la région (influence du sol, climat,...). Ils se présentent avec des concentrations différentes dans les tiges, les fleurs, les racines et les feuilles. Le premier alcaloïde découvert a été la morphine en 1805. Les alcaloïdes les plus connus sont : la colchicine, l'atropine et la caféine.

Selon que l'azote soit engagé dans un cycle ou non on a :

-**Alcaloïdes non hétérocycliques**: rares, les plus importants dérivent de l'amino-ethylbenzène ;

-**Alcaloïdes hétérocycliques**: sont les plus nombreux, ils peuvent être mono ou polycycliques.

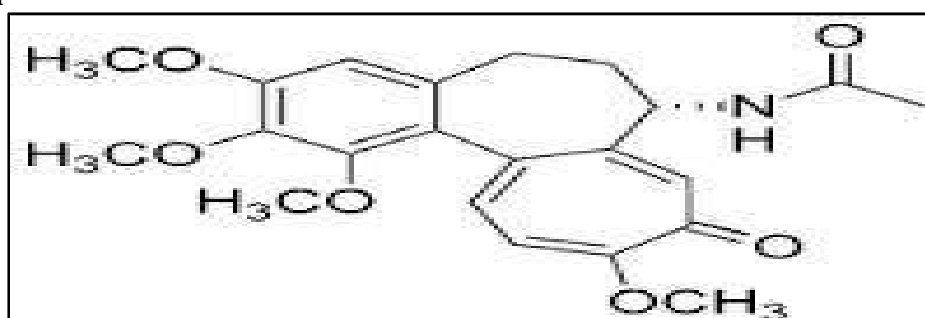


Figure 14: Structures chimiques de Colchicine (DJAHRA, 2015).

1.3. Composition chimique de l'ortie dioïque

La composition chimique de différentes parties d'*Urtica dioica* à savoir les feuilles, les fruits et les racines, a été le sujet de nombreuses études depuis la seconde moitié du XIX^{ème} siècle. Depuis, des progrès considérables ont été réalisés dans la découverte de la structure des composés, grâce aux améliorations des techniques de séparation et des méthodes spectroscopiques (DRAGHI, 2005). C'est à travers de la composition chimique et de la teneur en métabolites primaires et secondaires que contient une plante, qu'on peut apprécier leurs activités biologiques ainsi que leurs éventuelles utilisations.

1.3.1. Composition de la feuille

Les feuilles d'*Urtica dioica* contiennent une assez large variété de constituants chimiques bien que seulement quelques composés ont été identifiés.

La feuille d'ortie dioïque contient des quantités très importantes de caroténoïdes (6 différents, dont le β -carotène), d'acide folique (vitamine B9), de vitamines C et E, on y trouve aussi, en quantité moindre, des vitamines B1 (thiamine), B2 (riboflavine), B3, B5 (acide pantothénique), B6 (pyridoxine), D et K, ainsi que de nombreux minéraux : manganèse, sodium, cuivre, soufre, iode et chrome, ainsi que le calcium qui est associé au bore, qui facilite son assimilation, tandis que le fer est associé à la vitamine C, qui favorise son absorption par l'organisme.

Tableau I : Dosage moyen en différents élément dans 100 g de feuilles fraîches de l'*Urtica dioica* (MEGNOUNIF, 2011).

Elément	Dosage moyen en mg
Calcium	60 à 324
Phosphore	10 à 673
Fer	7,8 à 13,4
Sodium	1 à 16
Potassium	400 à 2044
Magnésium	7 à 399
Vitamine A	0 à 6
Vitamine B2	0,12 à 0,23
Vitamine B3	0,1 à 1,45
Vitamine B9	212
Vitamine C	18,8 à 350
Vitamine E	14,4

L'*Urtica dioica* contient des protéines de 5 à 6% dans les plantes fraîches et 23 à 24% dans les plantes sèches; 70% de ces quantités sont des protéines digestibles (BOMBARDELLI et MORAZZONI, 1997), ces protéines contiennent 18 acides aminés au total sur 20 existants, dont les 8 acides aminés essentiels au développement de l'organisme en proportions harmonieuses, ce qui en fait un aliment complet.

Tableau II : Teneur en acides aminés essentiels d'*Urtica dioica* (BILLOTTE *et al.*, 2014).

Acides aminés essentiels	Quantité (g/100g de plante)
Isoleucine	4,8
Leucine	9,0
Lysine	5,5
Méthionine	1,8
Phénylalanine	5,8
Thréonine	4,6
Tryptophane	1,3
Valine	6,3

La feuille d'*Urtica dioica* contient encore, entre autres, de la chlorophylle en quantité importante, de la silice, des flavonoïdes (quercitrine), de la sécrétine. Certains composants

rares, comme la choline acétyl-transférase, enzyme synthétisant l'acétylcholine, la grande ortie étant la seule plante connue à posséder cette enzyme.

1.3.2. Composition chimique des racines

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

- des polysaccharides: deux glycanes, deux glucogalacturonanes (FLEURENTIN, 2008), un acide arabinogalactane (WICHTL et ANTON, 2003);
- des acides gras: de l'acide hydroxy-octadécadiénoïque ;
- des céramides spéciaux : amides d'acides gras avec des poly-hydroxy-alkylamines, métabolites des sphingolipides (WICHTL et ANTON, 2003);
- des terpènes diols et des terpènes diols glucosides ;
- des phytostérols ;
- des composés phénoliques : ils sont au nombre de 18 identifiés par KRAUS et SPITELLER en 1991 ;
- des dimères du phénylpropane ;
- des lignanes : diarylfuranique et leurs glucosides, sécoisolaricirésinol et leurs dérivés acétylé et glucosides (WICHTL et ANTON, 2003).
- des lectines.

➤ **Les lectines** : sont des protéines ou glycoprotéines de masse moléculaire variant entre 8500 et 300 000 Da, constituée de plusieurs sous-unités, que l'on rencontre aussi bien dans le monde végétal que dans le monde animal. Les lectines se lient spécifiquement par affinité, de manière réversible à un ose ou un oligoside (que celui-ci soit libre ou bien lié à une cellule), de façon assez similaire aux enzymes et aux immunoglobulines. La première lectine connue est la concanavaline A, une protéine métallique formée de 4 sous-unités identiques, chacune de masse moléculaire de 26 000 Da et formée de 238 résidus acides aminés. Elle a été extraite des graines de *Canavalia ensiformis*. Le mot lectine vient d'ailleurs du latin *legere* signifiant sélectionner. Les lectines interviennent dans de nombreux processus tels que l'adhésion cellulaire, la synthèse de glycoprotéines, ainsi que dans l'immunité.

✓ *Urtica dioica* agglutinine (UDA)

L'UDA est une petite protéine monomérique. Elle a été rapportée comme étant la plus petite lectine de plante connue avec une masse moléculaire d'environ 8 500 Da et moins de 100 résidus d'acides aminés. Des études ont montrées que l'UDA est en fait un mélange d'au moins 6 protéines isomériques différentes, de masse et de structure moléculaire similaires appelées des isolectines. Ces isolectines diffèrent par le nombre et leur composition en acides aminés. Il a été prouvé que leurs séquences en acides aminés partagent 79 à 99 % d'identité.

L'UDA se lie spécifiquement à la N-acétylglucosamine ou à ses oligomères. Les feuilletts β que l'on trouve dans l'UDA sont intimement impliqués dans la liaison trisaccharidique. Elle possède cependant un faible pouvoir d'agglutination.

L'UDA est relativement résistante aux acides, à la chaleur ainsi qu'aux protéases (comme la trypsine et la chymotrypsine) (WICHTL et ANTON, 2003 ; GANZERA *et al.*, 2005 ; TESSIER, 1994).

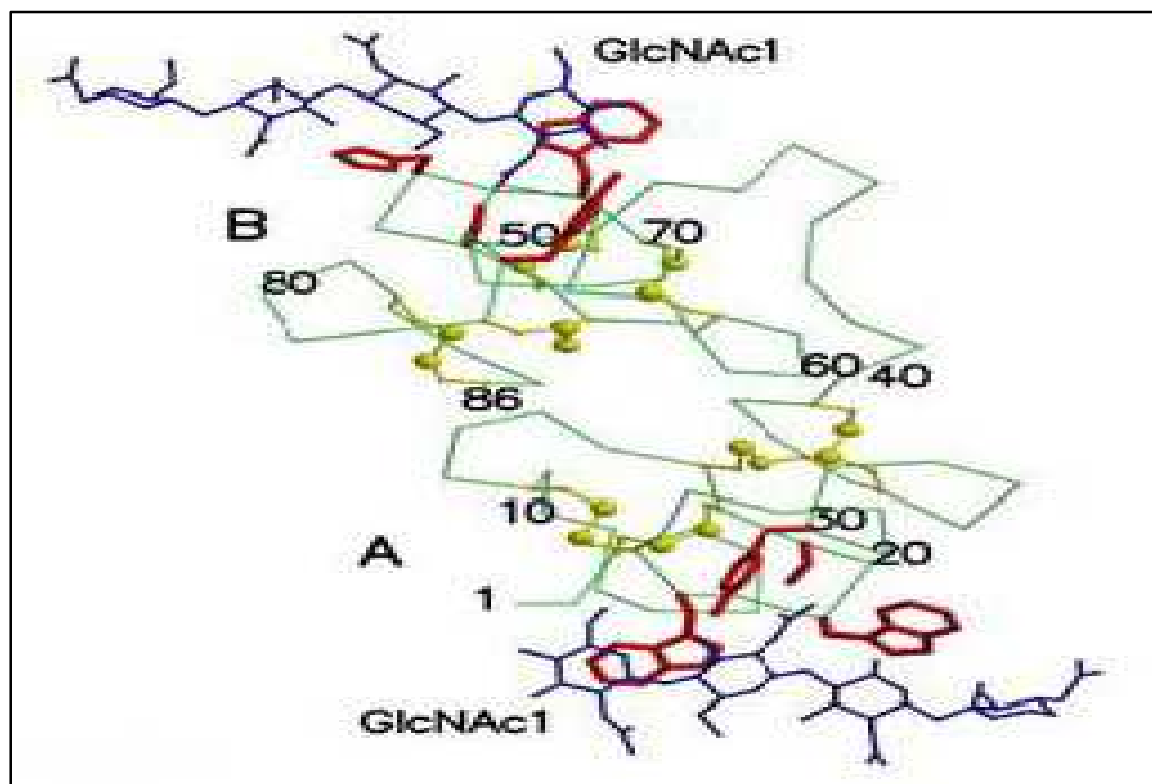


Figure 15 : Structure chimique d'*Urtica dioica* Agglutinin (UDA) (LANGLADE, 2010).

Les phytostérols, les lignanes, les polysaccharides et la lectine UDA sont considérés comme les principes actifs des racines d'*Urtica dioica* (CHRUBASIK *et al.*, 2007).

Tableau III : Teneur en métabolites primaires et secondaires d'*Urtica dioica* (MEGNOUNIF, 2011).

Les métabolites	Teneur en % en matière sèche	
	Feuilles	Racine
Métabolites primaires		
Sucre totaux	10,06	12,06
Lipides	7,5	10,55
Protéines totales	22,6	14,4
Protéines pures	15,75	7,02
Fibres totales	19,6	37,82
Cendres	25	-
Métabolites secondaires		
Phénols totaux	4,58	1,84
Tanins	0,61	0,25
Flavonoïdes	1,1	0,8

1.3.3. Composition des poils urticants

L'action urticante est due au liquide contenu dans les poils. Ce liquide est libéré au moindre choc après rupture de l'extrémité des poils, qui deviennent ainsi une véritable aiguille hypodermique.

FLURY, en 1927, met en évidence la présence d'une petite quantité d'acide formique dans le poil. Cependant, bien que cette molécule puisse jouer un rôle dans l'effet de sensation de brûlure, c'est un facteur mineur.

Des travaux ont été effectués en 1947 par EMMELIN et FELDBERG, ont trouvé que le liquide des poils contenait au moins trois composés qui sont : l'acétylcholine, à une concentration de 1 %, l'histamine, à une concentration de 1 pour 500 à 1 pour 2000, et la 5-hydroxy-tryptamine (la sérotonine). On trouve également une petite quantité de leucotriènes (DRAGHI, 2005).

C'est l'histamine et l'acide formique qui provoquent les démangeaisons faisant penser à une brûlure désagréable. Le contact avec les poils urticants entraînent ainsi le développement d'une macule érythémateuse et d'un prurit ou d'un engourdissement durant une période allant de quelques minutes à quelques jours. Il ne faut que 1/10 de microgramme de substance pour provoquer l'irritation et l'apparition de cloques (BERTRAND, 2008).

1.3.4. Composition des fleurs

Selon AKBAY *et al* en 2003, sept glucosides flavonols ont été isolés et identifiés à partir d'extrait méthanolique de fleurs d'*Urtica dioica* :

- Kaepférol-3-O-glucoside ;
- Kaepférol-3-O-rutinoside ;
- Quercetine-3-O-glucoside ;
- Quercetine-3-O-rutinoside ;
- Isorhamnétine-3-O-glucoside ;
- Isorhamnétine-3-O-rutinoside
- Isorhamnétine-3-O-néohespéridoside

On a décelés la présence d'acide chlorogénique et d'acide caféylmalique dans les fleurs femelles (AKBAY *et al.*, 2003).

1.3.5. Composition de fruit et de la graine

Les fruits murs renferment environ 30% d'huile grasse, constituée d'acides gras représentés principalement par l'acide linoléique ou oméga 6 (74-83%), avec en outre 0.1 % de δ -tocophérol (WICHTL et ANTON, 2003).

Les analyses de la fraction lipidique des graines d'*Urtica dioica* indiquent la présence d'une forte proportion d'acide gras insaturés, plus spécialement palmitique, et une faible quantité d'acide gras insaturés oméga -3 (YENER *et al.*, 2008).

Des polysaccharides formant des mucilages et des caroténoïdes sont aussi présents : β -carotène, lutéine, viola-xanthine, soit environ 30-80 μ g/g. L'huile obtenue par pression à froid est colorée en vert jaunâtre à vert par les caroténoïdes et par les produits de dégradation de la chlorophylle (WICHTL et ANTON, 2003).

L'huile essentielle d'*Urtica dioica* contient des esters (14,7%), des dérivés d'alcools (2%) et les cétones (38,5%) identifié comme le 2-méthyl-2- heptén-2-one, l'acétophénone et éthylcétone, et des traces de substances azotées, des phénols et des aldéhydes (ILIES *et al.*, 2012).

1.4. Activité biologique de l'*Urtica dioica*

1.4.1. Activités des parties aériennes

1.4.1.1. Activité anti-inflammatoire

1.4.1.1.1. Action sur le métabolisme de l'acide arachidonique

Un dommage tissulaire et la déformation membranaire qui l'accompagne, activent la phospholipase A2, qui coupe la liaison de l'acide arachidonique de son site de liaison des phospholipides membranaires. Il devient alors disponible à l'activité de la cyclooxygénase qui le transforme en prostaglandines, et à celle de la lipoxygénase (enzyme du métabolisme de l'acide arachidonique, molécule pro inflammatoire) qui aboutit à la formation de leucotriènes. Les prostaglandines et les leucotriènes sont des molécules pro-inflammatoires et ainsi elles provoquent l'inflammation, la douleur et la fièvre. L'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique résulte par un effet anti-inflammatoire (CAPASSO, 2003).

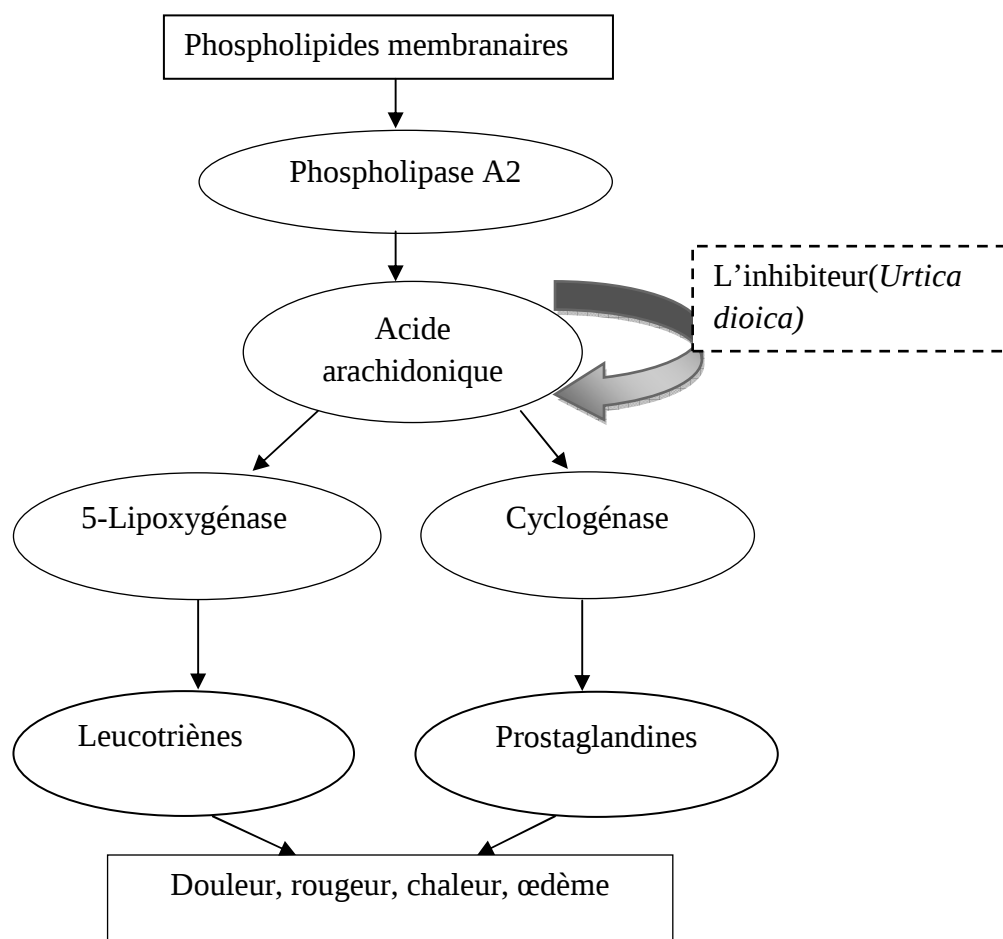


Figure 16: Métabolisme de l'acide arachidonique (CAPASSO *et al.*, 2003).

En 1996, OBERTREIS a étudié les effets antinflammatoires d'un extrait hydro alcoolique de feuilles d'*Urtica dioica*. Il a isolé un acide phénolique qui est l'acide caféylmalique et il a testé *in vitro*, sur des granulocytes basophiles de rat leucémique, les effets inhibiteurs de l'extrait et de cet acide sur la synthèse de l'acide arachidonique et ses métabolites. L'extrait a montré un effet inhibiteur partiel sur la 5-lipoxygénase. L'acide phénolique isolé a inhibé la synthèse du leucotriènes B4 et la synthèse des prostaglandines. *In vitro*, les dérivés de l'acide caféique et les extraits hydro alcooliques correspondants montrent une inhibition de la biosynthèse des enzymes du métabolisme arachidonique, avec un effet partiel sur la synthèse de la 5-lipoxygénase et du leucotriènes B4 (BARNES *et al.*, 2002 ; KAVALALI, 2003).

1.4.1.1.2 .Action sur les cytokines pro-inflammatoires

- **Action sur le facteur de nécrose tumorale et l'interleukine 1 β**

OBERTREIS a observé qu'un extrait hydro alcoolique de feuilles d'ortie réduisait d'une façon significative les concentrations du facteur de la nécrose tumorale (TNF) et de l'interleukine 1 β (IL-1 β), deux cytokines pro-inflammatoires dont la sécrétion dans le sang est stimulée par des lipopolysaccharides. Cette expérience a été réalisée sur du sang humain provenant de volontaires sains. Après 24 heures, la concentration du TNF avait diminué de 50,8 % et celle de l'IL-1 β de 99,7 %. TAUCHER, en 1996, a observé les mêmes résultats qu'OBERTREIS avec une préparation de feuilles de la grande ortie : réduction d'une façon significative du taux des cytokines : TNF et d'IL-1 β (BARNES *et al.*, 2002).

- **Action sur l'interleukine 2 et l'interféron γ**

Les lymphocytes T-helper 1 et 2 (Th 1 et Th 2) régulent les réponses immunitaires cellulaires et humorales par l'intermédiaire de cytokines. Les cellules Th 1 produisent l'interleukine 2 (IL-2) et l'interféron γ (IFN γ), cytokines pro-inflammatoires qui induisent une cascade de réactions inflammatoires. Les cellules Th 2 produisent l'interleukine 4 (IL-4), l'interleukine 5 (IL-5) et l'interleukine 10 (IL-10). Ces 2 voies de cytokines sont antagonistes et se régularisent mutuellement : les facteurs qui induisent les cytokines Th 1 inhibent la production des cytokines Th 2, et vice versa. Un extrait aqueux de feuilles d'ortie dioïque inhibe la production de l'IL-2 de 50% et celle de l'IFN γ de 74 % dans une culture de cellules. Par opposition, la production de l'IL-4 était stimulée. Les résultats supposent que l'extrait de feuilles d'ortie agit par la voie des cytokines des lymphocytes T et peut inhiber la cascade inflammatoire dans les maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde (BARNES *et al.*, 2002).

En effet, deux études réalisées en 2013 ont conclu que les résultats obtenus par l'extrait d'ortie dioïque sur la polyarthrite rhumatoïde serait due à la fois à l'acide caféique, aux flavonoïdes, aux polyphénols et à la forte teneur en silicium. Dans le cas d'inflammations articulaires ou de tendinites, le silicium aiderait l'élastine à se reconstituer pour assurer la souplesse au tissu et il favoriserait des éléments constitutifs (calcium, chondroïtine, glucosamine) pour reformer aux mieux l'articulation endommagée (DAR *et al.*, 2013 ; YANG *et al.*, 2013).

1.4.1.1.3. Activité antioxydantes

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

Les travaux de CENTINUS *et al.*, en 2005 ont démontré que les extraits de feuilles d'*Urtica dioica*, administrés en prétraitement, diminuent le stress oxydatif généré dans les muscles par la mise en place d'un garrot. Ceci suggère que la grande ortie est à l'origine d'une protection des cellules contre le stress oxydatif chez les rats. D'autre part, plusieurs études ont révélé que les antioxydants de la grande ortie tels que les β -carotènes potentialisent les réponses anti-nociceptives ainsi que la vitamine E qui a des effets bénéfiques sur l'amélioration des maladies rhumatismales, de la claudication intermittente ou de l'angor grâce à ses propriétés antioxydantes.

D'après ce qui précède, on peut dire que l'activité analgésique d'*Urtica dioica* peut être reliée à l'activité antioxydante (CENTIUS *et al.*, 2005). C'est pourquoi l'extrait aqueux d'ortie dioïque peut être utilisé comme une source naturelle d'antioxydants, en tant que complément alimentaire possible ou dans l'industrie pharmaceutique.

1.4.1.1.4. Action sur l'agrégation plaquettaire

Une étude a été entreprise en 2006 par DAHER *et al* pour tester les effets de différents extraits de feuilles d'*Urtica dioica* sur l'agrégation plaquettaire. L'étude a été réalisée avec des plaquettes de rats qui ont démontré qu'un extrait aqueux à inhiber l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine par la présence des flavonoïdes isolés des feuilles d'*Urtica dioica*. Les flavonoïdes ont également clairement inhibé l'agrégation plaquettaire induite par l'adénosine di phosphate (ADP), le collagène et l'épinéphrine. Il a été conclu que l'*Urtica dioica* possède une activité antiagrégante plaquettaire dans laquelle les flavonoïdes sont les composants principalement impliqués (LANGLADE, 2010).

Ces résultats confortent l'utilisation traditionnelle d'*Urtica dioica* dans le traitement et/ou la prévention des maladies cardiovasculaires (EL HAOUARI *et al.*, 2006 ; DAHER *et al.*, 2006).

Plusieurs études sur les animaux indiquent que les extraits d'*Urtica dioica* inhibent nettement l'agrégation plaquettaire et améliorent le profil lipidique par ces propriétés hypolipémiante et hypocholestérolémiante en diminuant le taux de LDL cholestérol, cholestérol total, de l'apolipoprotéines B plasmatique, ainsi qu'une diminution du ratio cholestérol LDL/HDL (DAHER *et al.*, 2006 ; ROMBI ET ROBERT, 2006).

1.4.2. Activité des racines

L'utilisation de la racine de la grande ortie pour le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP) a fait l'objet de recherches cliniques et pharmacologiques depuis 1950, particulièrement en Allemagne. L'HBP est une extension non-cancéreuse de la prostate et cette prolifération du tissu prostatique va venir exercer une pression contre l'urètre et la vessie, se traduisant souvent par une miction difficile. La testostérone, son métabolite la dihydrotestostérone (DHT) et les hormones oestrogènes sont couramment associées à cette pathologie de la prostate (DRAGHI, 2005).

Plusieurs mécanismes sont à l'origine d'effet bénéfique de l'*Urtica dioica* sur l'HBP

- **Interaction avec la protéine de transport des hormones sexuelles (SHBG)**

La protéine de transport des hormones sexuelles SHBG (SexHormonBinding Globulin) est une protéine plasmatique qui se lie aux hormones sexuelles (œstrogènes et androgènes) et régule ainsi leur fraction libre plasmatique. Elle possède aussi des sites de liaison pour les récepteurs membranaires situés dans le tissu prostatique et l'endomètre.

En 1997, SCHOTTNER a étudié la liaison des lignanes des racines d'ortie dioïque et leurs métabolites à la SHBG. Les résultats démontrent que les effets des extraits de racines d'*Urtica dioica* sur l'HBP peuvent être dus à leur teneur en lignanes qui peuvent influencer sur le taux plasmatique d'hormones stéroïdes libres en les déplaçant de leur liaison à la SHBG. De plus, les lignanes peuvent influencer sur l'interaction du récepteur prostatique avec la SHBG (SCHOTTNER *et al.*, 1997).

- **Inhibition de l'aromatase**

L'aromatase est une enzyme clé du métabolisme des stéroïdes: elle intervient dans la conversion de la testostérone en œstrogènes. Avec l'âge, le rapport androgènes/œstrogènes dans le sang et la prostate tend en faveur des œstrogènes. Donc, l'inhibition de l'aromatase conduit à une diminution des taux d'œstrogènes, et donc pourrait influencer sur la taille de la prostate (DRAGHI, 2005).

En 1995, une étude *in vitro* a été réalisée sur l'activité inhibitrice d'un extrait hydroalcoolique d'*Urtica dioica* vis-à-vis de l'aromatase. Une inhibition de l'aromatase a été mise en évidence, ce qui suggère que les fractions lipophiles sont responsables de cette action. La fraction heptane a été plus efficace que l'acide hydroxy-octadiénoïque, ce qui suggère que cet acide gras hydroxylé peut contribuer à l'effet thérapeutique global. Cependant les racines de la grande ortie contiennent seulement de faible quantité de ces composés et la pertinence clinique du principe actif inhibiteur de l'aromatase doit encore être définie (CHRUBASIK *et al.*, 2007).

- **Inhibition de l'élastase**

L'hypertrophie bénigne de la prostate s'accompagne très souvent d'une inflammation au cours de laquelle on observe une infiltration leucocytaire des tissus prostatiques. Ces leucocytes libèrent de nombreuses protéases parmi lesquelles l'élastase. L'élastase est une enzyme libérée par les granulocytes polynucléaires activés, qui migrent du sang vers les tissus durant le processus inflammatoire. Au cours de l'évolution de l'HBP, il y a dégénérescence des fibres élastiques, et cette perte d'élasticité est responsable des symptômes obstructifs. L'inhibition de l'activité protéolytique de l'élastase pourrait alors contribuer à l'amélioration de

ces symptômes (DRAGHI, 2005). Le dosage de cette enzyme dans le liquide séminale permet d'ailleurs de diagnostiquer l'inflammation silencieuse de l'appareil uro-génital de la prostate. En effet l'élastase est l'une des enzymes les plus actives (DIEDERICHS, 2005).

Des travaux sur l'élastase menés par KOCH et son équipe ont permis de découvrir l'activité inhibitrice de l'extrait hydroalcoolique d'*Urtica dioica* sur l'élastase (DIEDERICHS, 2005). Une autre étude a montré que c'est les lignanes et leurs métabolites extraits des racines d'ortie dioïque qui a inhibé cette activité (BOMBARDELLI *et al.*, 1997).

- **Effet sur la prolifération cellulaire**

En 1999, KONRAD a étudié les effets d'un extrait méthanolique de racines d'ortie dioïque sur l'activité proliférative de cellules prostatiques épithéliales et stromales humaines. Un effet antiprolifératif significatif a été observé seulement sur les cellules épithéliales durant sept jours, alors que la croissance des cellules du stroma resta inchangée (KONRAD *et al.*, 2000).

En 1994, WAGNER a démontré que les polysaccharides et l'UDA pouvaient bloquer la liaison du facteur de croissance épidermique EGF (Epidermal Growth Factor) sécrété par le tissu prostatique, à son récepteur avec suppression de la croissance et du métabolisme cellulaire (LICHIOUS et MUTH, 1997).

1.4.3. Autres activités d'*Urtica dioica*

1.4.3.1. Action antifongique

La croissance de plusieurs champignons pathogènes et saprophytes (*Borytrichum*, *Collectotrichum lindemuthianum*, *Phoma betae*, *Septoria nodorum*, *Trichoderma hamatum* et *Tricostema viride*) a été inhibée in vitro par un extrait de racines d'ortie dioïque via l'UDA qui potentialise l'activité antifongique des chitinases qui sont une classe omniprésente de protéines végétales (HADIZADEH *et al.*, 2009 ; MODARRESI-CHAHARDEHI *et al.*, 2012).

1.4.3.2. Action antivirale et antimicrobienne

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales. En 1987, VRIJSEN *et al.* ont noté une bonne protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthyl quercétine. En 1985, MUECSI et PRAGAI ont également montré une corrélation entre l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur divers virus de l'herpès, et leur capacité à augmenter les taux intracellulaires en adénosine mono phosphate cyclique (AMPC) dans des cellules infectées. En 1989, SPEDDING *et al.* ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le virus HIV responsable du syndrome d'immuno déficience acquise (SIDA). Ils ont démontré que les flavonoïdes sont de bons inhibiteurs de la reverse transcriptase. En 1993, les travaux de MAHMOOD *et al.* ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, la glycoprotéine gp120 en empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte. Ces métabolites seraient susceptibles d'inhiber l'intégrase rétrovirale du virus HIV qui assure l'intégration du génome viral à celui de la cellule hôte (FESSEN *et al.*, 1994).

Les extraits aqueux de la grande ortie quel que soit leur concentration, possèdent une activité antimicrobienne remarquable contre les bactéries à Gram positif et Gram négatif. Grâce à la présence de polyphénols, mais le mécanisme des effets antimicrobiens de ces derniers est sans doute très complexe et encore mal connu. Parmi les hypothèses avancées: l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes; la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne, la chélation de métaux tels que le fer et l'inhibition du métabolisme microbien (GULCIN *et al.*, 2003).

1.4.3.3. Action sur la glycémie

L'effet de baisse sur la glycémie de l'ortie dioïque comme plante médicinale a été rapportée dans des manuscrits qui datent du temps d'Avicenne. Récemment, d'autres études ont montré l'effet hypoglycémique de la grande ortie. Mais jusqu'à présent, le mécanisme n'a pas encore été expliqué.

Une étude a été réalisée en 2003 par FARZAMI *et al.*, sur des îlots de Langerhans exposés à plusieurs fractions d'extraits de feuilles d'*Urtica dioica*. Une des fractions provoqua une augmentation marquée de la sécrétion d'insuline. Et cette hausse d'insuline était accompagnée d'une diminution du taux de sucre. Par ailleurs, cette fraction active provoqua également une augmentation du taux d'insuline chez des rats normaux et diabétiques, ayant reçu une injection intra péritonéale d'extrait. On observa aussi une baisse de la glycémie. Les résultats montrent que l'effet de baisse de la glycémie est dû à une provocation de la sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans (FARZAMI *et al.*, 2003).

Une autre étude montra également que la grande ortie avait un effet anti hyperglycémiant significatif, et cet effet pouvait être provoqué en partie par la réduction de l'absorption intestinale du glucose (BNOUHAM *et al.*, 2010).

Néanmoins, d'autres études ont montré des résultats inverses: les extraits d'ortie dioïque avaient produit des effets hyperglycémiant dans le test de tolérance orale au glucose.

SWANSTON-FLATT (1989) étudia douze plantes utilisées dans le traitement traditionnel du diabète en expérimentant sur des souris diabétiques sans et avec administration de Streptozotocine. Il s'est avéré que l'*Urtica dioica* aggravait l'état diabétique des souris ayant reçu de la Streptozotocine (KAVALALI, 2003).

Conclusion

L'*Urtica dioica* qui appartient à la famille des urticaceae, cette famille regroupe des plantes médicinales, utilisées pour leurs constituants moléculaires, d'une part les métabolites primaires notamment les protéines qui présentent une teneur considérable en acides aminés essentiels, ainsi que les lipides et les glucides. Elle présente une richesse en minéraux et vitamines qui font d'elle une excellente plante nutritionnelle. D'autre part les métabolites secondaires, qui constituent une gamme extraordinaire de molécules très diversifiées, de structure et d'activités différentes, regroupant les composés phénolique, les flavonoïdes et les composés azotés. En revanche l'homme les utilise dans le domaine pharmacologiques et plusieurs applications médicinales.

Dans le domaine de la médecine, l'ortie dioïque mérite tout à fait sa place, elle constitue un remède naturel qui peut apporter une réelle amélioration dans certaines pathologies en présentant moins d'effets secondaires et toxiques que les traitements classiques. L'ensemble de ces vertus en phytothérapie, font d'*Urtica dioica* une panacée : fortifiantes, anti-inflammatoires, astringentes ou antihistaminiques, traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate qui a été l'objet de nombreuses études ; il en va de même pour son emploi pour la prise en charge états rhumatismaux

Dans les prochaines années, on pourrait voir de nouvelles indications apparaître pour l'*Urtica dioica*, par l'identification de ces métabolites secondaires ainsi que leurs mécanismes d'action sur l'organisme ; et donc de mieux révéler l'activité biologique et les molécules actives de la plante. Pour cela, la connaissance scientifique et méthodique de la composition chimique s'impose afin d'élucider le potentiel de ces ressources naturelles et principalement l'industrie pharmaceutique pour tester de manière plus poussée l'efficacité de cette plante et aussi pour apprécier l'innocuité des composants utiles.

Introduction

Parmi les objectifs de la biochimie alimentaires, la séparation et la quantification des différents constituants présents dans les aliments (protéines, lipides, glucides et vitamines). La séparation permet leur identification ultérieure (nature et fonction des constituants) et la quantification permet de déterminer leur teneur relative suivant le but recherché.

Au cours de notre stage pratique, nous avons effectué une évaluation physicochimique afin de s'assurer de la qualité de quelques produits alimentaires commercialisés et cela par le dosage de différents paramètres physicochimiques, à savoir, la vitamine C, l'indice d'iode, l'indice d'acidité, dosage des sucres réducteurs et des protéines ; et par des méthodes chromatographiques et électrophorétique.

Le contrôle des produits alimentaires commercialisés, permet d'évaluer la qualité, la stabilité et la consistance du produit en ce qui concerne ses caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques qui sont intimement liées à son origine (espèce, climat ...), à son processus de fabrication, ainsi que le mode de conservation impliqué.

Le stage a été réalisé au laboratoire pédagogique de biochimie, Hasnaoua II de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Il a été soutenu par le matériel et les méthodes ci-après indiqués.

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Matériel

2.1.1.1. Matière première

Les échantillons utilisés dans le cadre de cette étude sont de diverse nature :

- Les échantillons de jus : Ramy orange, et enrichi en vitamines, Candia et Candia lactée, N'gaous ;
- Les échantillons du lait : lait de vache, lait Candia, et le lait de sachet ;
- Les échantillons d'huiles : huile d'olive et huile de tournesol.

2.1.1.2. Appareillage

- Unité d'électrophorèse comprenant : la cuve d'électrophorèse, générateur de courant, plaque en verre, un espaceur, peigne ;
- Unité de chromatographie liquide à basse pression comprenant : une colonne chromatographique contenant le gel (de longueur de 20 cm), un détecteur, une pompe péristaltique, un collecteur et un enregistreur graphique ;
- Une balance de précision à 0,001(SARTORIUS) mg et balance électronique (Denver Instrument) ;
- Spectrophotomètre UV Visible (SCHIMADZU, Japon) ;
- pH mètre (Hanna-instruments) ;
- Lyophilisateur à plateau (BETA, Allemagne) ;
- Centrifugeuse, max 28000 * g (SIGMA) ;
- Bain marie (Mammert, Allemagne);
- Agitateurs de tubes ;
- Agitateur doux à plateaux ;
- Pompe sous vide pour le dégazage ;
- Vortex ;

- Sécheur de la verrerie ;
- Etuve ;
- Réfrigérateur.

2.1.1.3. Autres matériel

Barrots magnétiques, étiquettes, filtres, la barre magnétique, la coupelle, les emboues, les gants, papier absorbant, piécette, membrane de dialyse, spatule, poire, portoirs, pipette, micropipette, bavettes, plaques, film de couverture, papier aluminium.....

2.1.1.4. Produit chimiques et réactif

- Dosage des protéines : Les solutions tampons NaCl et albumine sérique bovine (BSA), réactif de Bradford ;
- Dosage de la vitamine C : 2,6dichlorophenol indophénol(DCPIP), bicarbonate de sodium(NaCO_3), acide ascorbique et acide acétique glaciale ;
- Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse : éthanol, potasse KOH, phénolphthaléine, thiosulfate de sodium($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) et lugol ;
- Dosage des glucides : le 3,5 dinitrosalicylique (DNS) ;
- Chromatographie de permeation tampon Tris- HCl 0,02 M, pH 8,4 et gel de sephacryl S200.
- Electrophorèse en conditions native et dissociante : gel d'acrylamide et de bisacrylamide, le tétra-méthyl éthylène diamine (TEMED), solution de persulfate d'ammonium, bleu de bromophenol, SDS, glycine et TCA ;
- Hydrolyse enzymatique des caséines lyophilisées du lait de vache : tampon Tris- HCl 0,8 M, pH 8,0 et enzyme la trypsine.

2.1.1.5. Verrerie

Béchers, burette, entonnoir, erlenmeyer, fiole, éprouvettes, seringue, fiole jaugée, pipette, tubes à essais....

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Méthodes physicochimique

2.1.2.1.1. Mesure de pH

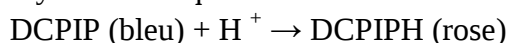
La valeur du pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre après immersion de son électrode dans l'échantillon à analyser.

2.1.2.1.2. Dosage de la vitamine C

Principe

Les méthodes de dosage de la vitamine C sont très variées et utilisent principalement ses propriétés réductrices. Le choix de la méthodologie dépend surtout de sa concentration et de la complexité du milieu dans lequel on la dose (GRAVILOVIC *et al.*, 1996).

La méthode la plus utilisé est celle du titrage volumétrique de la Vit C par le 2,6 dichlorophénol indophénol qui a pour particularité l'oxydation de la vitamine C en milieu acide (figure 17). Si la vitamine C, qui est un bon agent réducteur est présent, le colorant bleu qui vire au rose dans des conditions acides, est réduit en un composé incolore de l'acide ascorbique. Cette réaction est une réaction d'oxydo-réduction: la vitamine C est oxydée en acide déhydroascorbique et DCPIP est réduit au composé incolore DCPIPH₂.



Partie expérimentale

Dans ce titrage, lorsque tout l'acide ascorbique dans la solution a été utilisé, il n'y aura pas d'électrons disponibles pour réduire la DCPIPH et la solution reste rose en raison de la DCPIPH. Le point final est une couleur rose qui persiste pendant 10 secondes ou plus, s'il n'y a pas assez d'acide ascorbique pour réduire l'ensemble des DCPIPH.

Le protocole expérimental suivi est décrit en Annexe 01. La solution de 2-6-DPIP est étalonnée par l'emploi d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue. La réaction d'oxydation de la Vit C s'écrit :

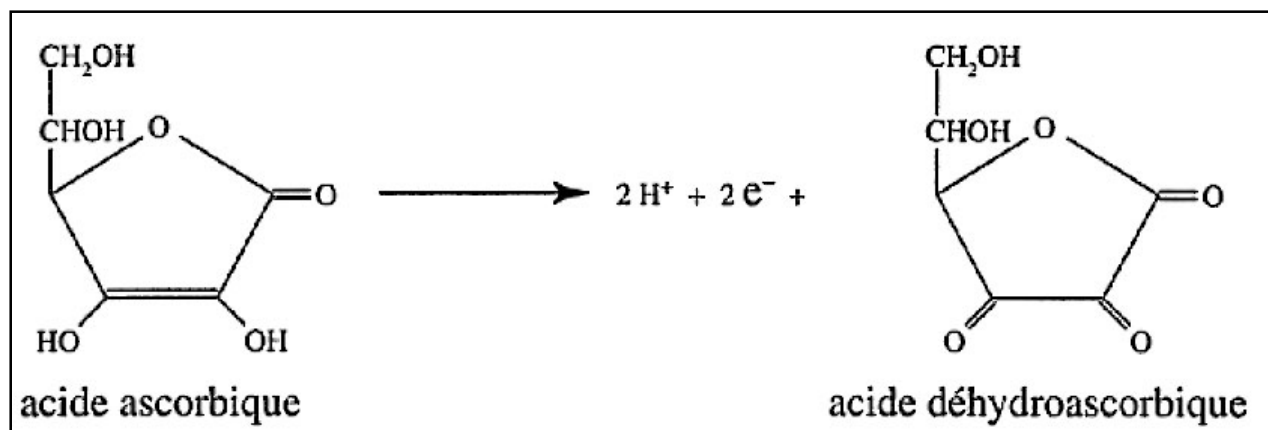


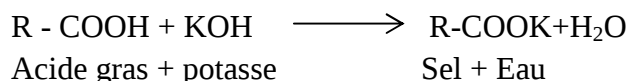
Figure 17 : Réaction de l'oxydation de la vitamine C (Guillaume, 2004).

2.1.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

2.1.2.1.3.1. Indice d'acidité d'une matière grasse

L'indice d'acide d'une matière grasse est le nombre de mg d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser les acides gras libres (AGL) contenus dans 1 g de matière grasse. Il mesure la quantité d'AGL présents dans un corps gras (KANDJI, 2001).

Il s'agit d'une dissolution de la matière grasse dans de l'éthanol chaud neutralisé, puis titrage des AGL présents au moyen d'une solution titrée de KOH en présence de phénolphthaléine comme indicateur (KANDJI, 2001). Le protocole expérimental est mentionné en annexe 02. L'équation de la réaction est la suivante:



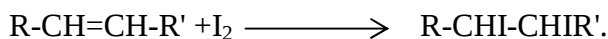
2.1.2.1.3.2. Indice d'iode d'une matière grasse

L'indice d'iode est le nombre de grammes d'iodes fixé par 100 g de matière grasse dans des conditions normalisées.

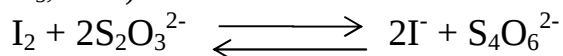
Une molécule d'iode se fixe sur une double liaison : l'indice d'iode est donc caractéristique de l'insaturation d'un AG (KANDJI, 2001)

Cet indice nous renseigne sur le nombre de doubles liaisons des chaînes hydrocarbonées des substances qui composent un corps gras, acide gras libres, lipides dont les triglycérides et celles de l'insaponifiable. L'indice d'iode et le degré d'insaturation varient dans le même sens. Le protocole expérimental est résumé en annexe 02.

L'iode se fixe sur les doubles liaisons des acides gras selon l'équation suivante:



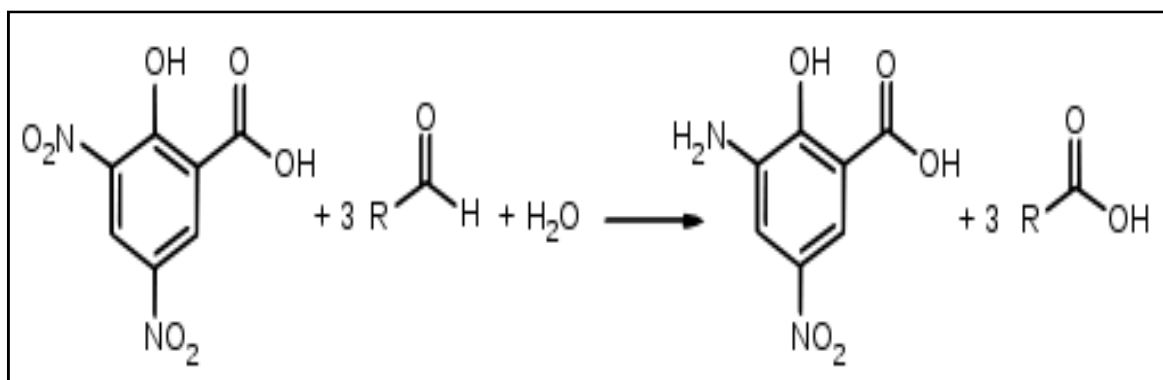
L'excès d'iode non fixé est titré par la solution réductrice de thiosulfate de sodium (Na_2SO_3 , 0.1N) selon la réaction suivante :



2.1.2.1.4. Dosage des sucres réducteurs

Principe

On utilise les propriétés réductrices du glucose. A chaud et en milieu alcalin, il y a réduction de l'acide 3,5-dinitrosalicylique ou DNS (aussi appelé acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque) qui joue le rôle d'oxydant, le glucose étant le réducteur. Le DNS jaune est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (figure 18) qui est rouge-orangé, dosable par colorimétrie à 530 nm. Les densités optiques (DO) obtenues permettent de déterminer les concentrations des échantillons analysés en se référant à une courbe d'étalonnage $DO = f([Glucose])$ (figure 19). Les conditions opératoires sont décrites en annexe 03.



Acide 3,5dinitrosalicylique

l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique

Figure 18: Réaction chimique du DNS sur lessucres réducteurs.

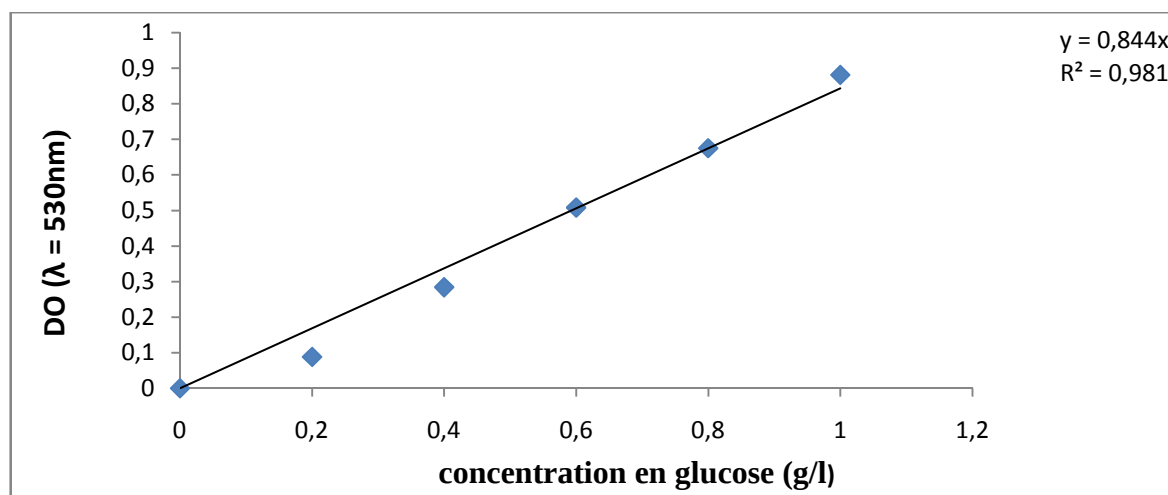


Figure 19 : Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme standard.

2.1.2.1.5. Dosage des protéines par la méthode de BRADFORD

BRADFORD *et al* (1976) ont développé une méthode basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250 (figure 20). Sous sa forme cationique libre, ce réactif absorbe la lumière à une longueur d'onde de 470nm. Lorsqu'il est mis en contact avec une solution protéique à doser, il s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du 470 nm au 595 nm. Cette adsorption se fait principalement par des liaisons ioniques avec les chaînes latérales des acides aminés basiques (arginine, histidine, et lysine) et des interactions hydrophobes (acides aminés hydrophobes). La technique de BRADFORD est rapide et très sensible (concentration de l'ordre de 2 µg/l). Les conditions opératoires sont décrites en annexe 04.

L'absorbance du rayonnement visible à 595nm est mesurée par un spectrophotomètre, et permet de doser indirectement la teneur en protéine de la solution à l'aide d'une courbe d'étalonnage en BSA(figure 20).

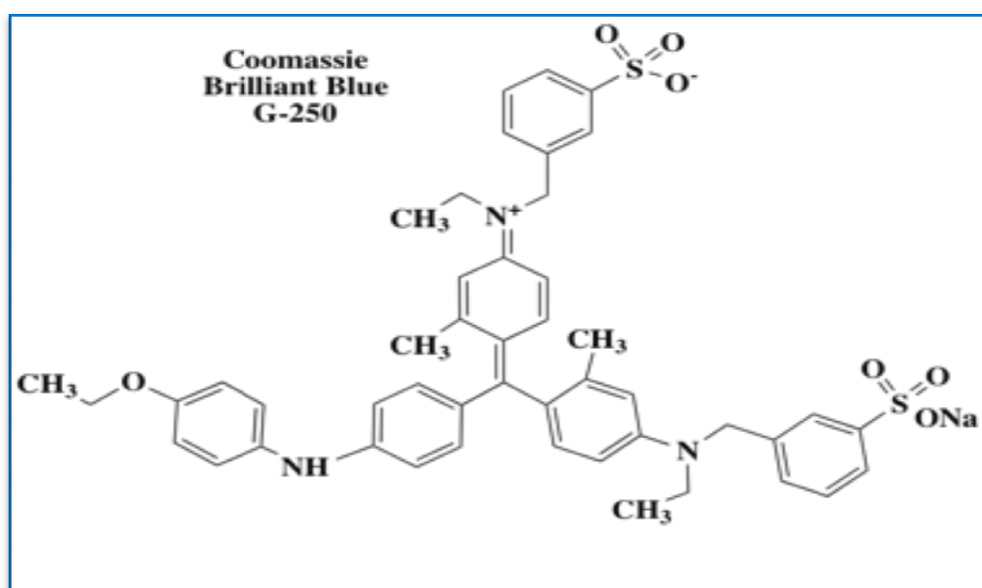


Figure 20 : Structure du bleu de coomasie (ANDREW *et al.*, 2014).

Mode opératoire :

- préparer la gamme étalon à partir d'une solution mère de BSA (0.1 mg/ml) (voir annexe 04) ;
- préparer des dilutions pour les différents échantillons ; lait de vache, lait Candia et lait de sachet ;
- pour les protéines totales on travaille avec des dilutions de 10^{-3} et pour les protéines sériques la dilution est de 10^{-2} ;
- prendre 2 ml de chaque dilution, ajouter 1 ml du réactif de BRADFORD ;
- laisser 5 minutes à température ambiante ;
- lire l'absorbance à 595 nm ;

- construire la courbe étalon : $DO = f([BSA])$ (figure 21) ;
- déterminer à partir de cette courbe les teneurs en protéines des échantillons.

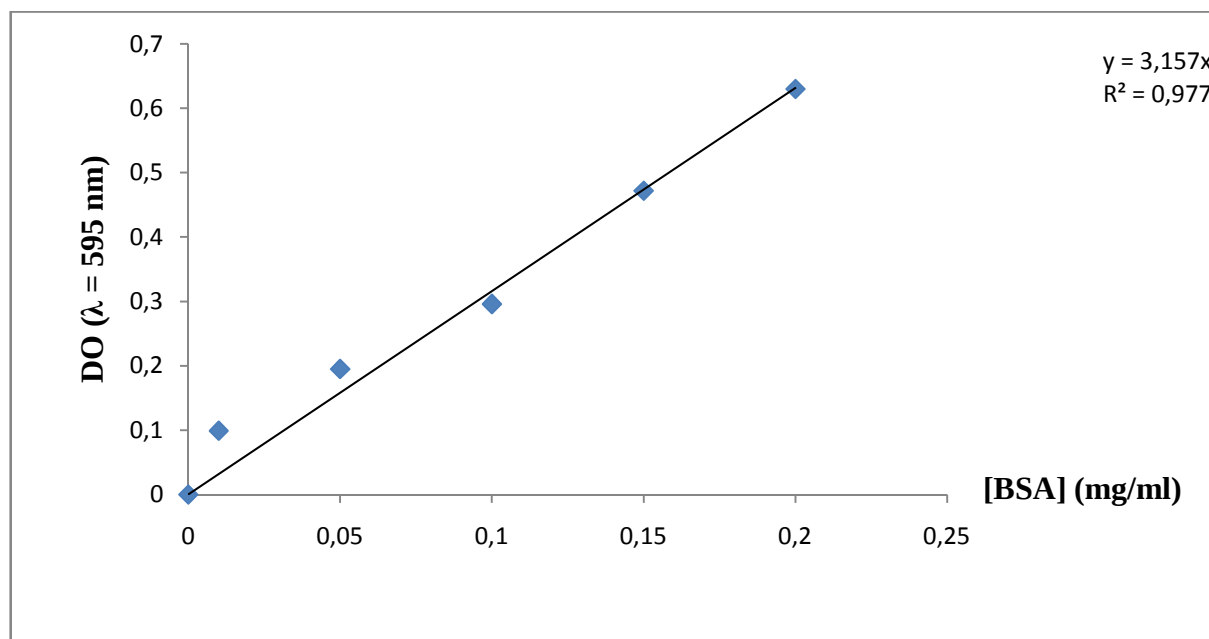


Figure 21 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de BRADFORD *et al* (1976), réalisée avec la BSA comme protéines de référence.

2.1.2.2. Méthodes de purification et d'identification

2.1.2.2.1. La dialyse des protéines sériques et des caséines du lait de vache

Principe

La dialyse est basée sur la diffusion des petites molécules (sels, glucides, minéraux ou autres) à travers une membrane semi-perméable qui possèdent une limite d'exclusion de l'ordre de 30 000 Da. Deux mécanismes entrent en jeu dans ce processus. Tout d'abord, les molécules diffusables vont traverser la membrane selon le gradient de concentration. Il y aura donc un déplacement net des molécules du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré. Chaque molécule en solution subit individuellement ce processus. L'autre mécanisme implique les charges électriques des molécules. En effet, le gradient électrique joue aussi un rôle. Ce gradient électrique résulte de l'ensemble des molécules chargées de part et d'autre de la membrane. Ce dernier facteur est cependant négligeable dans la dialyse et, en pratique, on ne tient compte que du gradient de concentration (GAUTHIER, 2007).

Les boudins des protéines sériques et des caséines sont immergés dans un récipient rempli d'eau distillée et sous agitation. L'eau de dialyse est changée toute les 24 h.

2.1.2.2.2. La lyophilisation

Principe

La lyophilisation consiste à la sublimation de solvant aqueux pour ne récupérer que les molécules résiduelles non volatiles, dont les protéines. La sublimation est une approche particulièrement utile puisqu'elle se fait à de basses températures où les protéines en solution sont stables (GAUTHIER, 2007).

La sublimation est le passage direct de l'état solide à l'état gazeux, elle se fait à une basse pression atmosphérique puis soumise à une très faible température comprise entre -30 et -50 °C. L'eau se sublimera tandis que les autres molécules non volatiles de la solution resteront sous forme solide. Celles-ci pourront être entreposées sous forme de poudre pour de longues périodes ou resolubilisées. Cette sublimation sera d'autant plus rapide que la surface de contact de la solution avec l'air sera grande.

2.1.2.2.3. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200

Principe

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée, les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires (figure 22) (GILLET, 2010).

Les conditions de la solution d'une protéine de purification sont essentielles dans le maintien de la stabilité et de la fonction des protéines. Les protéines doivent être conservées dans un environnement bien tamponné pour éviter les changements brusques de pH qui pourraient affecter de manière irréversible leur repliement, leur solubilité, et leur fonction. (RITCHIE, 2013).

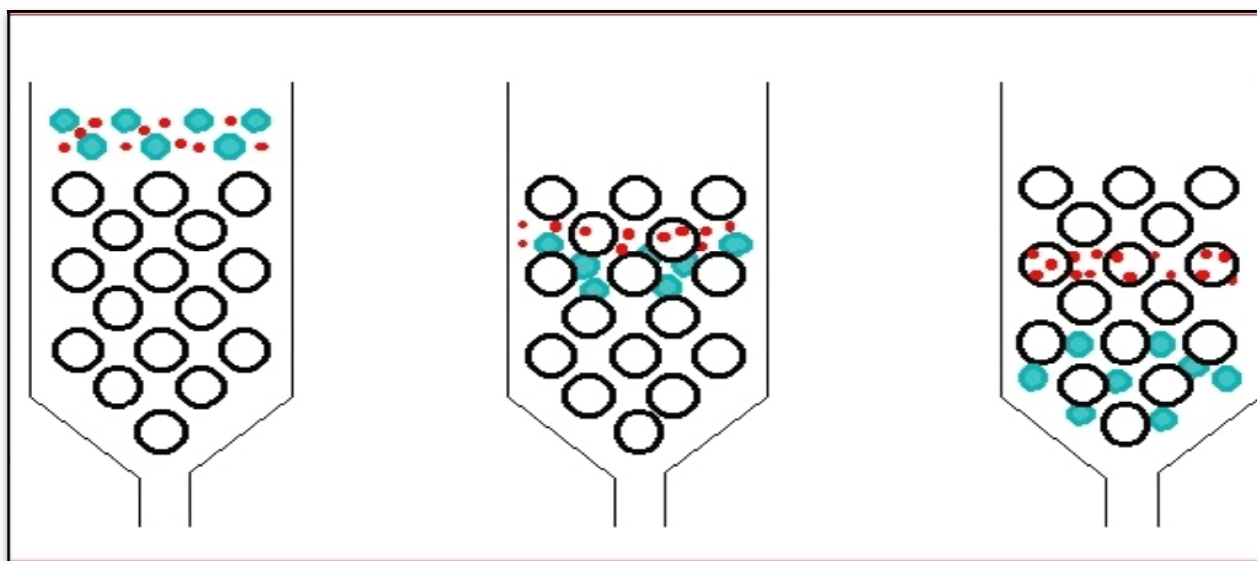


Figure 22 : Elution des protéines à travers le gel de Séphacryl S200.

Les protéines sériques seront fractionnées selon leur masse moléculaire en utilisant une phase stationnaire constituée de Séphacryl S200, réticulé pour former une matrice solide et stable d'où son adaptation à l'échelle industrielle (GILLET, 2010).

La séparation est effectuée sur une colonne de dimensions : 30 x 1cm. La phase stationnaire utilisée est le Séphacryl S200 (polyallyldextrane et N-N'-méthylène bisacrylamide) ; qui est un gel mixte composé d'acrylamide et d'un agent de pontage : le N-N'-méthylènebisacrylamide. Ce gel présente un taux de réticulation élevé et une grande résistance aux contraintes mécaniques. Le seuil de fractionnement de Séphacryl S200 est de

5000 à 250 000 Da. La phase mobile utilisée est une solution tampon composée de Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4.

Les protéines sériques lyophilisées du lait de vache (100 mg) sont solubilisées dans 5 ml de tampon de chromatographie Tris-HCl (0,02 M, pH 8,4). L'élution des protéines se fait par passage du tampon dans la colonne avec un débit constant de 28ml/h. L'absorbance de l'éluant est contrôlée à 280 nm.

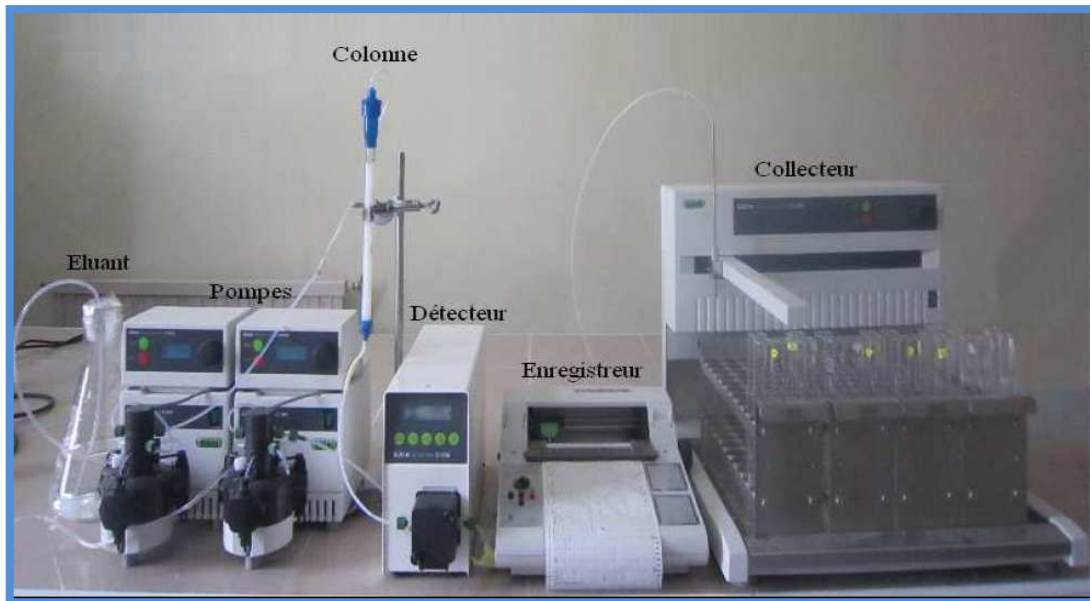


Figure 23 :Unité de chromatographie basse pression (LABAB UMMTO).

2.1.2.2.4. Hydrolyse enzymatique des protéines lyophilisées du lait de vache : les caséines et les protéines sériques par la trypsine

Principe

La trypsine (EC3.4.21.4) est une enzyme du suc pancréatique avec un poids moléculaire de 26 727 000 Da ; qui a pour rôle l'hydrolyser les protéines.

La trypsine appartient à la famille des protéases à sérine (serine I). Elle est caractérisée par la présence d'un site actif qui est une triade catalytique composé d'une sérine (Ser-195), une histidine (His-57) et une aspartate (Asp-102) (LEGAULT, 2005). Elle est active à sa température optimale entre 37 -40° C et à un pH de 7,6 à 7,8, permettant ainsi l'hydrolyse de la liaison peptidique du côté C-terminal de l'arginine et de la lysine.

Méthode

- dissoudre 0.8g de protéines lyophilisées dans 100 ml tampon Tris -HCl ;
- chauffage à 100 °C pendant 5min puis refroidir dans un bain d'eau froide ;
- ajouter 200µl d'une solution de glycérol 50% et quelques grains de bleu de bromophénol ;
- Préparer 5 tubes secs pour les deux échantillons (les caséines et les protéines sériques lyophilisées), on met 400µl du tampon d'échantillon SDS, 1ml du tampon Tris-HCl, pH 8,0 ;
- Préparation du milieu réactionnel : 0,04g de caséines lyophilisées et 0,04g de protéines sériques lyophilisées du lait de vache à part, dissous chacune dans 1ml du tampon Tris-HCl,

Partie expérimentale

bien homogénéiser et avant de mettre l'enzyme on prélève 200µl de ce milieu mis dans le premier tubes à t= 0' qui est le témoin ;

-on ajoute 0,4 ml de la trypsine, incuber dans le bain marie à température optimale pour l'activation d'enzyme à 40°C ;

-prélever 200 µl de chaque tubes des échantillons à des temps de 0', 15', 30', 45', 60' et 120' ;

-chauffage des tubes à 100 °C pendant 5 min afin d'arrêter la réaction ;

-pour contrôler le produit de l'hydrolyse, on effectue une électrophorèse PAGE-SDS pour les hydrolysats obtenus (figure 24).

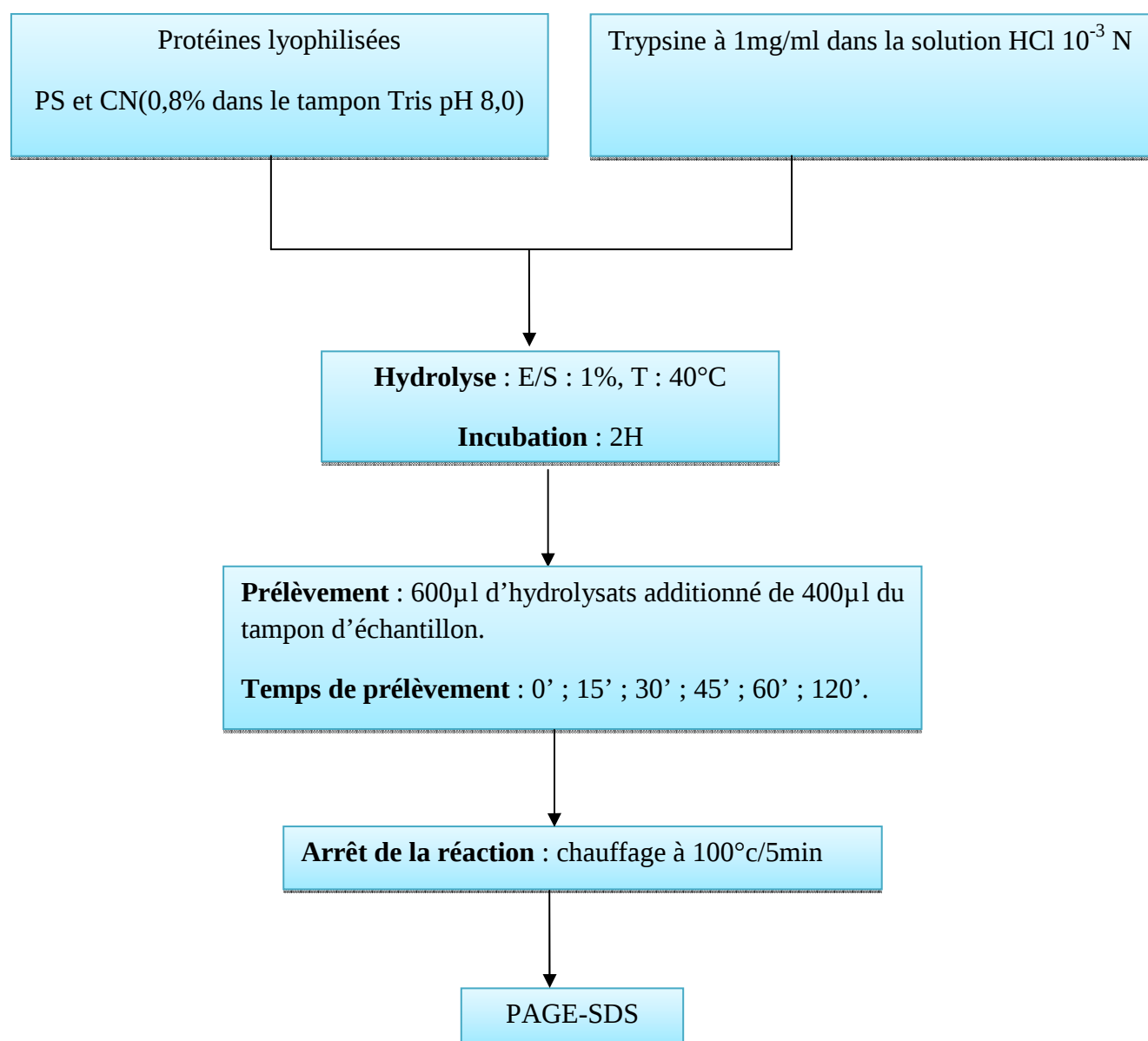


Figure 24 : Etapes suivies pour l'hydrolyse trypsique des protéines du lait de vache.

Partie expérimentale

L'échantillon est déposé à raison de 10 à 20 μl dans chaque puits, à l'aide d'une seringue, après avoir monté l'unité électrophorétique et remplir les cuves supérieur et inférieur de tampon d'électrode. L'unité est mise sous tension et voltage constants : 20mA, 250V, à la fin de la migration, le gel d'électrophorèse est révélé par le bleu de coomassie (ISSELNANE, 2014).

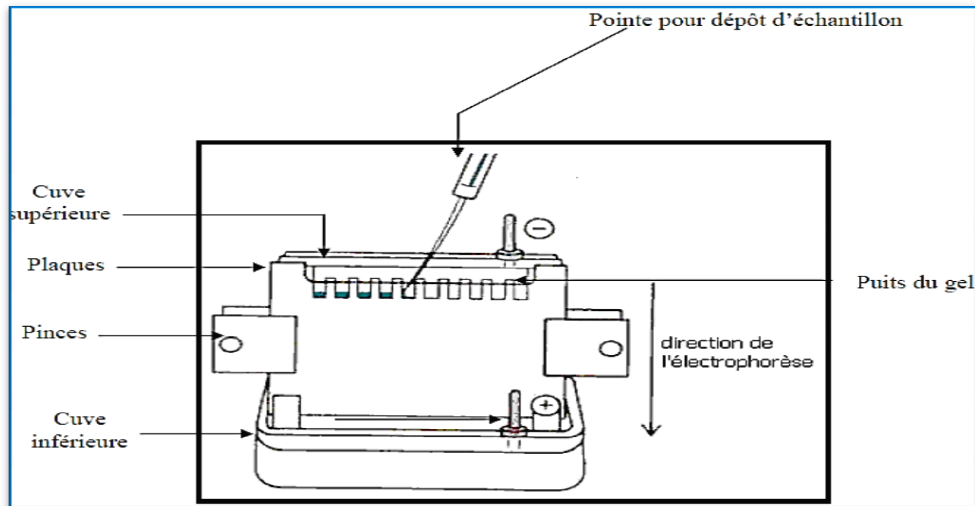


Figure 26: Dépôt des échantillons en électrophorèse.

2.1.2.3.1. Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native)

Principe

L'électrophorèse est une technique puissante et facile à utiliser, et particulièrement résolutive pour les protéines sériques du lait.

En se basant sur la méthode de HILLER (1976), nous avons utilisé un gel de polyacrylamide à $T=12\%$ et $C=2,7\%$. Le tampon de gel est composé de (Tris 0,75M, pH 8,9). Le tampon d'électrode est constitué de (Tris, 5mM ; glycine, 77mM ; pH 8,3). Les échantillons protéiques (protéines sériques) sont préparés à 2mg/ml dans une solution contenant le tampon de gel (1/10 V/V), de l'eau distillée (7/10 V/V) et du glycérol 10% (V/V).



Figure 27: Unité d'électrophorèse, A : générateur de courant ; B : cuve de migration

2.1.2.3.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

Principe

Ce type de séparation est basée sur un système biphasique, comprenant deux types de gel : un gel de concentration (T=4,8% et C=2,7%) en tampon Tris-HCl, pH 6,8 faiblement réticulé qui n'exerce aucun effet de tamisage moléculaire et tend plutôt à concentrer les échantillons et un gel de séparation (T=17% et C=2,7%) en tampon Tris-HCl pH 8,8, à travers lequel les protéines migrent selon leurs poids moléculaire (ANDREW *et al.*, 2014)

La PAGE SDS est une technique qui permet la séparation en conditions dénaturantes en raison de l'ajout de l'SDS. Le SDS [$(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+)$] est un détergent fort possédant une longue queue hydrocarbonée hydrophobe et une extrémité chargée négativement. Il interagit avec les protéines par sa portion hydrocarbonée en liant leurs régions hydrophobes. En se liant à la protéine, le SDS empêche son repliement et donc sa structure native est dénaturée (ANDREW *et al.*, 2014).

En présence de SDS, associer avec le 2-mercaptoéthanol (2-ME) qui est un agent réducteur assurant la rupture des ponts disulfures ; les protéines auront toutes une charge apparente négative, elles migreront donc toutes vers l'anode. Cela signifie que seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. Les protéines ayant un petit poids moléculaire, seront moins retenues dans les pores du gel de polyacrylamide et migreront donc plus loin que les grosses (ANDREW *et al.*, 2014).

2.1.2.4. Révélation des bandes de migration électrophorétiques

A la fin de la migration, le gel est démoulé pour subir les opérations successives suivantes :

Fixation : réalisée par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (p/v) pendant 45min ;

Coloration : le gel est immergé pendant 1h dans une solution de coloration contenant du bleu de comassie 0.5 % (P/V) dissous dans une solution constituée du mélange (eau distillée, méthanol et TCA 2% (P/V)) ;

Décoloration : réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau distillée, méthanol et de l'acide acétique).

Partie expérimentale

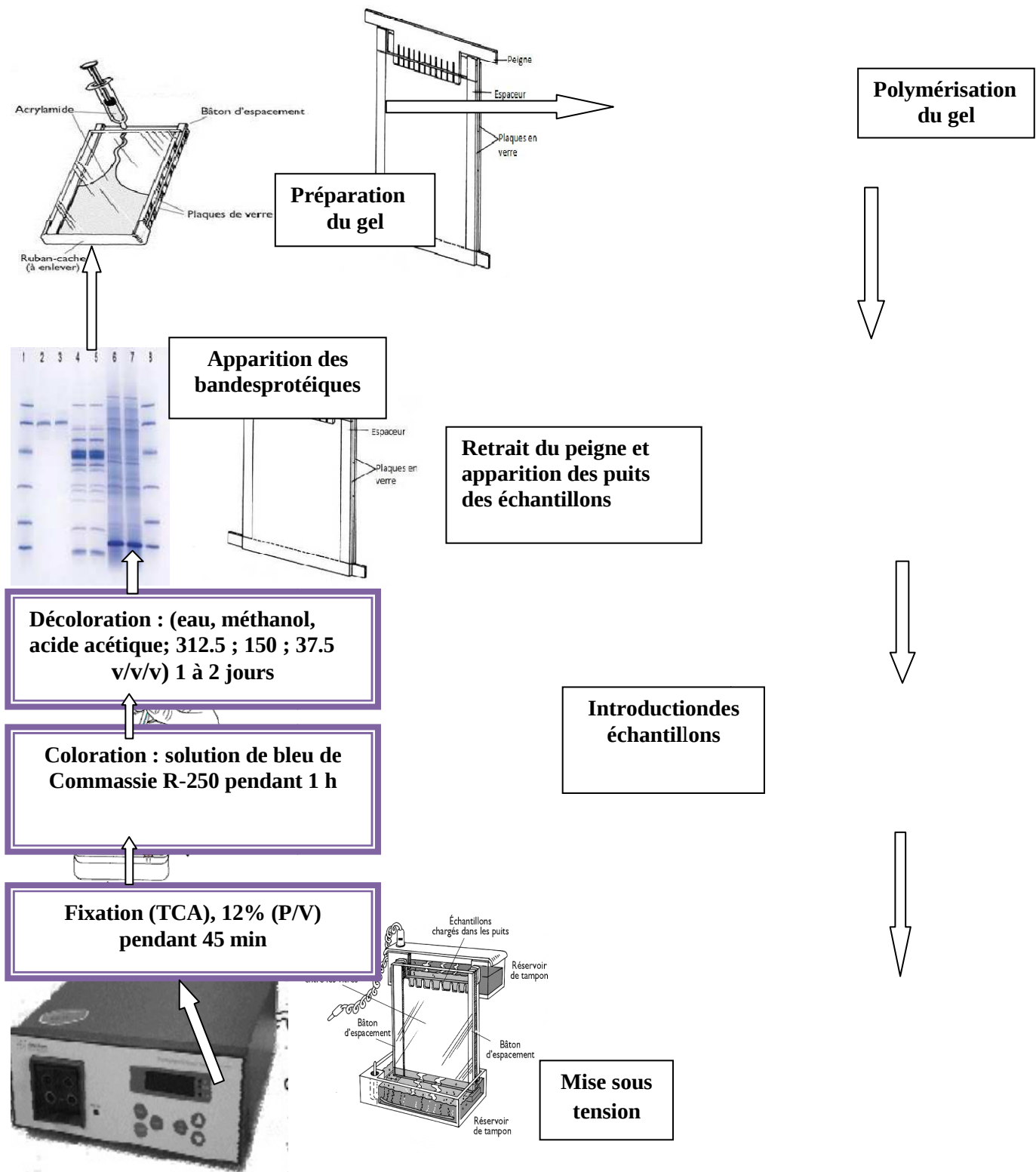


Figure 28 : Principales étapes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour la séparation des protéines.

2.2.1 Qualité physicochimique

2.2.1.1. Mesure de pH

La mesure du pH dans les jus est très importante, car elle détermine la conservabilité et les caractéristiques organoleptiques des produits. Le pH mesuré pour le jus Candia lacté est de 4.18 cette valeur est plus élevée par rapport au jus Candia orange avec un pH de 3. Le pH de ce dernier est plus faible par rapport aux autres jus commercialisés, avec des pH respectifs de 3,16 ; 3,29 ; 3,36 pour le jus Ramy orange, Ramy enrichi en vitamine et Ngaous (tableau IV).

2.2.1.2. Teneur en vitamine C dans un jus de fruit

La vitamine C, de formule brute $C_6H_8O_6$, est le nom communément donné à l'acide ascorbique. Sa masse molaire est $M=176$ g/mol. La présence de vitamine C dans les aliments est indiquée par le code E 300.

La vitamine C est facilement oxydée par de nombreux oxydants, en particulier le dioxygène de l'air. C'est pourquoi la vitamine C est un antioxygène : réagissant avec le dioxygène, elle empêche celui-ci d'oxyder les constituants des aliments et protège ainsi les corps gras contre le rancissement, limite l'oxydation des ions nitrite en ions nitrate.

Le dosage de la vitamine C est effectué par titrimétrie, l'acide ascorbique s'oxyde avec le DCPIP qui est étalonné à l'aide d'une solution d'acide ascorbique pure de concentration connue ($C_1=0.4$ g/l). Le tableau IV résume les résultats obtenus.

Tableau IV : Les pH et les teneurs en vitamine C (g/l) dans différents jus de fruits commercialisés.

Types d'échantillons Paramètre Mesuré	Jus candia lacté	Jus ramy orange	Jus ramy enrichi en vitamine	Jus Ngaous	Jus candia orange
pH mesuré	4.18	3.16	3.29	3.36	3
Teneur en vitamine C (g/l)	0.34	0.32	0.28	0.24	0.38

D'après les résultats obtenus on remarque que la teneur en vitamine C est variable dans les jus commercialisés. Le jus Candia orange présente une teneur en vitamine C de 0,38 g/l, cette valeur est élevée par rapport à celle du jus Candia lacté qui est de 0.34 g/l. Cela signifie que cette vitamine est mieux conservée en milieu acide (pH bas) ces résultats rejoignent ceux obtenus par TREMOLIERES *et al* (1984), qui ont établis que plus un aliment est acide, plus la vitamine C est préservée de l'oxydation et mieux elle s'y conserve, ou bien cela pourrait être dû aussi à la présence de conservateurs dans ce dernier qui a permis de protéger et ralentir

l'oxydation de la vitamine C ; mais cette dernière est très sensible à la chaleur et son taux dans le jus peut diminuer d'une façon très importante après pasteurisation.

La composition intrinsèque des jus commercialisés est plus complexe par rapport à celle des jus frais. Les jus Ramy orange, Ramy enrichi en vitamine et Ngaous sont moins riches en vitamine C avec des teneurs de 0,32 ; 0,28 et 0,24 g/l respectivement. La variation de la quantité en vitamine C pourrait être liée à plusieurs types d'adjonction de cette dernière, soit par la restauration (compensation), l'enrichissement (E300 et ses dérivés) et la préservation.

La teneur en acide ascorbique peut être influencée par plusieurs facteurs tels que la variété du fruit, le stade de maturation, les conditions de culture, le temps, la température de stockage et la méthode d'extraction.

La perte en vitamine C est liée à la perméabilité de l'emballage vis-à-vis de l'oxygène et de la lumière. Donc la nature de l'emballage est très importante pour les jus de fruit. A température ambiante, la pénétration de 1 mg d'oxygène correspond à la perte de 11 mg de la Vit C d'un jus. BOURGEOIS (2003) a noté qu'une perte en cette vitamine dans un jus d'orange maintenu à 20°C et conditionné dans deux types d'emballages en verre avec une perte de 21 % et 31 % pour le jus emballer avec Brick pack. KLIMCZAK *et al* (2007) ont indiqué que l'augmentation de la température par 10 °C cause une diminution importante de la vitamine C, ils ont aussi constaté une diminution de 21 % (18°C), 31 % (28°C) et 81 % (38°C) de l'acide ascorbique dans un jus d'orange après stockage à une durée de six mois.

Les méthodes titrimétriques sont basées sur les propriétés réductrices de l'acide L-ascorbique. Le réactif de titrage le plus utilisé est le dichloro-2,6 phénol indophénol. Ce réactif est un oxydant idéal en raison de sa sélectivité pour l'acide ascorbique qui s'oxyde facilement en sa présence. D'autres réactifs ont été proposés, mais ils ne présentent pas une meilleure spécificité que le DCPIP, il s'agit par exemple de l'iode et le dihaloiodate de potassium (SKURDIN, 1980).

2.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acide d'une matière grasse

2.2.1.3.1. Indice d'acidité

L'indice d'acidité est un indicateur qui permet d'évaluer la durée de conservation d'une huile et son altération, consécutive à de mauvais traitements ou à une mauvaise conservation (WOLFF, 1991).

Dans notre étude, l'huile d'olive a un indice d'acide plus élevé qui est de l'ordre de 1,44 mg de KOH/ 1g d'huile par rapport à l'huile de tournesol qui a un indice de 0,7mg de KOH/ 1g d'huile. Ce résultat indique leur teneur différente en acide gras libres (tableau V).

Selon KANDJI (2001), une huile de bonne qualité doit présenter une acidité nulle ou faible, on ne saurait tolérer que celle-ci dépasse 2g % en acide oléique, correspondant à un indice d'acide d'environ 4 mg d'hydroxyde de potassium /g.

L'huile d'olive est une huile qui est riche en acide gras mono insaturés avec 81 % d'acide oléique tandis que l'huile de tournesol a un contenu particulièrement élevé en acide gras polyinsaturés (soit plus de 65 % de ses lipides totaux), dont près de la totalité est sous forme d'acide linoléique (CHARLES et DEN, 1997).

L'analyse des résultats indique que l'huile de tournesol et d'olive possèdent des indices d'acidité faible ce qui les fait des huiles consommables et de bonne qualité rejoignant ce qui

est indiqué par KANDJI en 2001. Cependant, une meilleure matière grasse est celle qui est moins acide et qui contient moins d'acides gras saturés.

2.2.1.3.2. L'indice d'iode

L'indice diode permet de renseigner sur le degré d'insaturation globale des huiles. L'huile d'olive et de tournesol ont révélés des indices d'iode très faible, de 4,57 et 4,06 respectivement (tableau V) ces derniers ne sont pas compatibles avec les normes fixé par le codex alimentarius (2013) et qui doivent être comprise entre 75 – 94 d'I/100g pour l'huile d'olive et de 118- 141 d'I/100g pour l'huile de tournesol. Les résultats obtenus dans notre étude pourraient être expliqués par l'hydrolyse des triglycérides.

L'indice d'iode de ces huiles diminue au cours de la conservation. Cette diminution est probablement due à une oxydation (CRAPISTE *et al.*, 1999) ou à une décomposition progressive des acides gras insaturés. Ou bien l'hydrogénation des acides gras insaturés par la fixation des molécules d'hydrogènes sur les doubles liaisons.

Tableau V : Indice d'iode et d'acidité de l'huile d'olive et de tournesol.

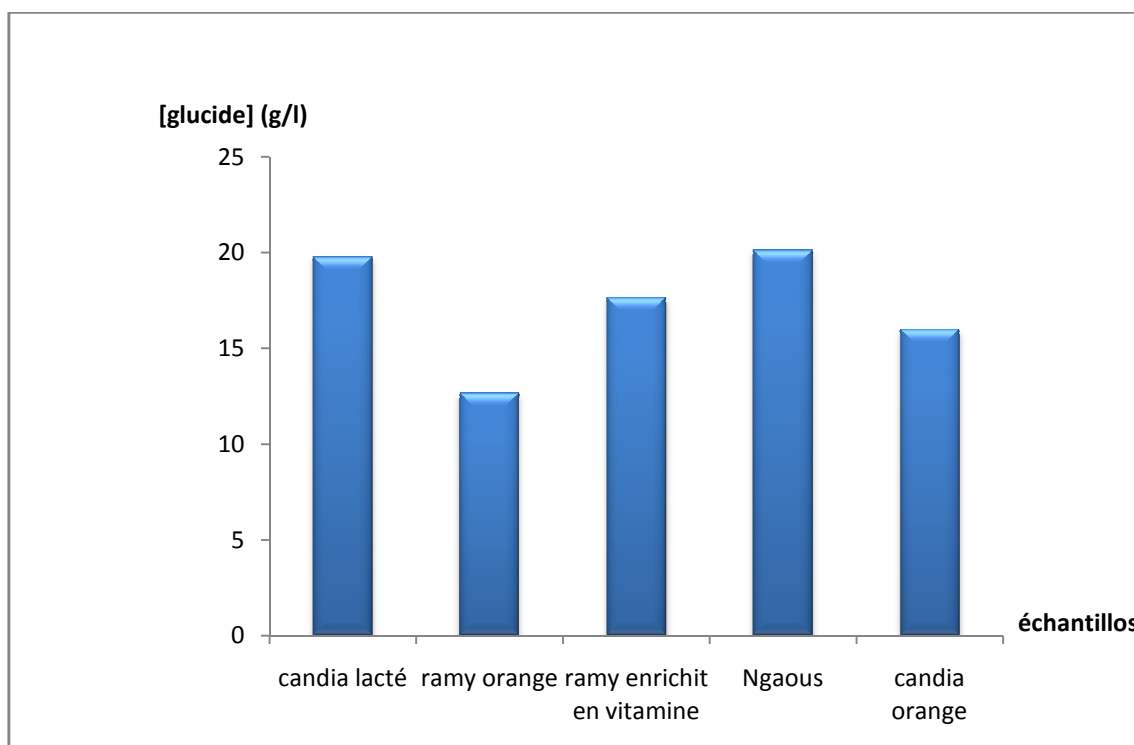
Types d'échantillons paramètres mesuré	Huile d'olive	Huile de tournesol
L'indice d'acidité mg de KOH/g de matière grasse	1.44	0.71
L'indice d'iode g d'iode /100g de matière grasse	4.57	4.06

2.2.1.4. Teneur en glucides dans un jus de fruit méthode utilisant le DNS

La teneur en sucres réducteurs est présentée par le fructose et le glucose. Au regard de l'histogramme (figure 33), nous constatons que les différents jus représentent des concentrations variables en sucres réducteurs. Les jus Ngaous et Candia lacté ont révélé les concentrations les plus élevées qui sont de 20,13 et de 19,8 respectivement. Par contre le jus Ramy a révélé la concentration la plus faible qui est de 12,67 g/l.

La qualité d'un jus de fruit dépend en premier lieu de la qualité de la matière première, car certaines variétés sont aptes a données de bon jus, donc la maturité doit être suffisante (CHEFTEL, 1982). En effet lors de la maturité des fruits le taux de sucres augmente (MOUFIDA et MARZOUK, 2003).

Les résultats obtenus ne répandent pas aux normes AFNOR (1986) indiquées pour la concentration des jus en sucres réducteurs, elles doivent être comprises dans l'intervalle 40-100 g/l.



2.2.1.5. Teneur en protéines

Les protéines du lactosérum constituent la fraction soluble des protéines du lait. Elles représentent 15 à 28% des protéines du lait de vache et 17% des matières azotées (DEBRY, 2001).

THAPON(2005) définit les protéines du lactosérum comme des protéines d'excellente valeur nutritionnelle, riches en acides aminés soufrés, en lysine et tryptophane. Elles ont de remarquables propriétés fonctionnelles mais sont sensibles à la dénaturation thermique.

La concentration en protéines sériques du lait de vache obtenue dans notre étude est de 4g/l (tableau VI), cette concentration est proche à celle trouvée par ROLLERI *et al* (1956) qui varie entre 5,5 – 6,5 g/l, soit la même valeur obtenue par BELHADI (2010) qui est de 5.5 g/l. En ce qui concerne le lait Candia et lait de sachet les deux échantillons ont révélé des concentrations faibles par rapport au lait de vache qui sont de 3,4 et 3,2 respectivement, cela peut être expliqué par les pertes en protéines lors de l'élaboration.

La valeur obtenue concernant les protéines totale du lait de vache est de l'ordre de 35g/l cette concentration est relativement la même obtenue par BELHADI (2010) et par ALIAS *et al* (2008) qui est de 34 g/l. Selon REMEUF *et al* (1985) la quantité en protéines trouvée est de 32 g/l. La teneur en protéines dans le lait dépend selon POUGHEON et GOURSAUD (2001) du génotype de la femelle laitière (race, espèce), de l'âge, la saison, le stade de lactation et l'alimentation.

Comparativement au lait de vache, les laits commercialisés, Candia et lait de sachet ont révélés des concentrations relativement faibles et qui sont de 29 et 27 g/l respectivement, cela peut être expliqué par une dénaturation des protéines lors de traitement thermique au cours de processus de production.

Tableau VI : Concentration en protéines totales et protéines sériques des échantillons dosés par la méthode de BRADFORD *et al.*

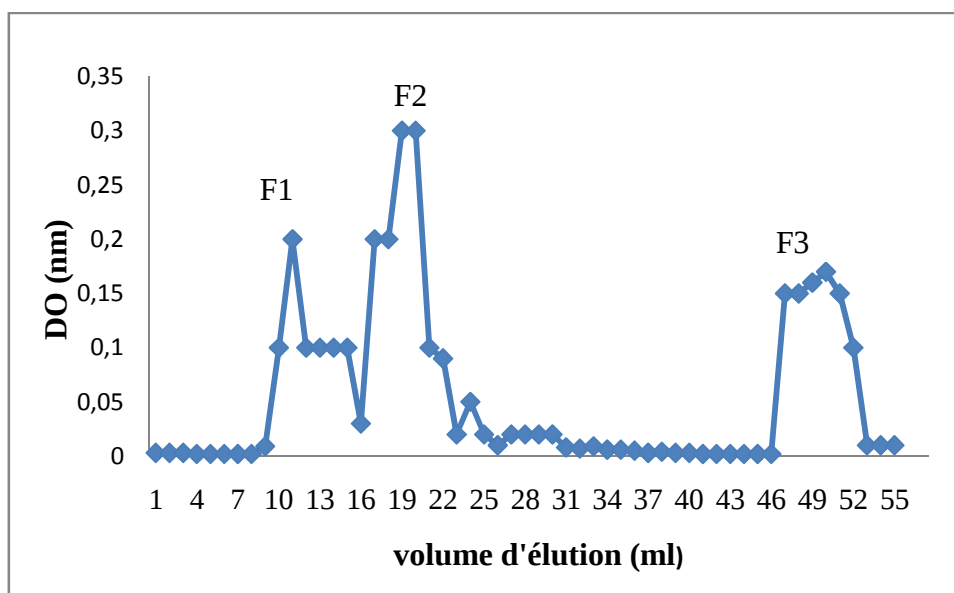
Echantillons types de protéines	Lait de vache	Lait Candia	Lait de sachet
Protéines totales (g/l)	35	29	27
Protéines sériques (g/l)	4	3.4	3.2

2.2.2. Méthodes chromatographiques

2.2.2.1. Purification des protéines par chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200

Les méthodes chromatographiques sont très indiquées pour l'isolement et purification des protéines. Au cours de notre étude, nous avons essayé de fractionner les protéines sériques du lait de vache, en utilisant la chromatographie de perméation sur Séphacryl S200. Après séparation, les protéines ont été éluées comme indiqué dans le chromatogramme (figure 31) caractérisé par l'apparition de trois pics d'absorption, d'intensité et de volume différent, notés F1, F2 et F3. Ces dernières ont été contrôlées par une PAGE native.

Le débit utilisé est de 28ml/h. l'élution du bleu de dextran a donné un volume mort $V_0 = 7\text{ml}$.



2.2.3. Méthodes électrophorétiques

2.2.3.1. Isolement et caractérisation électrophorétiques des protéines sériques du lait de vache en PAGE-native

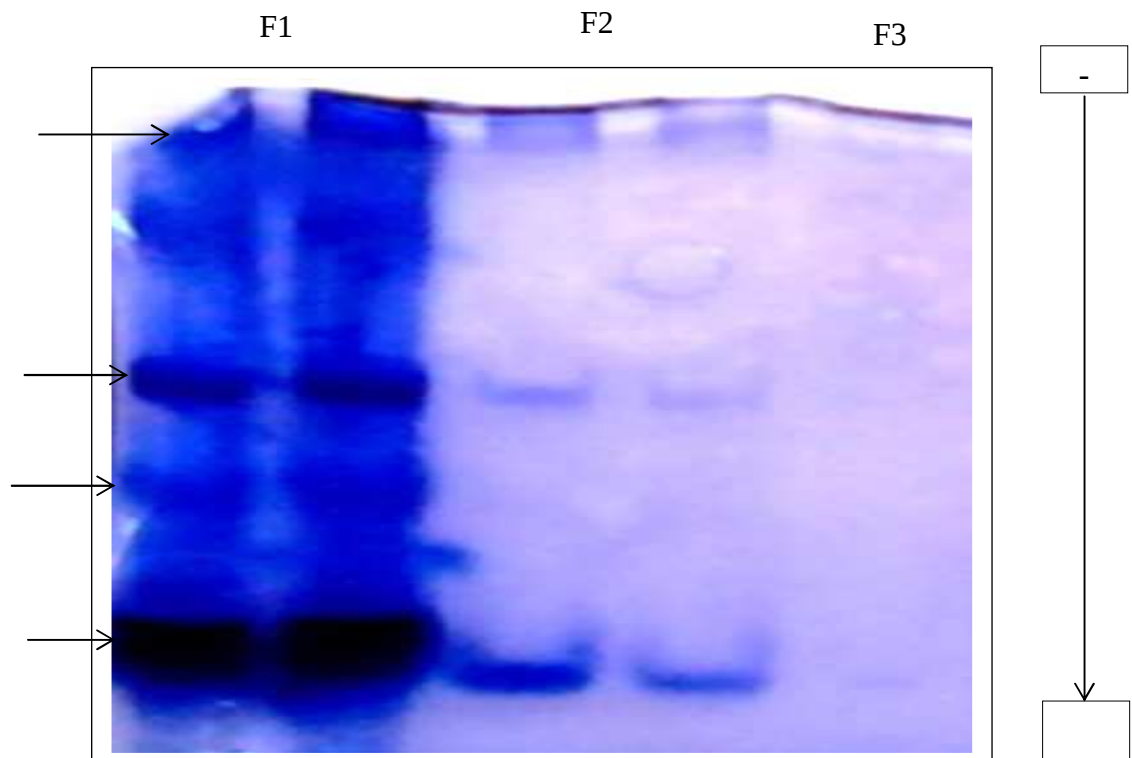
L'électrophorèse en PAGE-native permet de garder les protéines dans leur état natif, ce qui fait de la PAGE-native une technique résolutive et bien adaptée à la séparation des protéines sériques du lait bovin (MATI, 1992). Les molécules sont séparées selon leurs poids moléculaire ainsi que leur charge (WITTIG *et al.*, 2007) et apparaissent sous forme de bande de migration variant par leur position et leur intensité.

Le profil électrophorétiques mentionner dans la figure (33), a révélé la migration de différentes fractions récupérées par la chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200.

Les protéines sériques du lait de vache dans ces conditions, migrent en quatre bandes correspondant dans l'ordre croissant de leur mobilité électrophorétiques aux immunoglobulines (Ig = 250 000Da), le sérum albumine bovine (BSA = 64 000Da), l'alpha-lactalbumine (α -La = 18 000Da) et à la fin de migration la bêta-lactoglobuline (β -Lg = 16 000Da).

Les Ig sont ceux qui se déplacent le moins sur le gel (mobilité très faible), vue leur PM très élevé qui ne leur permet pas de migrer plus loin, alors que la β -Lg a le niveau de migration le plus loin. Elle représente la principale protéine du lactosérum du lait (bovin, ovin et caprin) avec un taux de 55 % des protéines sériques du lait de vache (DEBRY, 2001). Alors que l' α -lactalbumine est la protéine du lactosérum du lait des camélidés (CANTISANI *et al.*, 1990), des rongeurs (VILOTTE, 1992) et du lait de l'homme (BRIGNON *et al.*, 1990).

La fraction F1 récupérée a révélé quatre bandes de protéines représentant ainsi les protéines majeures du lait. Par contre la F2 n'a révélé que la migration de trois bandes très fines et beaucoup moins intenses : les Ig, la BSA et β -Lg, pour ce qui concerne la fraction F3 récupéré lors de l'élution, le profil électrophorétiques n'a donné aucune bande cela pourrait être dû à la faible concentration en protéines ou bien on a récupéré les impuretés.



2.2.3.2. Isolement et caractérisation électrophorétiques des caséines et protéines sériques lyophilisées du lait de vache en PAGE-SDS

Nous avons suivi la cinétique de la trypsine par électrophorèse en conditions dénaturantes (PAGE-SDS). On a obtenu des hydrolysats à différents temps d'incubation notés en minutes comme suit : T'0, T'15, T'30, T'45, T'60 et T'120.

En présence de 2-mercaptoéthanol comme agent réducteur, c'est possible de séparer les protéines sériques et les caséines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cet agent agit en dénaturant les protéines par destruction de leur structures tridimensionnelle natives, on rompant les liaisons hydrogènes et les ponts disulfures ce qui permet de réduire les interactions entre les différentes sous unités.

Durant l'hydrolyse, les enzymes clivent les liens peptidiques, libérant ainsi des peptides dont la taille et les propriétés sont très différentes de celles de la protéine initiale (ROUFIK, 2005).

L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-SDS pour les protéines sériques a révélé l'existence de bandes sombres et intenses au niveau de l'échantillon témoin (TN) et à T'0 correspondant à l' α -Lac, la β -Lg et la BSA.

On remarque que pour les échantillons à T'15' et T'30' les trois protéines résistent à l'action de l'enzyme. A partir de T'45' d'incubation, la BSA est hydrolysée en deux polypeptides qui apparaissent en deux bandes bien séparées. La bande correspondante à la β -Lg devient plus fine ce qui traduit son hydrolyse.

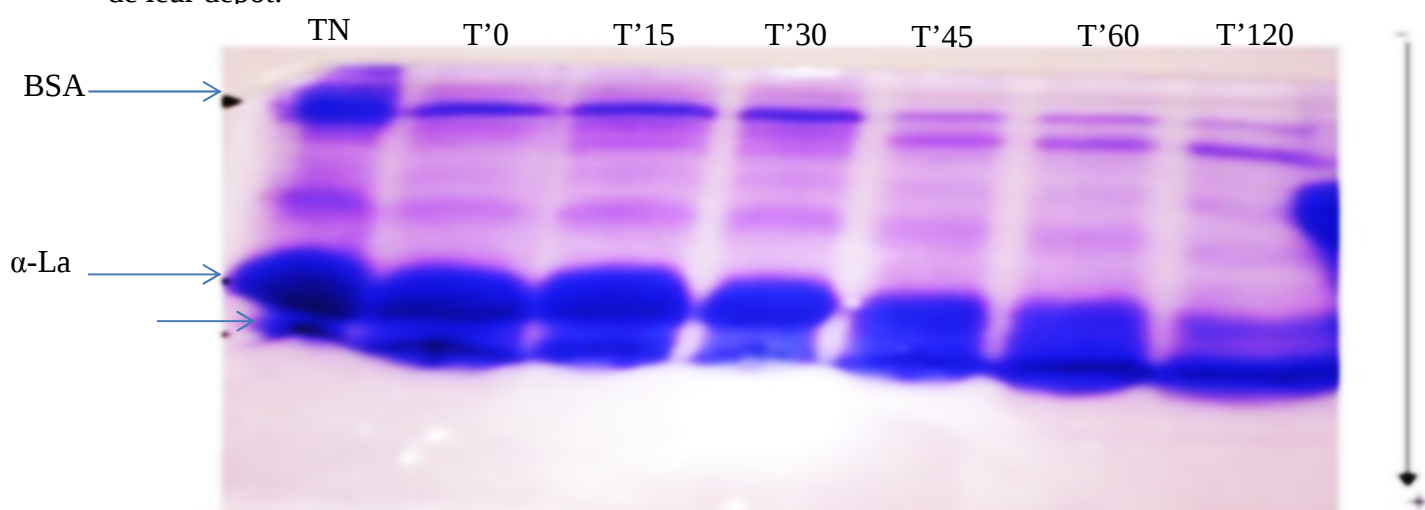
Partie expérimentale

La α -La semble être résistante à l'action de la trypsine même après 120 minutes d'incubation, puisque la bande correspondante reste de la même intensité. Ceci pourrait être dû à la structure globulaire compacte de la protéine qui rend le site de coupure de la trypsine inaccessible.

La β -Lg est plus sensible par rapport à α -La, du fait de sa structure globulaire moins compacte. Le site de coupure par la trypsine est de ce fait plus accessible (LUNG *et al*, 1991).

La bande correspondante à l'Ig n'est pas apparue au niveau des différents puits du fait qu'on n'a pas donné le temps nécessaire pour que cette grosse protéine puisse migrer.

L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-SDS pour les caséines n'a pas été révélé, cela pourrait être dû soit au gel utilisé ; il y a eu des contaminations lors de son coulage, ou bien lors de sa polymérisation ou encore à la contamination des échantillons lors de leur dépôt.



Conclusion

L'évaluation des paramètres physicochimiques des produits alimentaires constitue une étape importante pour le contrôle de la qualité de ces derniers. Si la description des techniques les plus divers laisse bien évidemment un choix étoffé, elle permet néanmoins d'accroître les chances de mener à bien une évaluation de la qualité.

D'après les résultats obtenus, les paramètres physicochimiques des jus de fruits, varient d'un jus à un autre selon la composition chimique des fruits. L'analyse des résultats, montre que la teneur en vitamine C est plus abondante dans les échantillons des jus Candia et Candia lacté avec 0,38 et 0,34 g/l respectivement.

L'indice d'acidité de l'huile d'olive et de tournesol est très faible ce qui se qui signifie que ce sont des huiles de bonne qualité. Par contre ces dernières se caractérisent par des indice d'iode très faible qui peut être expliqué par une oxydation ou à une décomposition progressive des acides gras insaturés

D'après l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'indice d'acide des huiles est en fonction de plusieurs facteurs tels que la nature de l'huile, l'origine géographique, le climat, la culture, la méthode d'extraction et d'analyse, le raffinage et le stockage.

Le glucose et le fructose sont les principaux sucres réducteurs présents dans les jus. Les glucides sont importants car ils sont responsables de la saveur du jus et influent sur sa consistance et ses propriétés rhéologique. La quantité la plus élevée en sucre réducteurs obtenu pour les différents jus est celle du jus Ngaous avec 20.13 g/l.

Concernant la quantité en protéines déterminés par la méthode de BRADFORD (1976) de différents échantillons analysés. Le lait de vache présente une concentration élevée de 35 g/l en protéines totales et 4 g/l en protéines sériques.

A côté des dosages physicochimiques qui figurent parmi les méthodes les plus répandues, d'autres méthodes prennent l'ampleur, comme les méthodes chromatographiques et électrophorétiques qui constituent d'autres stratégies pour la mise en œuvre d'un protocole de contrôle.

Le fractionnement des protéines sériques du lait de vache par la chromatographie de perméation sur gel de séphacryl S200, à révéler l'isolement de 3 pics F1, F2 et F3. Puis un contrôle électrophorétique a été réalisé en PAGE-native ce dernier à montre une migration des protéines sériques dans l'ordre décroissant : l'Ig, BSA, α -La et β -Lg.

Le contrôle électrophorétique en PAGE-SDS des hydrolysats des protéines sériques obtenues suite à une hydrolyse enzymatique par la trypsine à révéler la dégradation de ces dernières dans le temps en peptides, ces protéines résistent différemment à l'hydrolyse enzymatique. Toute fois les essais en PAGE-SDS pour l'identification des caséines demeurent perfectibles et des optimisations complémentaires sont à réaliser pour avoir des profils discriminant assez résolutifs, ce qui nécessite le recours à d'autres techniques plus performantes et résolutive citant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplé à une spectrométrie de masse.

Les méthodes d'analyses classiques permettent de définir la composition d'un produit alimentaire pour élaborer une stratégie d'analyse et de contrôle appropriée selon le produit en présence.

Le contrôle de la qualité d'un produit alimentaire offre la garantie de répondre à cinq critères fondamentaux, il s'agit de la sécurité, soit les critères sanitaires et de salubrité, la santé, soit l'aspect nutritionnel et de non toxicité, la satisfaction, le service, enfin la standardisation.

Références bibliographiques

AFIF CHAOUCHE Th. (2015). Étude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydantes de quelques plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou ; Thèse de doctorat en biologie ; Université ABOU BEKR Belkaid Tlemcen ; Algérie.

AKBAY P., BASARAN A., UNDEGER U. et BASARAN N. (2003). In vitro immunomodulatory activite of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. Phytoterapy research : PTR, 17 (1), 34-37.

ANDREW B., NOWAKOWSKI, WILLIAM J., WOBIG et DAVID H. (2014). Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Metallomics*, 6(5), 1068–1078.

APOLINARIO, A., DE LIMA DAMASCENO.B, DE MACEDO BELTRAO N., PESSOA A., CONVERTI A., et DA SILVA J. (2014). Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology, *Carbohydrate Polymers*, Vol 101.

BARNES J., ANDERSON L-A., PHILLIPSON J. et DAVID J(2002). Herbal Medicines : a guide for health care professionnals. 2^{ème} Ed., Pharmaceutical Press, Londres.

BELHADI N. (2010). Effet des facteurs d'élevage sur la production et la qualité du lait de vache en régions montagneuses, mémoire de Magister en agronomie ; Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou ; Algérie.

BENSALAMA A., (2015). Substances d'origine végétale ; Thèse de doctorat ; Université Mohamed Khider ; Biskra.

BENGUERBA A., (2008). Etude phytochimique et de la phase botanique de l'espèce *inulacrithnoides* L. Mémoire de magistère ; Université de Constantine ; Algérie.

BERTRAND B.(2002). Les secrets de l'ortie. Le Compagnon Végétal ,7^{ème} Ed., Terran.

BERTRAND B. (2008). Les secrets de l'ortie. Le Compagnon Végétal ,10^{ème} Ed ., Terran.

BERTRAND B. (2010). Les secrets de l'ortie. Le Compagnon Végétal, vol 1., Ed Terran.

BILLOTTE B., DIGOUT C., NORET J., PIERRE J. et QUIGNARD S. (2014). La Multi Valorisation de l'Ortie.

BOMBARDELLI E et MORAZZONI P. (1997). *Urtica dioica* L. *Fitoterapia*, 68 (5), 387-340.

BOUDJENAH-HAROON S. (2012). Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillottes de dromadaires. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques ; Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou ; Algerie.

BOULLAR B. (2001). Dictionnaire : plantes médicinales du monde, réalités et croyances, Ed ESTEM, Paris, 541-542.

BOURGEOIS C. (2003). Les vitamines dans les industries agro-alimentaires. Technique et document, Paris.

BNOUHAM M ., MERHFOUR F-Z., ZIYYAT A., AZIZ M., LEGSSYER A. et MEKHFI H.(2010).Antidiabetic effect of some medicinal plants of oriental Morocco in neonatal non-insulin-depended diabetes Mellitus rats. Humans and experimental toxicology, 29 (10), 865-871.

BNOUHAM M ., MERHFOUR F-Z., ZIYYAT A. LEGSSYER A et MEKHFI H.(2003). Antihyperglycemic activity of the Aqueous extract of *Urtica dioica*. Fitoterapia, 74(7), 677-681.

BRADFORD M. M (1976).Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of Proteins binding. Analytical Biochemical, 72, 248-254.

BRIGNON G., CHTOUROU A. et RIBADEAU-DUMAS B. (1985).Does β -lactoglobulin occur in human milk. Journal of Dairy Science, 55, 249-254.

BORDJAH A. (2011). Analyse physicochimique et microbiologique du lait UHT demi-écrémé ; Brevet de Technicien Supérieur BTS en contrôle de qualité dans les industries agroalimentaires ; Institut national spécialité de la formation professionnelle Cherif HADDADI Sétif ; Algérie.

BOURY M. (1960). Science et pêche : bulletin d'information. Samaceta, N°88, Paris.

BRUNETON, J. (1993). Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Technique et documentation, Paris, p915.

BRUNETON J. (1999). Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. Tee & Doc, 3^{ème} Ed., Cachan médicales Internationales, Paris.

CANTISANI A., NAPOLITANO L., GIUFFRIDA M .et CONTI A. (1990).Direct identification and characterization of llama whey Proteins by microsequencing after western blotting. Journal of Biochemical and biophysical, 21,227-236.

CAPASSO F. (2003). Phytoterapy : a quick reference to herbal medicine. Springer, Berlin.

CAZAU-BAYRET N. (2013). Prise en charge des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie ; Thèse de docteur en pharmacie ; Université Paul SABATIER Toulouse ; France.

CAZIN H. (1997). Traité pratique et raisonné des plantes médicinales indigènes. 3^{ème} Ed., de Envol, Paris.

CENTINUS E., KILINC M., INANCE F., KURUTAS E-B. et BUZKAN N. (2005). The role of *Urtica dioica* (urticaceae) in the prevention of oxidative stress caused by tourniquet application in rats. The Tohoku journal of experimental medecine, 205(3), 215-212.

CHARLES A. et DEN G. (1997). Abrégé de Biochimie alimentaire. 4^{ème} Ed., Masson, Paris, 225-232.

CHEFTEL J. C. et LORIENT D.(1982). Aspect technologique : les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Lait*, 62, 435-483.

CHRUBASIK J-E., BASIL D., WAGNER H. et CHRUBASIK S. (2007). A comprehensive review on the stinging Nettle effect and efficacy profiles part II. Urticaceae Radix, phytomedicine .International journal of phytoterapy and phytopharmacology, 14(7), 568-579.

CODEX ALIMENTARIUS. (2013). Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, comités du codex sur les graisses et les huiles. Viale delle Terme di Caracalla, 00153. Rome, Italie.

COLLIN J-C., KOEKELARE A., ROLLET-REPECAUD O. et DELACROIX-BUCHET A. (1991). Dosage des caséines du lait de vache par électrophorèse et par chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC R) : comparaison des résultats. *Le Lait*, 71 (3), 339-350.

COWAN M. (1999). Plant product antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4), 725-731.

CRAPISTE G. H., BREVEDAN M. et CARELLI A. (1999). Oxidation of sunflower oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (12), 1437-1443.

DAHER C-F., KARMEN G. et BAROODY G-M. (2006). Effect of *Urtica dioica* extract. Intake upon Blood lipid profile in the rats. *Fitoterapia*, 77(3), 183-188.

DAR S., AHMAD F-A., GANAI A-R., YOUSUF M-U-H., BALKHI T-M. et SHAMA P. (2013). Pharmacological and toxicological of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical Biology*, 51(2), 170-180.

DEBRY G. (2001). Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 21 p566 .

DELAHAYE J. (2015). Utilisations de l'ortie-*Urtica dioica* L. ; Thèse de docteur en pharmacie ; Université ROUEN et UFR de médecine et de pharmacie ROUEN ; France.

DIEDRICHS A. (2005). La phytothérapie dans le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate. Etude de quatre plantes : *Epilobium Sp*, *Pygeum africanum H*, *Serenoa repens B*, et *Urtica dioica L*. Université Louis pasteur. Strasbourg.

DJAHRA A-B. (2015). Cours phytochimie. Université El oued.

DRAGHI F. (2005). L'ortie dioïque (*Urtica dioica L.*) ; étude bibliographique ; Thèse du docteur en pharmacie ; Université Henry POINCARÉ NANCY 1 ; Paris.

EGITO A-S., GIRARDET J-M., MICLO L and GAILLARD J-L. (2001). Highly sensitive periodic acid/schiff detection of bovine milk glycoproteins electotransferred after nondenaturing electrophoresis, urea electrophoresis and isoelectric focusing. Lait, 81, 775-785.

EL HOUARI M., BOUHAM M., BENDADOU M., AZIZ M., ZIYYAT A., LEGSSYER A. et MEKHFI H. (2006).Inhibition of rat platelet aggregation by *Urtica dioica* leaves extract. Phytoterapy research : PTR, 20(7), 568-572.

ERIKSEN E-K.,HALVOR H., JENSEN E., AABOE R., TOVE G-D., JACOBSEN M. and VEGARUD G-E. (2010).Differents digestion of caprin whey Proteins by humain and porcine gastro-intestinal enzymes B. Journal of nutrition,22, 1-8.

EVANS W.C., TREASE (2002). Pharmacognosy. 15ème édition. Elsevier édition.

FARZAMI B., AHMADVAND D., VARDASBI S ., MAJIN F-J. et KHAGHNI SH .(2003). Induction of insulin secretion by a component *Urtica dioica* leave extract in perfused islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and Stretozotocine diabetic rats. Journal of ethnopharmacology, 89(1), 47-53.

FESSEN M. R., POMMIER Y., LETEURTRE F., HIROGUCHI S., YUNG J., KOHN K. W. (1994). Inhibition of HIV-1 integrase by flavones, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and related compounds. Biochemistry Pharmacology, 48(3), 595-608.

FLEURENTIN J. (2008). Plantes médicinales : traditions et thérapeutique, Ouest France, Nantes, 104-105.

FLETCHER N. (2007). Guides nature, reconnaitre la nature comestible et savoureuse sans peine. Ed Nathan, 26-27.

GANZERA M., PIEREDER D., STURM S., ERAELMEIER C. et STUPPNER H. (2005).*Urtica dioica agglutinin* : separation, identification and quantification of individual isolectines by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry electrophoresis, 26, 1724-1731.

GARFIN D. (2003). Gel electrophoresis of proteins, Essential cellbiology, (1), 197-268.

GRAVRILOVIC M, MAGINOT M-J., SCHWARTZ-GAVRILOVIC C. et WALLACH J. (1996). Manipulation d'analyse biochimique. Biosciences et techniques. Doin éditeurs-Paris.

GAUTHIER D. (2007). Dialyse. Introduction aux techniques utilisées in biochimie, 1-3.

GILLET S. (2010). La chromatographie et l'électrophorèse. Les techniques de purification des protéines. 164-211.

GIULIA C., MASCOLO N., ANGELO A., et CAPASSO F. (1999), Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 65 (4):337-353.

GUIGNARD L. (2000), Abrège botanique, 9^{ème} Ed. 204.

GUILLAUME D et CHARROUF Z. (2005). Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*). Cahier agriculture, 14(6), 509-513.

GULÇIN I., IFRAN O., OKTAY O. et BUYUKOKUROGLU M-E. (2003). Antioxydant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of Nettle (*Urtica dioica L.*). Journal of ethnopharmacology, 90(2), 205-215.

HADIZADEH I., PIEVASTEGAN B. et KOLAH M. (2009). Antifungal activity of Nettle (*Urtica dioica L.*), colocynth (*Citrullus colocynthis L. Schrad*), oleander (*Nerium Oleander L*) and konar (*Ziziphus Spina christi L.*). Extracts on plants pathogenic fungi. Pakistan. Journal of biological sciences : PJBS, 12(1), 58-63.

HARBORNE A. J. (1998). Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. 3^{ème} Ed Chapman & Hall. p. 320. London.

HILLIER R-M. (1976). The quantitative measurement of whey Proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Dairy Research, 43, 259-265.

ILIES D., TUDOR I. et RADULESCU V. (2012). Composition chimique de l'huile essentielle d'*Urtica dioica*, chimie des composés naturels 3 (48), 574-913.

ISSELNANE S. (2014). Caractérisation chromatographique et électrophorèse de l'extrait coagulant issu de caillettes de dromadaires adultes ; Mémoire de Magister en Biochimie appliquée aux bioindustries ; Université Mouloud MAMMERI Tizi Ouzou ; Algérie.

JEAN L. (2006). Biochimie des protéines .Polytech SITA, 1, 1-48.

JULIES A., CHRISTIN M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects and safety. Annual Review of Nutrition, 22, 19-44.

KANDJI N. A. (2001). Etude de la composition chimique et de la qualité d'huiles végétales consommées au Senegal, thèse Doctorat, université ChiekhAntaDiop de DAKAR, Senegal..

KAVALALI G. (2003). The genus *Urtica*. Medicinal and aromatic plants CRC, Ed Press.

KINGSBURY EDWARD T .and GAUNT STANLEY N. (1967). Heterogeneity in whey Proteins of mare milk. Journal of Dairy science, 60(2) ,274-277.

KONRAD L, MULLER H-H., LENZ C ., LAUBINGER H., AUMILLER G. et LICHIOUS J-J. (2000).Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging Nettle root (*Urtica dioica*) extract. Planta Med, 66,44-47.

KRAUS R., SPITELLER G. (1991). Terpene diols and terpene diol glucosides from roots of *Urtica dioica* Phytochemistry, 30 (4), 1203-1206.

KRIEF S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaires et observation de l'alimentation de chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda .activités biologique et étude chimique de plantes consommées ; Thèse de doctorat en écologie et chimie des substances naturelles ; Université CHATENAY- MALABRRY ; France.

KURESH A., YODIM A., JEREMY P. E., SPENCER., HANGEN S., RICE-EVANS C. (2002). Dietary flavonoid as potential neuroprotectants. Biological Chemistry, 383, 503-519.

LAEMMLI U-K et FAVER H. (1973). Maturation of the head bacteriophage T4.I. DNA packing évents. J. of mol. Biology, 80, 575-599.

LANGLADE V. (2010). L'Ortie dioïque, *Urtica dioica* L., étude bibliographique en 2010 ; Thèse de docteur en pharmacie ; Université de Nantes ; France.

LEE JY, CHANG EJ, KIM HJ, PARK JH, CHOI SW. (2002). Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*, Arch harm. Res, 25 (3), 313-9.

LEGAULT P. (2005). Mécanismes des enzymes. BCM.1(1), 3-20.

LICHIOUS J. J., MUTH C.(1997).The inhibition effects of *Urtica dioica* root extracts on experimentally induced prostatic hyperplasia in the mouse. Planta Medica , 63(4),307-310.

LUNG C., PAQUET D. (1991). Traitement de dénaturation appliquée à la b-lactoglobuline avant hydrolyse trypsique. 71, 385-394.

MACHEIX J J., FLEURIET A. ET JAY-ALLEMAND C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Press poly technologiques et universitaires romandes, 4-5.

MARCHAND P-A. (2014). Evaluation des caractéristiques et de l'intérêt agronomiques de préparation simples de plantes, pour des productions fruitières, légumières et viticoles économes en intrants ; Innovations agronomiques ; (34), 83-96.

MATI A ., GIRARDET J-M., XENAKI S., LINDEN G.(1991). Isolement et caractérisation de la fraction hydrophobe des protéases peptones des laits bovins, ovin et caprin. Le lait, 1991, 71(3), 1259-1273.

MEGNOUNIF I. (2011). Etude de la valeur nutritive et de l'activité antioxydantes d'*Urticadioica* (l'ortie) ; Mémoire de magister en biologie ; Université ABOU BEKR Belkaid Tlemcen ; Algérie.

MILANE H. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur. p. 13-36.

MODARRESI-CHAHARDEHI A., IBBRAHIM D., FARIZA-SULAIMAN S. et MOUSAVI L. (2012). Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. Revista De Biologia Tropical, 60(4), 1567-1576.

MOUFIDA S. et MERZOUK B. (2003). Biocimicalcaracterisation of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytologychimestry*, 62,1282-1283.

MOUTSIE. (2008). L'ortie, une amie qui vous du bien. L'encyclopédie d'Utorie, Ed Utorie.

OBERTREIS B. (1996). Antiphylogistische Effekte von Extractum *Urtica dioica* foliorum im vergleich zu Kaffeoylapfel saure. *Arzneim. Forsch. Drug Res.*, 46(1),52-56.

POUGHEON S .et GOURSAUD J., (2001).Le lait caractéristiques physicochimiques *In DEBRY G.*,Lait, nutrition et santé, Ed 6,Tec et Doc, Paris : p566

RANGANA S., GOVINDARAJAN V.J., RAMANA K. V. R. (1983). Citrus Fruits Varieties. Part II : Chemistry, Technology and Quality Evaluation. *CriticalReview in Food Science and Nutrition*, 18(4), 313-386.

REAUME T. (2010). Stinging Nettle *Urtica dioica*. Urticaceae- Nettle familly.1-3.

REDJALI L et OUBELLIL S. (2014). Evaluation physicochimique de quelques produits alimentaires commercialisés ; Mémoire de Magister en Biochimie appliquée ; Université Mouloud MAMMERI Tizi Ouzou ; Algérie.

REMEUF F.et LENOIR J. (1985). Caractéristique physicochimiques du lait de chèvre. *Recherche Laitière Française*, 446, 32-40.

RITCHIE C. (2013). Purification de protéines par chromatographie sur colonne. *Labome : the world of laboratoires*, 98(10), 1-20.

Références bibliographiques

ROMBI R et ROBERT D. (2006). 120 plantes médicinales : composition, mode d'action et intérêt thérapeutique de l'ail à la vigne rouge. Ed Alpen, France.

SARKER S., NAHAR L. (2007). Chemistry for pharmacy students: general, organic and natural product chemistry. Ed John Wiley & Sons.

SCHAFFNER W. (1993). Les plantes médicinales et leurs propriétés, manuel d'herboristerie, Delachaux et Niestlé, 156-157.

SCHOTTNER M., GANBER D., SPITELLER G. (1997). Lignans from the roots of *Urtica dioica* and their metabolites bind to human Sex Hormon Binding Globulin (SHBG). *Planta Med*, 63(6), 529-532.

SKURDIN G-M. (1980). Détermination de l'acide ascorbique dans les baies de nerprun par titrage potentiométrique (en russe). *Izv. Sib. Akad. Nauk. Ser. Biol. Nauk.*, 3, 122- 127.

SENNOUSSI C. (2011). Les protéines sériques du lait camelin collectés dans trois régions du sud algérien : essais de séparation et caractérisation de la fraction protéose peptone ; Mémoire de Magister en Biochimie appliquée ; Université Mouloud MAMMERI Tizi Ouzou ; Algérie.

SI AHMED S. (2009). Isolement et purification de la sensibilité des protéines du lait des dromadaires ; Université Mouloud MAMMERI Tizi Ouzou ; Algérie.

TESSIER A. (1994). Phytothérapie analytique. Phytochimie et pharmacologie, Ed Marc-Aurèle, 273-279.

TISSIER Y. (2011). Les vertus de l'ortie. Tredaniel, le courrier du livre, France.

THAPON J. L. (2005). Agrocampus-Rennes. Science et technologie du lait. 14 (77), France.

TOUSSANT B. (2012). Les enzymes. Médiateur, 1, 11-13.

TREMOLIERIS J., SERVILLO Y. et JACQUOT R. (1984). Manuel de l'alimentation humaine. 2.

VALNET J. (1992). Phytothérapie, Traitement des maladies par les plantes. Maloine, 6^{ème} Ed, 617-625.

VILOTTE S-L. and SOULIER S. (1992). Isolation and characterization of the mouse *alpha*-lactalbumin encoding gene : interspecies comparison, tissue and stage- specific expression. *Genetics*, 119, 287-292.

WICHTL M et ANTON R. (2003). Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Cachan: Médicales Internationales, 2^{ème} Ed., Tec & Doc, France.

WITTIG II K-A., MICHAEL K and HERMANN S. (2007). High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and fluorescence Studies of Membrane Proteins complexes. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(7), 1215-1225.

WOLFF J.P. (1991). Analyse et dosage des lipides. In *Techniques d'Analyse et de contrôle dans les Industries Agro-alimentaires IV : analyse des Constituants alimentaires, Technique et Documentation*, 2^{ème} ED., Lavoisier, Paris, France, 450

YANG L., CINDY H., TERRY C-T. et ALLAN S-Y. (2013).Scientific basis of botanical medicine as alternative remedies for rheumatoid arthritis. *Clinical reviews in allergy & Immunology*, 44(3), 284-300.

YENER Z., CELIK I., ILHANE F.et 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.

Annexes

Annexe 01 : Dosage de la vitamine C dans un jus de fruit

Protocol expérimental

Préparation des solutions

➤ **Solution de 2,6 dichlorophénol(DCPIP) à 0.5g/l :**

Dissoudre 0.5 g du 2,6 dichlorophénol indophénol et 0.2gde bicarbonate de sodium (NaCO_3) dans 300 ml d'eau distillée chaude ;

Refroidir et compléter à 1000ml avec de l'eau distillée.

➤ **Solution d'acide ascorbique :**

Dissoudre 0.4g d'acide ascorbique pur dans 200 ml d'eau distillée. Ajuster le volume à un 1 litre.

Etalonnage de la solution d'acide ascorbique

Prendre 5ml de cette solution dans un b cher, ajouter 1 ml d'acide acétique glacial et doser par le DCPIP jusqu'apparition d'une couleur rose pâle persistante ;

Lire le volume sur la burette, soit V_1 (ml).

Mode opératoire

Dans un b cher, introduire :

-2 ml de solution à doser ;

-ajouter 1 ml d'acide acétique glacial, mélanger ;

-titrer avec la solution du 2-6-DPIP jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante.

-lire le volume sur la burette (chute de la burette), soit V_2 (ml).

Expression des résultats

La teneur en vitamine C en g/l, est donnée par la relation suivante :

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Où : C_1 : concentration en acide ascorbique de la solution  tal n.

C_2 : concentration en vitamine C dans les différents jus

V_1 : chute de burette mesurée dans le cas de la solution  tal n

V_2 : chute de burette dans le cas du jus.

Annexe 02 : Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

1-l'indice d'acidité

Peser 2.5g de matière grasse (huile d'olive et huile de tournesol) dans un erlenmeyer puis les dissoudre dans 5ml d'éthanol ;

Titre  immédiatement avec de la potasse alcoolique (0.1N) en présence de quelque gouttes de phénolphtaléine jusqu'à l'apparition d'une coloration rose-pâle persistante.

Expression des résultats

$$I_a=V.N.56.1/m$$

Soit V = Volume de Potasse en ml

Soit N = Normalité de la solution de Potasse

Soit m =masse de la prise d'essai de la matière grasse en(g)

56.1 : masse molaire de KOH

2-L'indice d'iode :

Pour déterminer la quantité d'iode fixée, on procède à la préparation de deux tubes, un tube témoin qui contient du lugol seul et un autre contenant un échantillon d'huile et du lugol.

La titration se fait par une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0.1N), et déterminer les volumes de thiosulfate nécessaire pour le titrage des deux tubes.

-préparation du tube témoin : introduire dans un tube à essai 5 ml de lugol et quelques gouttes d'amidon(le mélange est bleu).Déterminer le volume V1 de thiosulfate de sodium nécessaire pour neutraliser l'iode contenu dans le tube témoin.

-préparation du tube échantillon : introduire dans un tube à essai 0,5 ml d'huile avec 4 ml d'hexane ou cyclohexane, mettre sous agitation pendant 3min,puis ajouter 5 ml du lugol puis chauffer pendant 5min (bien homogénéiser le long du chauffage).Après refroidissement, ajouter quelques gouttes d'empois d'amidon (mélange bleu) puis verser le thiosulfate goutte à goutte en agitant, jusqu'à décoloration. Déterminer le volume V2 nécessaire pour neutraliser l'iode contenu dans l'échantillon.

Expression des résultats

Il est calculé par l'équation suivante (ANONYME, 1984) ;

$$I_i \text{ (g/100g)} = (V_0 - V) \cdot 0,01269 \cdot 100/P$$

V_0 : volume (ml) pour doser le témoin

V : volume du thiosulfate (ml) pour dose l'échantillon

P : poids de la matière grasse.

Puis, on détermine le nombre d'insaturation dans les matières grasse, donnée par l'équation suivante :

$$nI = I_i \cdot m / MI_2 \cdot 100$$

nI : nombre d'insaturation m : masse du corps gras MI_2 : masse molaire de l'iode

Annexe 03 : Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)

Réaliser une courbe d'étalonnage avec une solution mère du glucose à 1g/l

Préparer les dilutions nécessaires pour les échantillons (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , et 10^{-4})

Gamme étalon

N° de tube	01	02	03	04	05	06
Solution de glucose (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Réactif DNS (ml)	2	2	2	2	2	2

Protocole expérimental

- Préparation des différentes dilutions de l'échantillon ;
- Mettre 1 ml de la solution à doser (ou des différentes dilutions) dans un tube à essai ;
- Ajouter 2 ml de réactif (3,5DNS) ;
- Chauffer au bain-marie bouillante pendant 5 mn ;
- Refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;
- Ajouter 7 ml d'eau distillée et homogénéiser ;
- Laisser reposer 15 mn à température ambiante ;
- Faire la lecture à 530 nm contre le blanc.

Expression des résultats

Une courbe est tracée $DO=f$ (concentration en glucose). Puis la quantité de sucres réducteurs présente dans les jus est déterminée.

Tableau : les densités optiques obtenues lors du dosage des sucres par la méthode utilisant le DNS

Les concentrations en glucose (g/l)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Les densités optiques (nm)	0	0.088	0,284	0,508	0,675	0,881

Annexe 04 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de BRADFORD *et al* (1976)

1. Préparation des solutions

-solution NaCl 0.15 M ;

-solution de BSA 0.1mg/ml.

2. Préparation de la gamme d'étalonnage d'albumine

A partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (0.1 mg/ml), préparer les solutions filles suivantes :

Solution mère (BSA) (ml)	0	0,1	0,5	1	1,5	2
NaCl (0.15 M) (ml)	2	1,9	1,5	1	0,5	0
Réactif de BRADFORD (ml)	1 dans tous les tubes					

-laisser 5 minutes à température ambiante ;

-lire l'absorbance à 595 nm.

Tableau : les densités optiques obtenues lors du dosage des protéines par la méthode de BRADFORD *et al* (1976).

Solution mère [BSA] (mg/ml)	0	0,01	0,05	0,1	0,15	0,2
Les densités optiques (nm)	0	0,099	0,195	0,296	0,472	0,63

Annexe 05 :Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200

Protocole expérimental

-préparation du tampon Tris-HCl 0,02 M avec pH 8,4 : dont la masse molaire duTris MM=121,14 moles, pour 0,02 M peser 2,42g

-ajuster le volume à 1 litre dans une fiole jaugée.

-préparation de la colonne :

-La colonne a été préparée avec un grand soin pour assurer un compactage homogène du gel. Le gel de Séphacryl S200 (environ 5g) est mis en contact du tampon de départ (Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4) avec l'azide de sodium pour éviter toutes contamination.il est ensuite dégazer sous vide, puis coulé dans la colonne (30x 1cm) en une seule fois d'une façon régulière, après stabilisation de cette dernière et stabilisation du débit à 28ml/h ;

-Le volume mort $V_0 = 7$ ml est estimer avec le bleu de dextran à la concentration de 1mg/ml qui possède une masse moléculaire de 10^6 Da et de ce fait n'est pas retenu dans le gel donc sortira au premier ;

-Le volume nécessaire pour l'élution du bleu de dextran correspond au volume du liquide qui se trouve entre les interstices ;

Annexes

-Les protéines sériques bovines lyophilisées (100 mg) sont solubilisées dans 5 ml de tampon Tris-HCl (0,02 M ; pH 8,4), déposées en haut de la colonne et éluées dans ces conditions à un débit constant ;

-Des fractions de 1 ml sont recueillies après mesure de l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda=280$ nm.

-Les fractions sont collectées et les DO correspondantes ont été enregistrés pour effectuer un contrôle électrophorétiques.

➤ **les densités optiques des fractions éluées par chromatographie de permeation sur gel de SEPHACRYL S200 (protéines sériques).**

Fraction	0 → 10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23 → 46	47	48	49	50	51	52	53 → 56
DO en nm	0	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.07	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.2	0	0.15	0.15	0.16	0.17	0.15	0.10	0

Annexe 06 : Hydrolyse enzymatique des protéines du lait de vache (caséines et protéines lyophilisées) par la trypsine

Préparation des solutions

-tampon Tris-HCl 0,8 M ; pH 8,0

-pour 0,8g/100ml, pour 5ml peser 0.04g dissoudre dans 5ml de l'eau distillée, contrôlé le pH jusqu'à 8,0 par la solution de HCl 10^{-3} N ;

-pour l'enzyme : prendre 0,4 ml d'enzyme (la trypsine) pour 0,04 g de protéines lyophilisées.

-tampon d'échantillon :

Solution(C).....500 μ l

Eau distillée.....250 μ l

SDS (10%.....250 μ l

2-mercaptoéthanol.....50 μ l

Annexe 07 : Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native)

➤ Préparation des solutions

• Solution d'Acrylamide (A)

Acrylamide.....36g

Bisacrylamide.....1g

Eau distillée.....100ml

• Tampon de gel (B)

Tris.....9,14g
Eau distillée100ml
Ajuster à pH 8,9 avec de HCl 4N

- **Tampon d'électrode**

Tris3g
Glycine.....14,4g
Eau distillée.....200ml

- **Tampon d'échantillon (les fractions récupérées par la chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200 des protéines sériques du lait de vache)**

Tampon de gel (B).....100µl
Eau distillée.....700µl
Glycérol 50%.....200µl
Bleu de bromophénol.....une tête d'aiguille
Dissoudre 1mg de protéines lyophilisées dans 1ml de ce tampon

Préparation du gel : T=12% et C= 2,7%(pour une plaque)

Solution (A).....3,25ml
Solution (B).....5ml
Eau distillée.....1,68ml

Dégazer le mélange (maximum 2min)
TEMED.....20µl
Solution de persulfate d'ammonium 10%.....75µl

Couler et mettre le peigne immédiatement

Dépôt d'échantillon : 10 à 20µl

Mise sous tension : 20mA, 25V

Annexe 08 : Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

- **Solution d'Acrylamide (A) :**

Comme celle déjà préparer pour la PAGE native

✓ Tampon de gel de séparation

Tris.....9, 25g
Eau distillée50ml
Ajuster à pH 8, 8 avec de HCl 4N

✓ Tampon de gel de concentration (Solution C)

Tris.....3g
Eau distillée.....50ml
Ajuster à pH 6, 8 avec de HCl 4N

- **Tampon d'électrode**

Tris3g
Glycine.....14,4g
SDS 10%.....0,5g
Eau distillée.....500ml

- **Tampon d'échantillon (les hydrolysats récupérer par l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques et caséines du lait de vache)**

Solution (C).....500µl
 Eau distillée.....250µl
 SDS 10%.....250µl
 2-mercaptoéthanol.....50µl
 -Dissoudre 1mg de protéines lyophilisées dans 800µl de ce tampon
 -chauffage à 100° C pendant 4 à 5 min puis refroidir dans un bain d'eau froide.
 -ajouter 200µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelque grain du bleu de bromophenol.
 ✓ Solution de persulfate d'ammonium
 Persulfate d'ammonium.....0,1g
 Eau distillée (qsp).....1ml
 ✓ Conduite de l'électrophorèse

1. Préparation du gel de séparation : T=17% et C=2,7%(pour une plaque)

Solution (A).....1,3ml
 Solution (S).....2,5ml
 Eau distillée2,73ml
 Dégazer pendant 2 min maximum
 SDS 10%100µl
 TEMED.....50µl
 Persulfate d'ammonium 10%.....100µl

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque de moindre hauteur.

2. préparation du gel de concentration : T= 4,8% et C= 2,7% (pour une plaque)

Solution (A).....1,3ml
 Solution (C).....2,5ml
 Eau distillée.....5,8ml
 Dégazer quelques secondes
 Solution de SDS 10%.....100µl
 TEMED.....50µl
 Persulfate d'ammonium à 10%.....100µl

-Couler immédiatement sur le gel de séparation et mettre le peigne

-Un échantillon protéique est chauffé à 100°C pendant 5min en présence d'un détergent anionique SDS (10%) et un agent réducteur chargé de rompre les ponts disulfures, le 2-mercaptoéthanol . La plupart des polypeptides sont dans ce cas dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les polypeptides seront chargés négativement donc ils seront séparés selon leurs tailles.

Dépôt d'échantillon : 10 à 20µl

Mise sous tension : 20mA, 25V

Annexe 10: Révélation des bandes de migration électrophorétiques (native et SDS)

Solution de fixation

TCA.....12g
 Eau distillée.....100ml

Solution de coloration

Bleu de coomassie R250.....0,5g
 TCA.....4g

Méthanol.....100ml
Eau distillée.....100ml

Solution de décoloration

Acide acétique.....37,5ml
Eau distillée.....312,5ml
Méthanol.....150ml