

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Chapitre I Synthèse bibliographique

1.1 Historique 3

1.2 Monographie de l'*Urtica dioica* 3

1.2.1 Etymologie et dénomination de l'ortie 3

1.2.2 Classification et description botanique..... 4

1.2.2.1 Classification de l'ortie 4

1.2.2.2 Caractéristiques botaniques..... 4

1.2.3 Origine et répartition géographique de l'ortie 5

1.2.4 Phytochimie de l'*Urtica dioica* 6

1.2.5 Principales utilisations thérapeutiques 6

1.2.5.1 Utilisation thérapeutique traditionnelle 6

1.2.5.2 Utilisation thérapeutique actuelle 7

1.3 Stress oxydant, radicaux libres et les antioxydants 8

1.3.1 Stress oxydant..... 8

1.3.2 Les radicaux libres..... 9

1.3.3 Conséquences de stress oxydatif 9

1.3.4 Les antioxydants 9

1.3.5 Mécanisme d'action des antioxydants 10

1.4 Métabolites secondaires..... 10

1.4.1 Les polyphénols..... 10

1.4.1.1 Les flavonoïdes..... 11

1.4.3 Activité antioxydante des polyphénols..... 12

Chapitre II Matériel et méthodes

2.1 Matériel végétal 13

2.1.1Récolte de la matière végétale 13

2.1.2Lavage 13

2.1.3Séchage..... 13

2.1.4 Concassage et broyage	14
2.2 Préparation de différents extraits	14
2.2.1 Extraction par macération.....	15
2.2.2 Extraction par Soxhlet.....	16
2.3 Conservation de l'extrait	18
2.4 Dosage des composés phénoliques des différents extraits d' <i>Urtica dioica</i>	19
2.5 Dosage des flavonoïdes des différents extraits d' <i>Urtica dioica</i>	19
2.6 Mesure du pouvoir antioxydant des extraits étudiés	20
2.6.1 Piégeage du radical DPPH	20
2.6.2 Pouvoir réducteur	21
2.7 Analyse statistique.....	22

Chapitre III Résultats et discussion

3.1 Détermination du taux d'humidité	23
3.2 Rendement.....	24
3.3 Teneur en polyphénols	26
3.4 Teneur en flavonoïdes.....	28
3.5 Activité antioxydante des extraits phénoliques d' <i>Urtica dioica</i> L.....	30
3.5.1 Test de piégeage du DPPH.....	31
3.5.2 Pouvoir réducteur du fer.....	34

Chapitre IV Conclusion

Conclusion	38
-------------------------	-----------

Références bibliographiques.

Annexes.

Liste des abréviations

AA : Activité Antioxydante.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

DO: Densité Optique.

DPPH: 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine.

EAG: Equivalents en Acide Gallique.

EQ : Equivalent en quercétine.

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygéné.

EX: Extrait.

Fe²⁺ : Fer ferreux.

Fe³⁺ : Fer Ferrique.

FeCl₃ : Chlorure Ferrique.

GSH: Glutathion

H (%): Taux d'Humidité.

IC₅₀: La concentration qui correspond à 50% d'inhibition.

K₃ Fe : Ferricyanure de Potassium.

MS: Matière sèche.

Na₂CO₃ : carbonate de sodium.

OMS : l'Organisation Mondiale de la Santé.

PI (%): Pourcentage d'Inhibition.

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

SD: Déviation Standard

TCA : Acide Trichloracétique

Liste des figures

Chapitre I Synthèse bibliographique

Figure 01: La plante d' <i>Urtica dioica</i> L.....	5
Figure 02: Structure de base de flavonoïdes	11
Figure 03: Piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes.....	12

Chapitre II Matériel et méthodes

Figure 04: <i>Urtica dioica</i> de la région de Bordj Ghedir.....	13
Figure 05: Séchage et broyage de la partie aérienne d' <i>Urtica dioica</i> L.....	14
Figure 06: Protocole de préparation de la matière végétale et des extraits bruts de la partie aérienne d' <i>Urtica dioica</i> L.....	15
Figure 07: Montages de l'extraction par macération et de filtration.....	16
Figure 08: Montage de l'extracteur Soxhlet.....	17
Figure 09: Montage de l'évaporateur rotatif de laboratoire.....	18
Figure 10: Réduction du radical DPPH par un antioxydant.....	20

Chapitre III Résultats et discussion

Figure 11: Taux d'humidité d' <i>Urtica dioica</i> L.....	23
Figure 12: Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	27
Figure 13: Teneur en polyphénols totaux dans l'extrait de 2 phases (éthanol et hexane) obtenue par la macération et Soxhlet équivalant de l'acide gallique.....	27
Figure 14: Droite d'étalonnage de quercétine.....	29
Figure 15: Teneur en flavonoïdes dans l'extrait de 2 phases (éthanol et hexane) obtenue par la macération et Soxhlet équivalant de quercétine.....	29
Figure 16: Activité antioxydante de l'acide gallique vis-à-vis de DPPH.....	31
Figure 17: Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• des antioxydants des extraits testés (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).....	31
Figure 18 : Résultats du test DPPH.....	32
Figure 19: Effet de la concentration, du solvant et type d'extraction sur l'activité réductrice du fer des extraits d' <i>Urtica dioica</i> L.....	35
Figure 20: La capacité réductrice des standards utilisés.....	35

Liste des tableaux

Chapitre I Synthèse bibliographique

Tableau I : Classification scientifique d' <i>Urtica dioica</i>	4
Tableau II : Propriétés thérapeutique d' <i>Urtica dioica</i>	7
Tableau III : Principaux radicaux libres et leur structure chimique	9

Chapitre III Résultats et discussion

Tableau IV: Taux d'humidité d' <i>Urtica dioica</i> L.....	23
Tableau V: Les différents aspects et les couleurs des extraits par macération et Soxhlet.....	24
Tableau VI: Rendements des extraits végétaux après l'évaporation des solvants.....	24
Tableau VII : Les avantages et les inconvénients de chaque méthode.....	25

Depuis longtemps, le règne végétal considéré comme une source importante dans le traitement de toutes sortes de maladies (**Bahorun et al., 1996**).

L'utilisation de ces plantes est très ancienne et connue sous le nom « la phytothérapie ». Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2003), environ 65-80% de la population mondiale à recours au médecine traditionnelle pour satisfaire ses besoins en soins de santé primaire, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**MA et al., 1997**).

Cela tient principalement au fait que la plante médicinale représente une variété de molécules bioactives, qui ont des intérêts thérapeutiques et qui sont la matière première pour la synthèse de médicaments. Parmi ces composés on retrouve, les polyphénols et les flavonoïdes (**Maurice, 1997**).

Ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes, elles ont aussi un rôle principal à la vie de la plante. Elles sont appelés « métabolites secondaires » (**Chaabi,2008**).

L'Afrique est le continent le plus riche dans le monde avec un nombre très élevé et une grande variété de plantes qui possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent des applications dans divers domaines, à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture (**Farombi, 2003**).

En particulier, l'Algérie de part sa situation géographique, Elle bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée (**Durak et al., 2004**).

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à étudier une plante présente à l'Algérie « l'Ortie ».

L'Ortie appartient à la famille des urticacées. Elle est employée comme remède naturel pour ses vertus thérapeutiques.

Cette dernière comprend une cinquantaine de genres et près de 700 espèces répartie à travers le monde. (**Apgil, 2003**).

L'ortie « *Urtica dioica* » une plante sauvage présente partout, sur les chemins, les ruines. L'Ortie est une plante que l'on peut reconnaître les yeux fermés grâce à son pouvoir urticant, considérée comme une « mauvaise herbe », elle fait partie des plantes dont on veut toujours se

débarrasser et que l'on néglige trop souvent et pourtant c'est une plante aux mille vertus, que nos ancêtres savaient apprécier.

Urtica dioica est en réalité une plante riche en vitamines et minéraux et antioxydants telles que les composés phénoliques. Elle possède de nombreuses vertus médicinales qui remontent à l'antiquité, ses vertus sont utilisées en phytothérapie: fortifiantes, anti-inflammatoires, astringentes ou antihistaminiques. Sa richesse en minéraux et vitamines fait d'elle une excellente plante nutritionnelle (**Draghi, 2005**). Elle est employée en agriculture, en alimentation, cosmétique, teinturerie, l'industrie du textile et a des fins médicinales (**Bertrand et Jeanne, 2008**).

Dans ce contexte, ce travail a pour objectif principal d'étudier l'activité antioxydante de l'Ortie.

Pour répondre à cet objectif nous avons fait notre travail comme suit :

- ❖ **Le premier chapitre**, une synthèse bibliographique portant sur :
 - ✓ Généralités et caractéristiques de l'Ortie ;
 - ✓ Généralités sur le stress oxydant.
- ❖ **La partie expérimentale**, comprend deux chapitres (matériel et méthodes, résultats et discussion) ;

Il s'agit de mettre au point :

- ✓ La récolte jusqu'à l'obtention de la poudre de cette plante, avec la détermination de son taux d'humidité ;
- ✓ La préparation des extraits des feuilles et tiges d'*Urtica dioica* par deux méthodes (macération et Soxhlet), et deux solvants (éthanol et hexane) ;
- ✓ Détermination des rendements de chaque extrait ;
- ✓ La quantification des polyphénols et des flavonoïdes par des méthodes spectrophotométriques.

Et enfin, on a testé l'activité antioxydante de ces extraits suivant deux tests :

- L'effet scavenger du radical DPPH ;
- Test du pouvoir réducteur.

Les résultats expérimentaux seront enfin synthétisés et interprétés et donnent lieu à une conclusion générale et des perspectives liées à notre travail.

1.1 Historique

L'ortie est une plante préhistorique qui a été beaucoup consommée pendant des siècles. Elle est appréciée en Europe, surtout dans le Nord et l'Est, il s'agit du premier « aliment – médicament » offert par la nature (**Vanstippen, 2005**).

Une herboriste autrichienne du XXème siècle "Maria Treben" a dit que : « L'ortie remplace à elle seule toute une valise de médicaments » (**Bertrand, 2005**).

Urtica dioica est une plante ubiquitaire de la famille des Urticacées, à des applications médicinales depuis l'antiquité. Aujourd'hui encore, l'ortie dioïque reste largement utilisée dans différents domaines: thérapeutique, cosmétique, alimentation et agriculture (**Bertrand et Jeanne, 2008**).

1.2 Monographie de l'*Urtica dioica*

1.2.1 Etymologie et dénomination de l'ortie

La grande ortie c'est la plante médicinale a été décrite pour la première fois en 1753 par le naturaliste suédois **Carl Von Linné**, fondateur de la nomenclature binomiale (**Delahaye, 2015**). Elle est connue sous le nom scientifique « *Urtica dioica* », dont ortie se disait *Urtica* en latin, mot venant lui-même du verbe « urere » signifiant le verbe « bruler », et le mot ortie en anglais est « Nettle » dérivant de noedl qui signifie « aiguille » (**Boyrie, 2016**) en référence au caractère urticant de cette plante (**Beloued, 2001**). Le nom d'espèce *dioica*, du grec « di-oikos », signifiant « 2 maisons » en référence au caractère dioïque de la plante avec des pieds males et des pieds femelles séparés (**Djaber et al., 2015**).

Plusieurs appellations en arabe ont été citées par Beloued (2001) dont parmi Horaig, Bent en nar, al quaras, Azegdouf : c'est le nom berbère, en 2002 d'après Bertrand et la présente étude, de nouveaux noms vernaculaires sont attribués à cette plante: en français : **Ortie** piquante et Nettle en anglais (**Afif, 2015**). Ortie dioïque, grande ortie (ortie commune, ortie vivace, ortie majeur, ortie féminine ou ortie femelle, ortie de grain, ortie a tige rouge) sont des nomenclatures de l'ortie choisies à partir de ses caractéristiques d'après **Fleurenstin(2008)**.

1.2.2 Classification et description botanique

1.2.2.1 Classification de l'ortie

L'Ortie (*Urtica dioica*) appartient à la famille des Urticacées qui regroupe une trentaine d'espèces de plantes herbacées à feuilles velues. Comptant près d'une cinquantaine de genres et 700 espèces, la famille des Urticacées est présente partout dans le monde (Apgil, 2003).

Sa classification est déférente d'un botaniste à un autre et d'une année à une autre. Selon Quezel et Santa(1962), la classification qu'occupe *Urtica dioica* dans la systématique est la suivante:

Tableau I : Classification scientifique d'*Urtica dioica* (Quezel et Santa, 1962).

Classification	Nom scientifique et nom commun
Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Subdivision	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Super-class	<i>Hamamelididae</i>
Ordre	<i>Urticales</i>
Famille	<i>Urticaceae</i>
Genre	<i>Urtica</i> L. – <i>Ortie</i>
Espèce	<i>Urtica dioica</i> L. –

1.2.2.2 Caractéristiques botaniques

La grande ortie (*Urtica dioica*) encore appelée ortie dioïque ou ortie commune, c'est une plante vivace herbacée vigoureuse qui a une longue durée de vie, mesurant de 60 à 120 cm de haut. Elle peut dépasser le 1m 50 (Afif, 2015).



Figure 01 : Plante d'*Urtica dioica* L.

La grande ortie est constituée de deux parties : la partie aérienne de couleur verte par la présence des feuilles opposées grossièrement en forme de cœur, ont un bord pourvu de dents aiguës, présentant à leurs surface des poils urticants, et ses petites fleurs en grappes ou en boulettes de couleur verdâtre elles sont apétales (sans pétales), la partie aérienne contient aussi le fruit qui dénommé « la graine de l'ortie » de 1 à 1,5 mm de longueur et 0,7 à 1 mm de largeur (Anton, Bernard *et al.*,2003), il est constitué d'un akène avec un calice persistant ; et une partie souterraine sous forme des colonies grâce à son système racinaire et des rhizomes cylindriques de 3 à 10 mm d'épaisseur qui lui permet de se propager rapidement. Elle est entièrement verte sombre La période de floraison de l'*Urtica dioica* est de Juin, Juillet, Aout, Septembre, à Octobre (Delahaye, 2015).

1.2.3 Origine et répartition géographique de l'ortie

Parmi les espèces du genre *Urtica*, *Urtica dioica* originaire d'Eurasie est la plus grande et la plus répandue dans toutes les régions tempérées du monde. Elle est présente dans presque toutes les régions du monde: de l'Europe et l'Afrique du Nord à l'Asie, ainsi qu'Amérique du Nord et du Sud et en Afrique du Sud (Brisse *et al.*, 2003).

Elle pousse sur tous les terrains, argileux ou sablonneux, calcaires ou siliceux, surtout ceux contenant des matières organiques fraîches mais toujours riches en azote (elle fait partie des plantes nitrophiles) et de préférence avec une certaine humidité (plante hygrophile) surtout

lors de son implantation. *Urtica dioica* est très résistante à la sécheresse, on la trouve aussi bien en plein soleil à l'abri d'une façade qu'au fond d'un vallon ombragé. Symbole de milieux riches et fertiles, l'Ortie ne pousse jamais seule, mais en grands massifs compacts (Draghi, 2005).

1.2.4 Phytochimie de l'*Urtica dioica*

Vu de son usage traditionnel, les scientifiques ont accordé un important intérêt à sa composition chimique (Tita *et al.*, 2009). L'étude phytochimique d'*Urtica dioica*, la révéla que cette plante contient des métabolites secondaires, essentiellement des flavonoïdes, des tanins et des composés volatiles, mais aussi des acides gras, des polysaccharides, des stérols, des terpènes, des protéines, des vitamines et des minéraux (Wetherlit, 1992 ; Rafajlovska *et al.*, 2001 ; Kristofova *et al.*, 2010 ; Gul *et al.*, 2012). En effet, les parties aériennes d'*Urtica dioica* (les feuilles) contiennent la chlorophylle, plusieurs vitamines (vitamine C, K, B1 et B2...), caroténoïdes, huiles essentielles et des minéraux parmi lesquels: Fe, Cu, Mn et Ni etc....

Plus de la composition des feuilles, les poils contiennent l'acétylcholine, l'histamine, 5-hydroxytryptamine (sérotonine), leukotriènes et l'acide formique qui sont responsables de l'effet urticant de la plante (Fleurentin , 2008).

1.2.5 Principales utilisations thérapeutiques

1.2.5.1 Utilisation thérapeutique traditionnelle

L'ortie est un remède traditionnel utilisé depuis des années contre l'anémie et le manque d'énergie: on dit que c'est un excellent fortifiant grâce à sa haute teneur en fer et autres minéraux. On dit aussi qu'elle stimule les fonctions digestives (lourdeurs et crampes d'estomac) (Wichtl et Anton, 2003). La tisane d'ortie est toujours proposée par les phytothérapeutes comme remède traditionnel pour la goutte et les rhumatismes. En Allemagne, la tisane d'ortie est utilisée comme diurétique léger, mais elle n'est pas suffisamment puissante pour être associée à un traitement de l'hypertension ou les problèmes cardiaques. Alors qu'en Russie, l'ortie est aussi employée pour les troubles biliaires et hépatiques (Valnet, 1983).

1.2.5.2 Utilisation thérapeutique actuelle : L'ortie dioïque appartient au monopole pharmaceutique. Elle est inscrite sur la liste des plantes médicinales retenues comme telles par la Pharmacopée dans le monde entier (**Draghi, 2005**).

Aujourd'hui les propriétés médicinales de l'ortie sont reconnues de tous. La plupart des pratiques populaires ancestrales ont été confirmées par l'analyse et l'expérimentation. L'ortie rentre dans la composition d'une multitude de médicaments allopathiques et les recherches se poursuivent et viennent toujours confirmer certaines utilisations empiriques (**Cazin, 1997**).

Plusieurs propriétés médicinales sont attribuées : nutritive, astringente, tonique, antiasthmatique, stimulante et dépurative et anti-inflammatoire des voies urinaires, en traitement ou en prévention des calculs rénaux, et antianémique (**Draghi, 2005**).

L'ortie est aussi utilisée par voie externe pour traiter les entorses, la tendinite et la névralgie, ainsi que pour soulager les douleurs arthritiques et rhumatismales (**El Houari et al., 2006**).

Les applications thérapeutiques de l'ortie sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau II : Propriétés thérapeutique d'*Urtica dioica*

Propriétés thérapeutiques	Actions	Références
Traitement du cancer de prostate et d'hypertrophie bénigne de la prostate	Les effets de la racine d'ortie dans le traitement de l'HBP (un effet comparable à celui de la tamsulosine).	Konrad et al., 2000 ; Durak et al., 2004 ; Schneider et Rubben 2004; Safarinejad, 2005 ; Hoffman, 2006 ;
Hypoglycémique	Inhibe l'absorption intestinale du glucose.	Pouyat, 2017.
Hypotenseur	Les racines d'ortie peuvent produire des réponses hypotensives à travers des effets vasodilatateurs, par la libération de l'oxyde d'azote endothélial et par l'ouverture des	Broncano, 1983 ; Newall et al., 1996 ; Blumenthal, 2000 ; Tahri et al., 2000 ; Legssyer et al., 2002 ; Testai et al., 2002.

	canaux potassiques.	
Diurétique	Augmente le débit urinaire.	Blumenthal, 2000. Tahri et al., 2000.
Antianémique	Antifatigue grâce à la forte teneur en fer et acide folique contenu dans la chlorophylle des feuilles.	El Houari et al., 2006.
Antiallergique, Antioxydant	Utile dans le traitement de l'allergie au pollen (feuilles).	Mittman, 1990. Gulcin et al., 2004. Ilhami et al., 2004. Roschek et al., 2009.
Anti-inflammatoire, Immuno-stimulateur	Une activité immuno-stimulatrice des flavonoïdes glycosides des feuilles sur les neutrophiles.	Glusker et Rossi, 1986. Wagner, 1994.
Traitement de rhumatismes et Arthrose	Diminution de l'induction de la réponse des cellules T primaires du rhumatisme articulaire. Consolidation des cartilages grâce à sa richesse en Silice (surtout les racines).	Wang et Wei, 2001. Broer et Behnke, 2002
Effet sur la fonction cérébrale et la mémoire	La feuille d'ortie est capable de diminuer la transcription des facteurs de l'inflammation, et de stimuler la performance cérébrale.	Wichtl et Anton, 2003.

1.3 Stress oxydant, radicaux libres et antioxydants

1.3.1 Stress oxydant

Le stress oxydatif désigne un déséquilibre de la balance entre radicaux libres et défenses anti oxydantes, traduisant une sorte d'agression biologique de l'organisme (**Rock, 2003**).

1.3.2 Les radicaux libres

Ce sont des espèces chimiques, atomes ou molécules caractérisées par la présence d'un ou plusieurs électrons célibataires sur leur couche de valence ce qui les rend hautement réactives et donc instables (**Rock, 2003**). Le radical libre tend toujours à remplir son orbitale atomique en arrachant un électron dans les molécules avoisinantes pour devenir stable (**Goudable et Favier, 1997**).

Tableau III : Principaux radicaux libres et leur structure chimique (**Hanton, 2005**).

Radicaux libres	Structure chimique
Radical hydroxyl	OH°
Radical hydroperoxyde	HOO°
Radical peroxyde	ROO°
Radical alkoxy	RO°
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Péroxynitrite	ONOO°
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\circ-}$

La chimie particulière des ERO leur permet de jouer un rôle important dans de nombreux processus physiologiques ou à l'inverse être toxiques, dépendant de leurs concentration.

1.3.3 Conséquences de stress oxydatif

Le principal danger des radicaux libres vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils Réagissent avec des composants cellulaires importants, tels que l'ADN (**Hadj, 2009**), les lipides (peroxydation), les protéines (**Jacob, 2007**)...etc. Cette oxydation provoque des dommages sur tout l'organisme, accélérant le vieillissement (maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, cancer, diabète...) (**Pincemail et Defraigne, 2003**), et la dégradation des cellules et des tissus (**Bonnet et al .,2010**).

1.3.4 Les antioxydants

Le terme antioxydant désigne toute molécule ayant la capacité de diminuer ou

d'arrêter l'action d'espèces réactives oxygénées, soit directement en inhibant leur production ou bien en limitant leur propagation en agissant comme des piègeurs de radicaux libres, en agissant comme donneurs d'hydrogène pour donner finalement des composés stables (Favier,2003).

1.3.5 Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006). Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :

- **Système de défense primaire** : comme la catalase, le glutathion (GSH). Ces antioxydants préviennent la production de ROS en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation. Ils agissent donc en prévention.
- **Système de défense secondaire** : à titre exemple les tocophérols, sont capables de piéger directement les radicaux oxydants et sont ainsi des antioxydants «briseurs» de la chaîne radicalaire bloquant ainsi les réactions de propagation (Buettner, 1993).

1.4 Métabolites secondaires

Les plantes photosynthétiques convertissent le dioxyde de carbone (CO₂) en métabolites primaires, qui sont nécessaires pour leur vitalité. En outre, elles possèdent des métabolites dits "secondaires", ces derniers ce sont des composés chimiques formés lors des processus métaboliques des végétaux (Guessoum et Lecheheb, 2015). Ces composés sont définis comme étant des molécules bioactives non- nutritives qu'on trouve dans les fruits, les légumes, les graines et autres plantes comestibles (Hai, 2004 ; Magee et Rowland, 2004 ; Altameme *et al.*,2015 ; Hamed *et al.*,2015).

Les métabolites Secondaires sont classés essentiellement en trois grandes familles : Les polyphénols ou bien les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (Lutge *et al.*,2002 ; Abderrazak et Joël, 2007).

1.4.1 Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans toutes les parties

des végétaux supérieurs: racine, tiges, feuilles, fleurs, fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**). En effet les composés phénoliques, constituent le groupe le plus grand nombre et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Lugasi et al., 2003**).

Les principales classes de composants phénoliques sont: les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins, et les coumarines (**King et Young, 1999 ; Tapiero et al., 2002**).

1.4.1.1 Flavonoïdes

Ce sont des composés qui appartenant à la famille des polyphénols (**Seyoum et al., 2006**). Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (**Midoun , 2011**).

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones et les anthocyanes. Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. 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 (**Kone , 2009**).

Les flavonoïdes présentent une structure de base commune du diphenyl propane C6-C3-C6 à toutes les classes qui les représentent qui est constituée de deux noyaux aromatiques désignés par les lettres A et B qui sont reliés par un hétérocycle oxygéné, désigné par la lettre C (**Dacosta, 2003**).

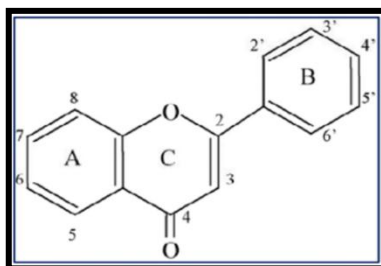


Figure 02: Structure de base de flavonoïdes (**Carlo et al., 1999**)

1.4.3 Activité antioxydante des polyphénols

Il a été rapporté que les composés phénoliques présentent des propriétés antioxydantes. Les flavonoïdes se voient attribuer un fort pouvoir antioxydant du fait de la multiplicité de leurs mécanismes d'action (**Fuhrman *et al.*, 1995**). En effet, ils agissent par le biais de plusieurs mécanismes d'action différents dont le résultat est l'inhibition de l'oxydation. Cela se fait soit par piégeage de radicaux libres par donneur direct d'un atome d'hydrogène ou d'un électron (**figure 03**).

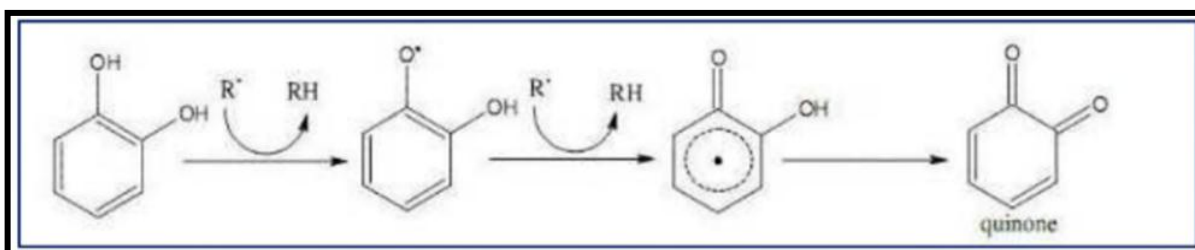


Figure 03 : Piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes (**Marfak, 2003**).

Soit par chélation des ions métalliques comme le cuivre et le fer, ou bien par conversion d'hydro peroxydes à des espèces non-radicalaires et enfin par désactivation de l'oxygène singulet (**Gordon ;1990,2001**).

2.1 Matériel végétal

2.1.1 Récolte de la Matière végétale

Les parties aériennes d'*Urtica dioica* ont été récoltées dans la région de Bordj Ghedir (wilaya de Bordj Bou Arreridj) durant le mois de Mars, 2018. L'identification de la plante a été effectuée par notre encadreur madame siouda wafa au laboratoire T3 du département de Biologie de l'Université de Mohamed El Bachir El Ibrahimi.



Figure 04: *Urtica dioica* de la région de Bordj Ghedir.

2.1.2 Lavage

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

2.1.3 Séchage

Une fois la plante a été lavée, Le séchage de la matière végétale a été réalisé dans l'étuve à une température de 40°C pendant 24h.

2.1.4 Le Taux d'humidité

Le taux d'humidité est la quantité d'eau contenue dans la matière végétale, il est exprimé en pourcentage et calculer par la formule suivante:

$$H (\%) = [(m_0 - m_1) / m_0] \times 100$$

- M_0 : Masse de l'échantillon « avant séchage en g ».
- M_1 : Masse de l'échantillon « après séchage en g ».
- H (%): Taux d'humidité exprimé en pourcentage (William, 1999).

2.1.4 Concassage et broyage

Comme indiqué dans la **figure 05**, le concassage de l'ortie est suivi par le broyage qui a été fait à l'aide d'un mortier + Pilon Porcelaine 200um pour diminuer la taille de la matière végétale sèche a pour objectif d'élever la surface du contact avec le solvant utilisé puis tamisée à l'aide d'un Tamis d'un calibre de 200 μ m.

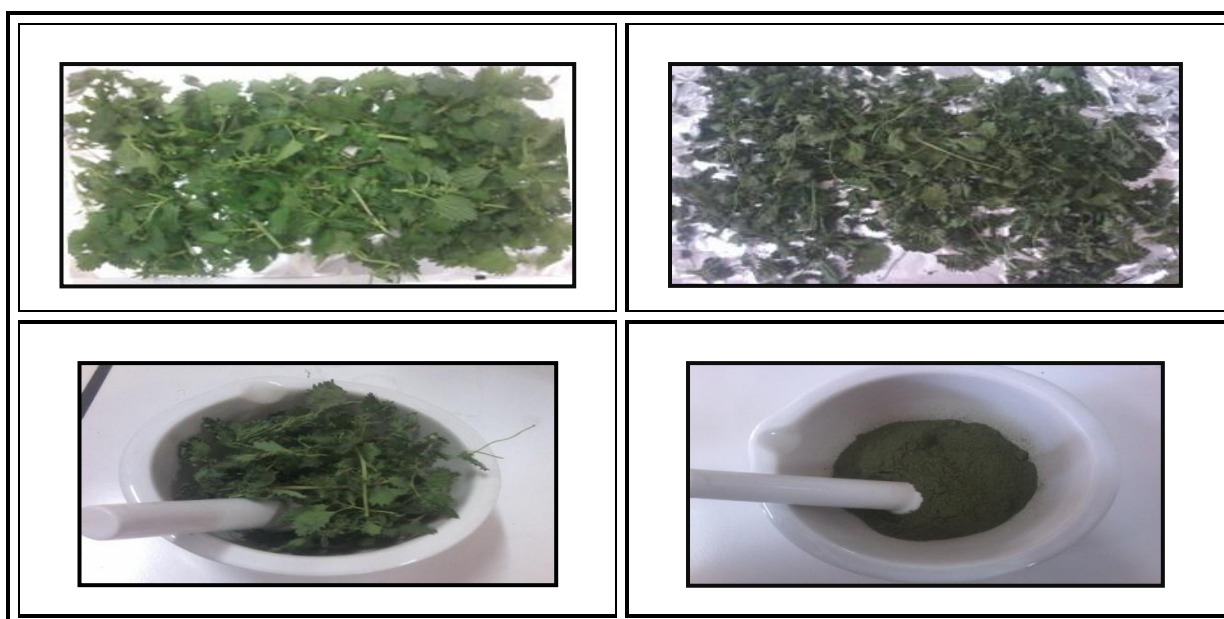


Figure 05 : Séchage et broyage de la partie aérienne d'*Urtica dioica* (Original; Mars, 2018).

2.2 Préparation de différents extraits

L'extraction des plantes médicinales est très importante pour avoir un extrait de bonne qualité et de grande quantité. Ces deux propriétés diffèrent avec :

- ✓ La qualité de la matière végétale première, (qui est variée selon la région géographique, climat, la maturité de la plante, l'état du sol...).
- ✓ Le type de solvant employé;
- ✓ Le procédé d'extraction (Bougar et Kourmi, 2016)

Pour cela, dans notre travail nous avons réalisé l'extraction par deux méthodes (**macération et Soxhlet**) et par deux solvants (**éthanol et hexane**) afin de trouver la meilleure méthode et le meilleur solvant de cette expérience. Cette figure résume notre travail:

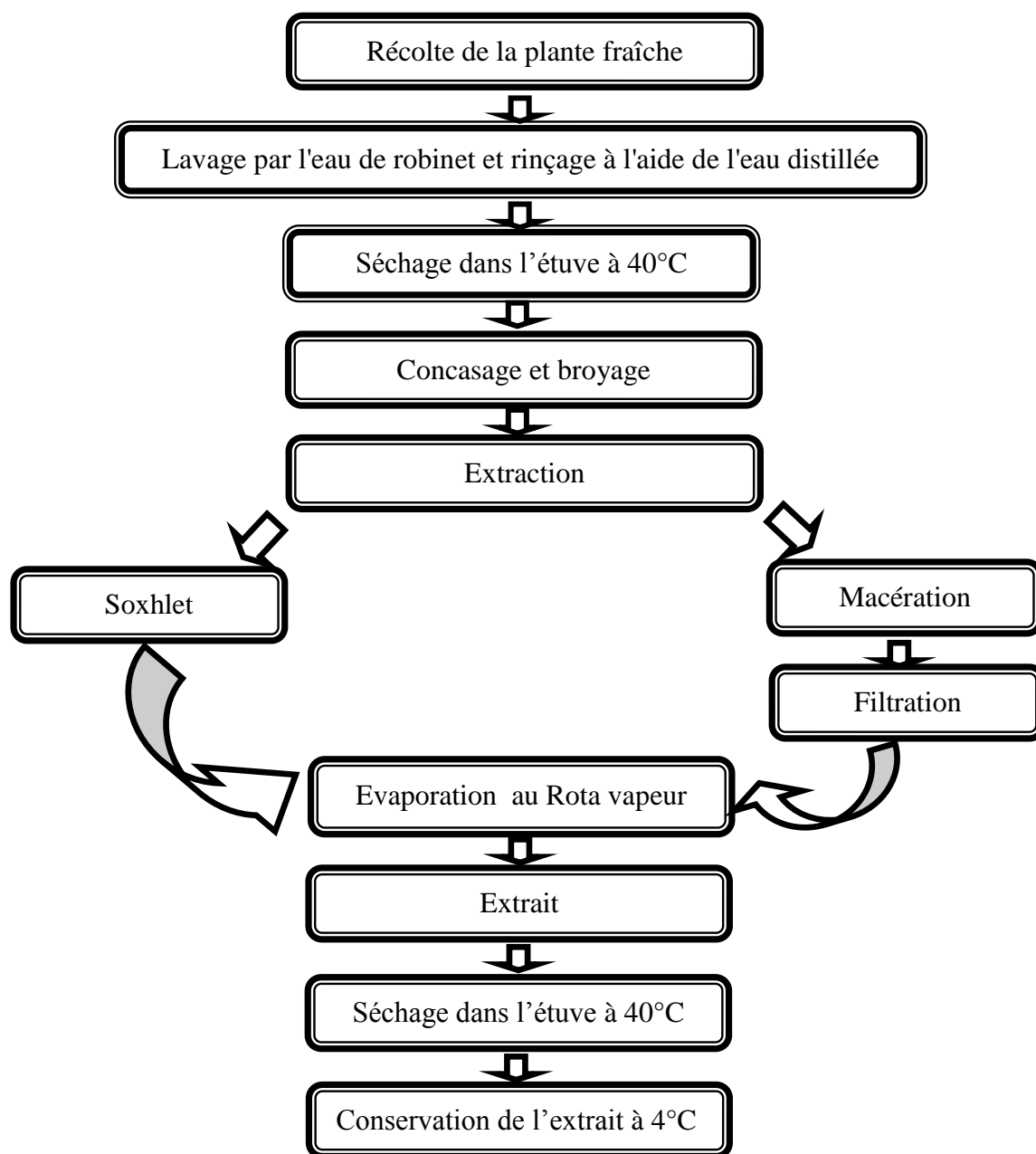


Figure 06 : Protocole de préparation de la matière végétale et des extraits bruts de la partie aérienne d'*Urtica dioica* L.

2.2.1 Extraction par macération

2.2.1.1 Principe

C'est une méthode traditionnelle, couramment employée et qui consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée. Elle est basée sur la solubilité des composés bioactifs dans un solvant d'extraction et elle est influencée par une série de facteurs incluant la

nature du matériel végétal, la concentration en solutés de l'échantillon, la nature du solvant, la durée d'extraction...etc (Spigno et Defaveri, 2007; Budic-letoc *et al.*, 2005).

2.2.1.2 Mode opératoire

Les extraits ont été préparés en utilisant 50 g de poudre sèche d'*Urtica dioica* additionnés à 300 ml de chaque solvant : l'Hexane et l'éthanol dans un erlenmayer recouvert avec papier d'aluminium pour éviter la dégradation par la lumière. Le mélange a été macéré pendant 24 heures sur un agitateur électrique et à température ambiante.

2.2.1.3 Filtration

Une fois l'extrait prêt on a filtré avec un papier filtre et du coton. La conservation de l'extrait récupéré a été dans des eppendorf au réfrigérateur (4°C) pour éviter tout risque de dégradation des extraits due à l'action de l'air.

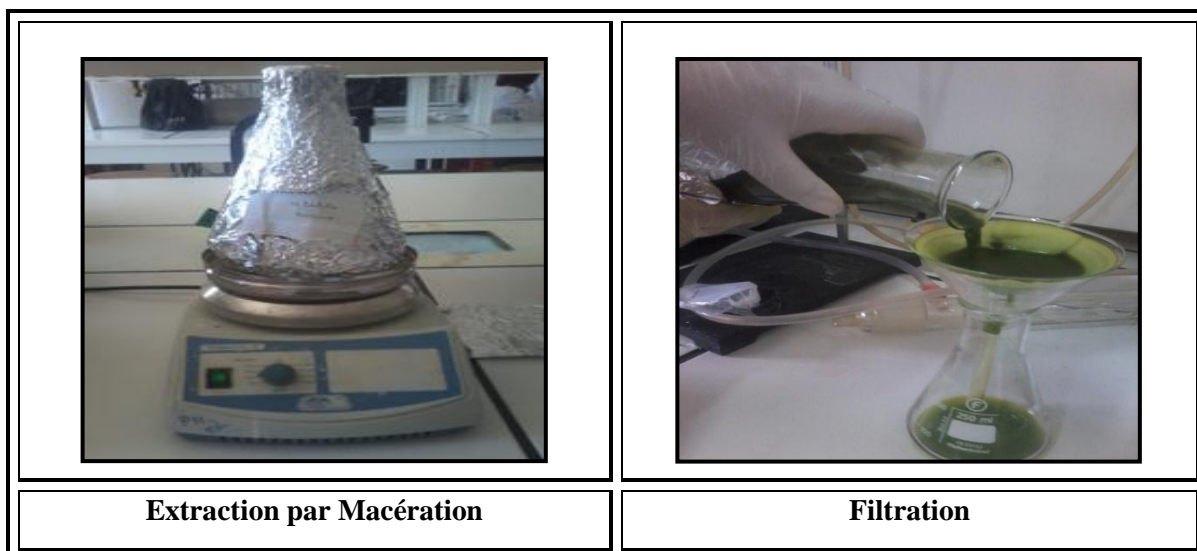


Figure07 : Montages de l'extraction par macération et de filtration (Original, 2018).

2.2.2 Extraction par Soxhlet

2.2.2.1 Principe

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière végétale.

Le montage d'un appareil Soxhlet est représenté dans la **figure 08**, est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (une matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et des tubes de distillation pour l'entrée et de sortie de l'eau.

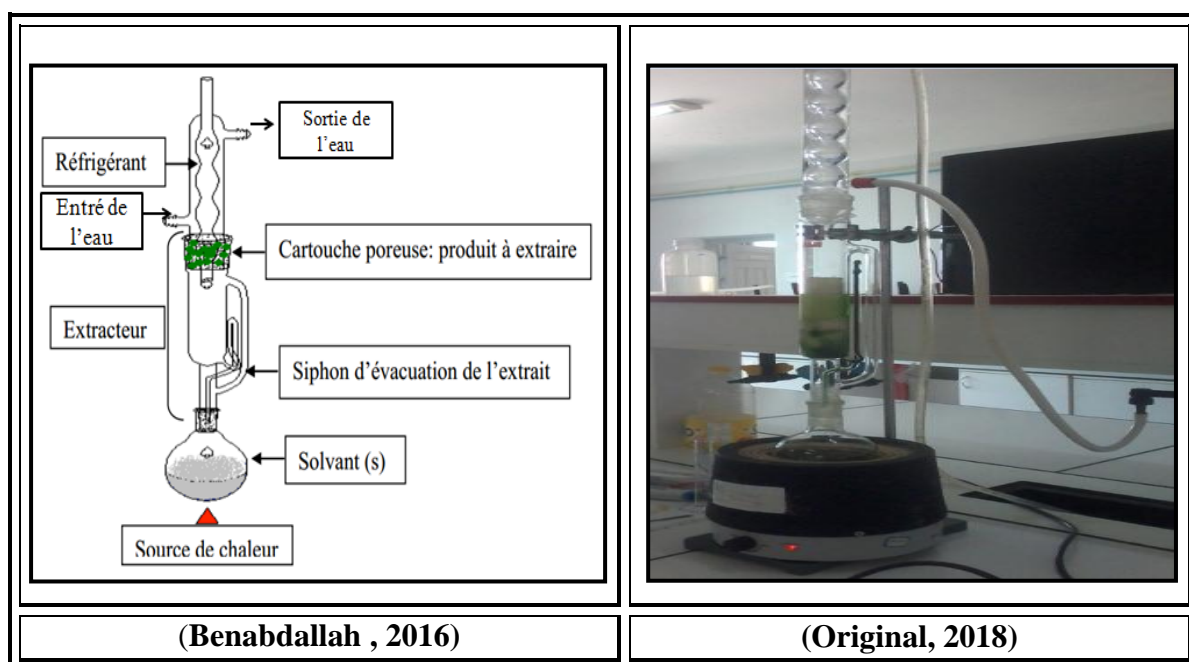


Figure 08 : Montage de l'extracteur Soxhlet.

2.2.2.2 Mode opératoire

Les extraits ont été préparés en introduisant 50 g de poudre sèche d'*Urtica dioica* dans la cartouche réalisée avec du coton. Un volume de 300 ml de chacun des deux solvants d'extraction l'éthanol et l'hexane ont été versés dans un ballon de 500 ml. L'extraction a été effectuée pendant 6 h, durée considérée suffisante selon la littérature pour extraire les composés phénoliques.

2.2.3 Évaporation

Le filtrat obtenu par la macération et la fraction obtenus par Soxhlet ont été évaporés à sec à l'aide d'un rota vapeur en fixant la température de l'évaporation, Cette dernière dépend de la température d'ébullition de chaque solvant. Cette opération a pour but d'éliminer les solvants extractifs utilisés.

Dans cet appareil représenté dans la **figure 09**. On a réalisé une évaporation sous vide en

utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée permettant donc d'effectuer une évaporation rapide. L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite, évitant ainsi la dégradation thermique éventuelle des composés. C'est une méthode d'évaporation simple, utile, douce et rapide (Petko, 2010).

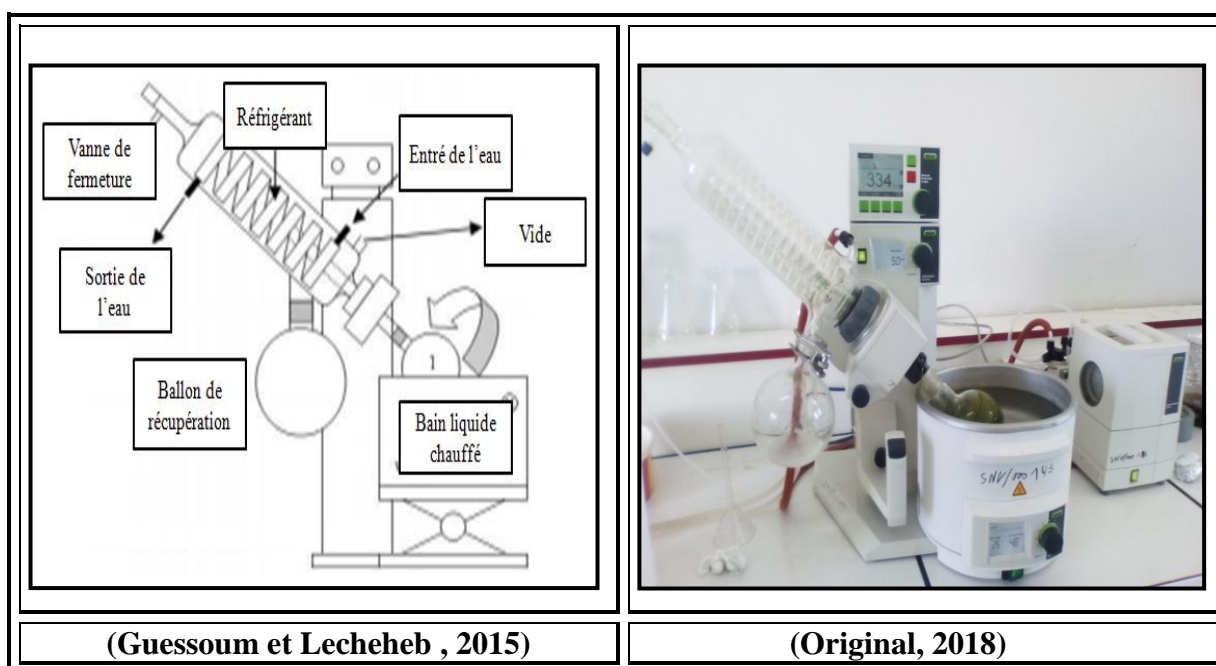


Figure 09 : Montage de L'évaporateur rotatif de laboratoire.

2.3 Conservation de l'extrait

Après l'élimination de deux solvants utilisés, on a obtenu des extraits purs. Ces derniers ont été conservé dans un réfrigérant à température de 4°C et à l'abri de la lumière en utilisant un papier d'aluminium qui empêche le contact de l'extrait avec la lumière jusqu'à son utilisation.

2.3.1 Rendement

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait obtenue et la masse de la matière végétale sèche (Belyagoubi ; 2006) :

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

- **RE:** Rendement en extrait (%).
- **ME:** Masse d'extrait récupérée exprimé en g.
- **MS:** Masse de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

2.4 Dosage des composés phénoliques des différents extraits d'*Urtica dioica*

Pour déterminer la teneur totale en phénol, en utilisant une méthode modifiée de Folin-Ciocalteu telle que décrite par **Beretta *et al.* (2005)**. 200 μl de chaque extrait de concentration 1mg/1ml a été mélangé avec 500 μl de réactif de Folin-Ciocalteu (10%) pendant 5 min, puis 1500 μl d'une solution Na_2CO_3 ont été ajoutés (7,5%). Tous les échantillons ont été incubés à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 minutes et leur absorbance a été lue à 765 nm. La teneur totale en composés phénoliques a été exprimée en mg équivalents en acide gallique (GAE) par g d'extrait (mg EAG/g EX) à partir d'une courbe d'étalonnage en utilisant l'équation suivante:

$$y = ax + b$$

Tous les échantillons ont été analysés en triple.

2.5 Dosage des flavonoïdes

La formation des complexes jaunâtres, lors de l'ajout du chlorure d'aluminium, est due à la fixation des ions Al^{+3} sur les atomes d'oxygène présents sur les atomes de carbone 4 et 5 des flavonoïdes (**Ribereau-Gayon, 1968**).

Le dosage des flavonoïdes est effectué selon la méthode décrite par **Djeridane *et al.* (2006)**. Un volume (1ml) de la solution de chlorure d'aluminium ALCL_3 (2%) est additionné d'un même volume d'extrait de concentration 1mg/1ml. L'absorbance est lue à 430 nm, après un temps de contact de 10 minutes à température ambiante.

Les courbes d'étalonnages ont été obtenues en utilisant comme étalon la quercétine. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg équivalent en quercétine par g d'extrait (mg EQ/g EX).

2.6 Mesure du pouvoir antioxydant des extraits étudiés

La capacité antioxydante des extraits étudiés a été évaluée dans ce travail par une série de 02 testes visant la détermination du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH), et du pouvoir réducteur.

2.6.1 Piégeage du radical DPPH

La méthode de piégeage du radical de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine (DPPH) a été décrite pour la première fois par **Blois (1958)**.

2.6.1.1 Principe

A température ambiante, le radical DPPH présente, en solution alcoolique, une intense coloration violette qui est changée par la couleur jaune au contact d'une substance donneuse de protons H^+ . Cette couleur est l'indicateur du pouvoir antioxydant d'un échantillon par sa capacité à piéger le radical libre et se traduit par une diminution de l'absorbance à 517 nm (**Moon et Shibamoto, 2009**).

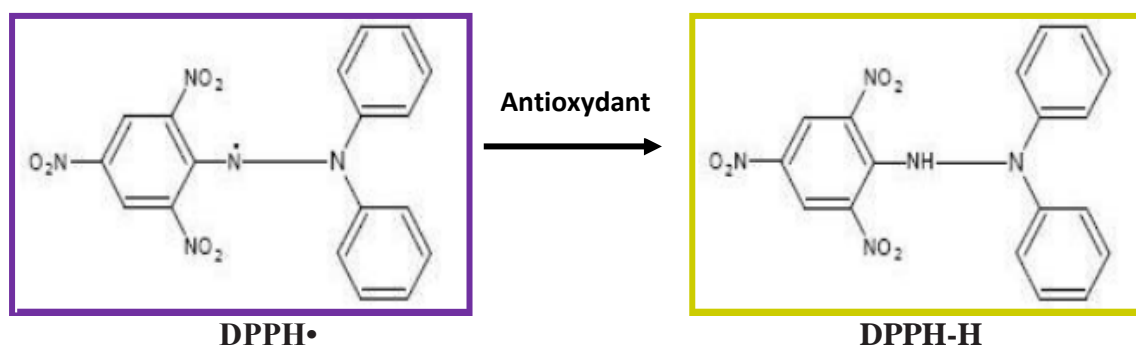


Figure 10: Réduction du radical DPPH par un antioxydant (**Endo et al., 2006**).

2.6.2 Mode opératoire

Après la préparation des dilutions ou des concentrations différentes des extraits dans le méthanol, on prend 100 μ l de chaque extrait et de chaque concentration qu'on met dans un tube à essais et on additionne 1000 μ l de la solution de DPPH contre un contrôle négatif (contenant du méthanol au lieu de l'extrait) et on prépare aussi le blanc qui contient 100 μ l de chaque extrait et 1000 μ l du méthanol. Les mélanges réactionnels est immédiatement agités avant d'être placés pendant 30 min à l'obscurité et à la température ambiante du laboratoire.

L'absorbance du milieu réactionnel a été mesuré à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre.

Chaque test est répété trois fois, en suivant la méthode décrite par **Ait Braham et Belhamel (2016)**.

Le pourcentage d'inhibition du radical de DPPH a été calculé suivant la formule :

$$PI = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

Avec :

PI: pourcentage d'inhibition.

A₀ : absorbance du control (sans extrait)

A₁ : absorbance de l'extrait après 30 min

L'étude de la variation de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC50). Une faible valeur d'IC50 correspondant à une grande efficacité de l'extrait.

2.6.2 Pouvoir réducteur

Le fer est un élément essentiel pour le bon fonctionnement physiologique, mais l'excès de cet élément peut causer des dommages à la cellule. En raison de sa forte réactivité, le fer est connu pour son grand rôle pro-oxydant vis-à-vis de l'oxydation des lipides (**Gülçin, 2012**).

2.6.2.1 Principe

L'analyse du pouvoir réducteur est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe³⁺) du complexe ferricyanure Fe³⁺ en fer ferreux (Fe²⁺), en présence d'antioxydants réducteurs (**Bijoy et al., 2008**). La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (**Gülçin et al., 2003**).

2.6.2.2 Mode opératoire

Le pouvoir réducteur a été estimé par la méthode de **Yildirim et al. (2001)**, 1ml d'extrait est additionné dans un tube à essai avec 1 ml d'un tampon phosphate à (pH 6,6) et 1 ml de ferricyanure de potassium (K₃Fe). On met le mélange au bain marie à 50°C/20 min, puis on

lui ajoute 1 ml d'acide trichloracétique TCA et on centrifuge à 3000 g pendant 10 min. 1ml du surnageant sont prélevés puis additionnés à 1ml d'eau distillée et 0.3ml de chlorure ferrique (FeCl_3), enfin on mesure l'absorbance à 700 nm.

2.7 Analyse statistique

Les courbes et les histogrammes sont tracés par le Microsoft Excel 2007. Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm écart-type, $n = 3$. Les valeurs d'IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe %inhibition=f (concentrations)

3.1 Détermination du taux d'humidité

Pour la détermination du taux d'humidité de la matière végétale, un échantillon de masse bien déterminée (**M₀**) est déposé pour être séché dans l'étuve jusqu'à ce que sa masse (**M**) où l'humidité a été complètement éliminé. Après 24 heures de séchage, la valeur prise de l'échantillon et l'humidité sont présentées dans le **tableau IV**:

Tableau IV: Taux d'humidité d'*Urtica dioica* L.

M₀(g)	M(g)	H%
1419,24	256,74	81,91

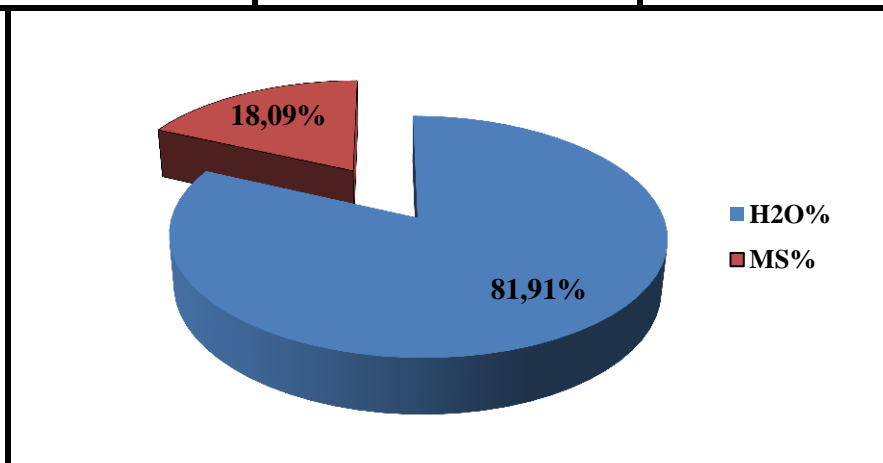


Figure 11: Taux d'humidité d'*Urtica dioica* L.

En général, toutes les plantes sont riches en eau, surtout, les jeunes plantes contiennent entre 70 à 80 % d'eau, soit une valeur de 20 à 30 % de la matière sèche (**Wattiaux, 1997**).

Les analyses de notre échantillon ont révélé un taux d'humidité très important environ 81,91% cela signifie plus de la moitié du poids de la plante fraîche est constituée par l'eau (**figure 11**). Parallèlement **Bertrand et Jeanne (2008)** montre aussi que le taux d'humidité d'ortie compris entre 77 et 80%. Aussi, **Wetherilt (1992)** est en accord avec notre résultat que la teneur en matière sèche des feuilles d'ortie est 23,1%. L'Ortie contient des quantités importantes de l'eau entre 65-90% ; un résultat trouvé par **Pradhan et al. (2015)**

3.2 Rendement

L'extraction et la préparation des phases éthanoliques (solvant polaire), et des phases à partir de l'hexane (solvant apolaire) de la partie aérienne du plante a permet d'obtenir des extraits de différentes couleurs, et différents aspects qui sont conservés au réfrigérateur dans des flacons ombrés jusqu' à leur utilisation.

Dont, la couleur et l'aspect de chaque extrait sont différentes :

Tableau V: les différents aspects et les couleurs des extraits par macération et Soxhlet.

	Macération	Soxhlet
Ethanol	Vert foncé, huileuse.	Vert très foncé, très huileuse.
Hexane	Jaune marron, sec et peu solide.	Jaune marron foncé, très huileuse.

Les résultats de rendement de 4 extraits de l'ortie dioïque obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau VI : Rendements des extraits végétaux après l'évaporation des solvants.

Le solvant	Masse de l'extrait (g)		Rendement de l'extrait (%)	
	Extrait de macération	Extrait de Soxhlet	Extrait de macération	Extrait de Soxhlet
Ethanol	2,98	5,98	5,96	11,96
Hexane	1,4	2,3	2,8	4,6

On observe des rendements d'extraction variant considérablement entre l'hexane, et celle de l'éthanol en fonction de la technique d'extraction utilisée, car chaque méthode représente des avantages et des inconvénients, le tableau suivant résume ces derniers :

Tableau VII : Les avantages et les inconvénients de chaque méthode (**Bénédicte Gélébart, 2016**).

	Avantage(s)	Inconvénient(s)
Soxhlet	<ul style="list-style-type: none"> -Utilisation de faibles quantités de solvants, sans phénomène de saturation. -Aucune nécessité de filtration après l'extraction. En outre, la méthode de Soxhlet est très simple et bon marché (Hamsi, 2013). -Le déplacement de l'équilibre de transfert en mettant à plusieurs reprises le solvant frais en contact avec la matrice solide. 	<ul style="list-style-type: none"> -Souvent plusieurs heures d'extraction. -Nécessite des particules de petite taille. -Toxicité des solvants en fonction des molécules à extraire. -Perte des composés thermolabiles/volatiles.
Macération	<ul style="list-style-type: none"> -Le solvant n'est pas nécessairement -chauffé -conservation les molécules thermosensibles. -Une agitation peut être appliquée pour faciliter l'extraction et assurer une bonne distribution de la biomasse dans le solvant. 	<ul style="list-style-type: none"> -Souvent plusieurs heures d'extraction. -Nécessite des particules de petite taille. -Toxicité des solvants en fonction des molécules à extraire. -Nécessité de filtration après l'extraction. -Phénomène de saturation : grandes quantités de solvants nécessaires.

Pour la macération, les rendements pour l'hexane et l'éthanol sont respectivement de 2,8% et 5,96 % extraite par 50g de la matière végétale primaire.

Concernant l'extraction par Soxhlet, les rendements sont de 11,96% pour l'éthanol suivi par 4,6% pour l'hexane, ces résultats sont supérieurs à ceux mesurés par macération.

Les essais réalisés avec ces deux techniques nous ont permis de conclure l'influence des paramètres de la méthode d'extraction, et la polarité du solvant sur le rendement en extractibles. Donc, l'éthanol et Soxhlet sont le solvant et la méthode qui permet l'obtention du meilleur rendement.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les rendements varient d'une méthode d'extraction à une autre. Cette différence est expliquée aussi par la différence de diffusion du solvant dans la poudre des plantes dans l'étape de macération et probablement à la nature des solvants utilisés pour l'extraction (Nacz et Shahidi, 2004).

L'étude réalisée par Bougar et Kourmi (2016) est trouvée un résultat de (16% pour l'extrait éthanolique avec macération) très supérieur à celle de notre étude. Cette différence est variée en fonction de la région géographique, climat, la maturité de la plante, l'état du sol, et en fonction des conditions de séchage.

3.3 Teneur en polyphénols

La teneur en phénols totaux estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu pour chaque extrait à partir d'une gamme étalon établie avec différentes concentrations d'acide gallique (l'équation standard de courbe : $y = 9.74x - 0,006$; $R_2 = 0,992$). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de l'extrait (mg EAG/g EX). En plus de sa sensibilité, cette méthode de dosage représente une productibilité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme étalon, $R_2 = 0,992$.

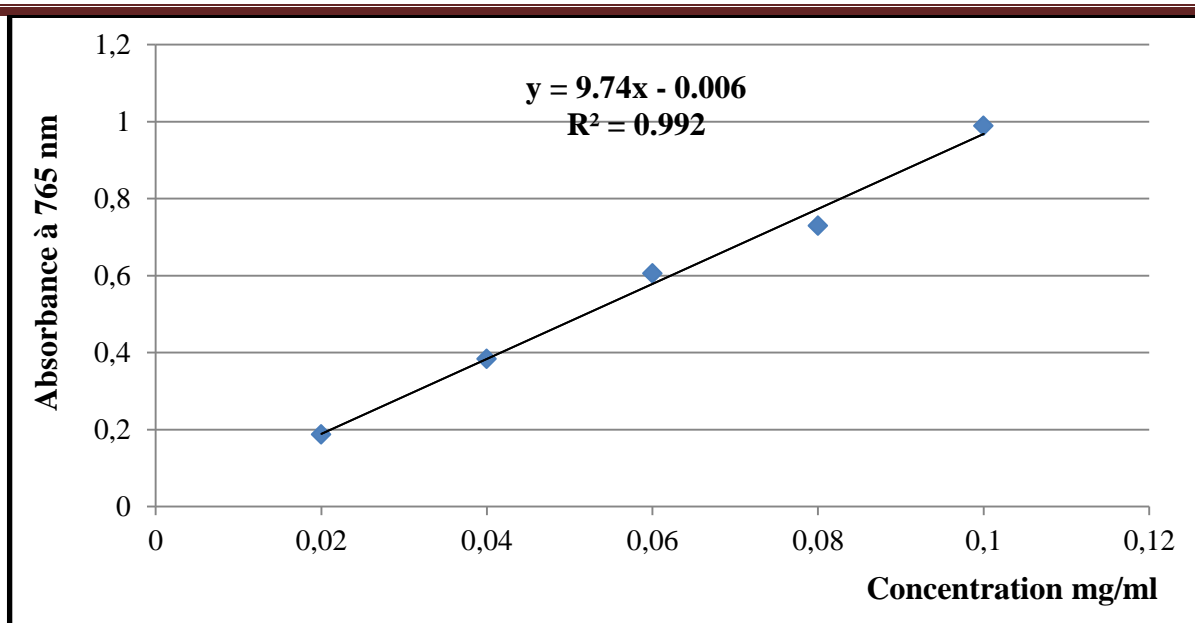


Figure 12: Droite d'étalonnage de l'Acide Gallique .

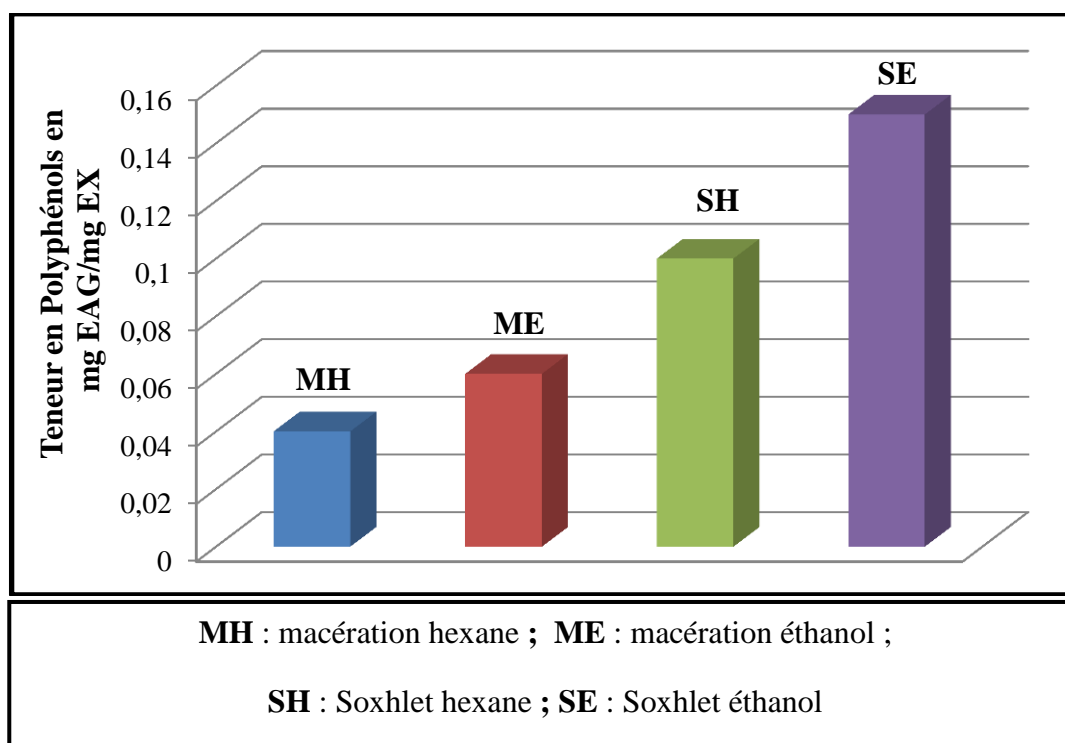


Figure 13 : Teneurs en polyphénols totaux dans l'extrait de 2 phases (éthanol et hexane) obtenue par la macération et Soxhlet équivalent d'acide gallique.

D'après les résultats, on peut constater que tous les extraits de la plante étudiés, sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes.

La (figure 13) montre que l'extrait éthanolique obtenue avec Soxhlet possède la plus haute teneur en polyphénols (0.15 ± 0.45 mg EAG/g EX), suivi par l'extrait de l'hexane obtenue avec Soxhlet (0.1 ± 0.07 mg EAG/g EX), suivi par l'extrait éthanolique obtenue avec

macération (0.06 ± 0.057 mg EAG/g EX) et enfin l'extrait de l'hexane obtenue avec macération (0.04 ± 0.078 mg EAG/g EX).

Les teneurs des polyphénols totaux déterminées ne sont pas des mesures absolues des quantités des phénols de la matière végétale utilisée, elles sont en fait, basées sur la capacité réductrice relative à une capacité réductrice équivalente à l'acide gallique (EAG). Les résultats obtenus sur la quantité des groupes phénoliques antioxydants de l'extrait qui dépend essentiellement du nombre des groupes hydroxyles sont fournis par la couleur du mélange réactionnel (extrait ; Folin- Ciocalteu ; Na_2CO_3), et les absorbances de ces derniers (**Balasunderam et al., 2006**).

Le profil polyphénolique des extraits de plantes peut varier sous l'influence de divers facteurs parmi lesquels la température et le solvant d'extraction (**Sousa et al., 2008 ; Conde et al., 2009**).

Pendant, le contenu phénolique dans les extraits de la plante dépend également du type d'extrait, c'est à dire de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires donne la concentration élevée de ces composés dans les extraits obtenus en utilisant les solvants polaires pour l'extraction (**Laraba et al., 2016**).

Les résultats de la présente étude sont similaires avec ceux de **Mohsen et Ammar (2009)**, qui ont étudié l'extraction des composés phénoliques dans différents solvants où l'éthanol était le meilleur solvant, en raison de leur polarité et de leur bonne solubilité pour ces composés (**Athamena et al., 2010**).

Selon **ST-Pierre (2012)** les extractions ont été faites dans un solvant vert, accessible et universel : l'éthanol. Bien qu'étant un solvant organique, il possède une grande polarité qui lui permet d'extraire autant les molécules polaires, comme les polyphénols.

Pour extraire les composés phénoliques antioxydants à partir de diverses sources végétales, l'acétone et l'éthanol sont les solvants couramment utilisés (**Denev et al., 2010 ; Spigno et Defaveri, 2007 ; Bazykina et al., 2002**). En général, ils donnent des rendements d'extrait sec total assez élevés, même s'ils ne sont pas très sélectifs pour les phénols.

3.4 Teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes estimée par la méthode de chlorure d'aluminium pour chaque extrait à partir d'une gamme étalon établie avec différentes concentrations de quercétine (l'équation standard de courbe : $y = 36.471x - 0.0691$; $R_2 = 0,9982$). Les résultats obtenus sont exprimés

en mg équivalent de quercétine par g de l'extrait (mg EQ/g EX). L'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de quercétine utilisé dans la gamme étalon, $R^2 = 0,9982$.

Pour le quercétine qui est le standard utilisé, les résultats sont présentés dans la **figure 14** :

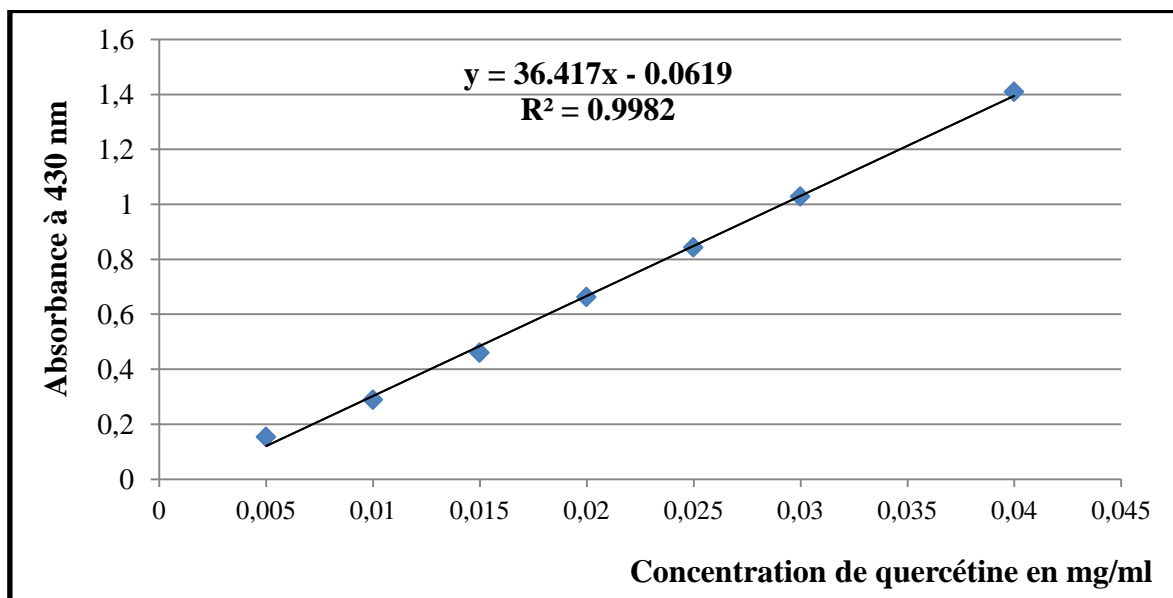


Figure 14 : Droite d'étalonnage de quercétine .

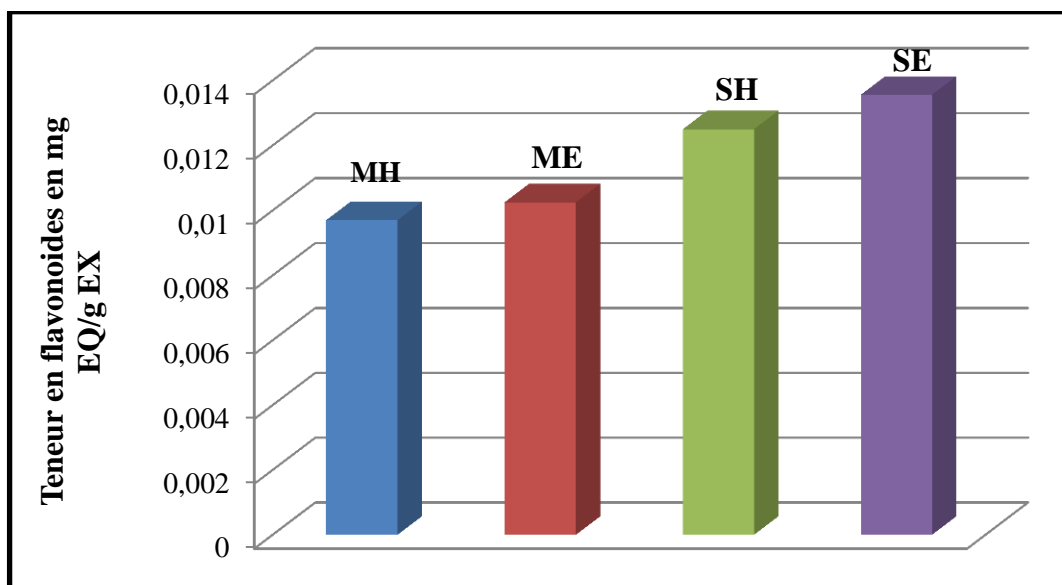


Figure 15 : Teneurs en flavonoïdes dans l'extrait de 2 phases (éthanol et hexane) obtenue par la macération et Soxhlet équivalent de quercétine.

Les résultats présentent la teneur en flavonoïdes des différents extraits *d'Urtica dioica* est comprise entre $(0,01356 \pm 0,0028$ et $0,0097 \pm 0,048$ mg EQ/g d'EX), et parmi les solvants étudiés, l'éthanol présente l'efficacité d'extraction en flavonoïdes la plus élevée avec une teneur maximale observée en Soxhlet.

Pour la macération, les teneurs des flavonoïdes sont voisins entre l'éthanol et l'hexane ($0,01025 \pm 0,0049$ et $0,0097 \pm 0,048$ mg EQ/g d'EX) respectivement. Ces teneurs montrent que l'éthanol est plus sélectif que l'hexane pour l'extraction de ce type de molécules.

Pour l'extraction par Soxhlet et par comparaison avec la macération pour les deux solvant étudiés, les teneurs sont de $0,01356 \pm 0,0028$ et $0,0125 \pm 0,07$ mg EQ/g d'EX obtenus par Soxhlet avec l'éthanol et l'hexane consécutivement, donc l'éthanol reste toujours le solvant d'extraction le plus sélectif que l'hexane, et ces résultats montrent que l'extraction de type Soxhlet permet d'améliorer l'extractabilité des flavonoïdes que la macération, donc Soxhlet est la méthode la plus efficace pour notre étude. Cela peut être expliqué par la saturation et la polarité du solvant d'extraction, et aussi signifie que la température semble avoir un effet significatif sur la teneur en composés phénoliques totaux extraits qui est augmente avec la température.

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

Quelle que soit la méthode d'extraction, l'éthanol est le solvant le plus efficace pour l'extraction des flavonoïdes. Le solvant est donc le paramètre principal pour une amélioration de l'efficacité d'extraction des flavonoïdes.

Maisuthisakul et al. (2008) ont constaté que la teneur totale des flavonoïdes des extraits éthanoliques de 28 plantes est liée à la teneur des composés phénoliques totaux.

Les travaux de **Pourmorad et al. (2006)** ont montré que la teneur en flavonoïdes dans les feuilles d'*Urtica dioica* représente une différence qui peut être expliquée par le fait que la méthode d'extraction.

3.5 Activité antioxydante des extraits phénoliques d'*Urtica dioica*

L'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de l'équivalence en acide ascorbique, en acide gallique, et en quercétine ; la méthode consiste à comparer l'absorbance de nos échantillons à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration en l'un des étalons. Les deux types de tests que nous avons utilisés pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits sont: piégeage du radical DPPH et le test pouvoir réducteur.

3.5.1 Test de piégeage du DPPH

Les graphes ci-dessous représentent la variation du pourcentage du pouvoir inhibiteur en fonction de la concentration de chaque extrait et de standard.

En utilisant différentes concentrations des extraits : 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; et 2,5mg/ml, et de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 $\mu\text{g/ml}$ de standard (acide gallique).

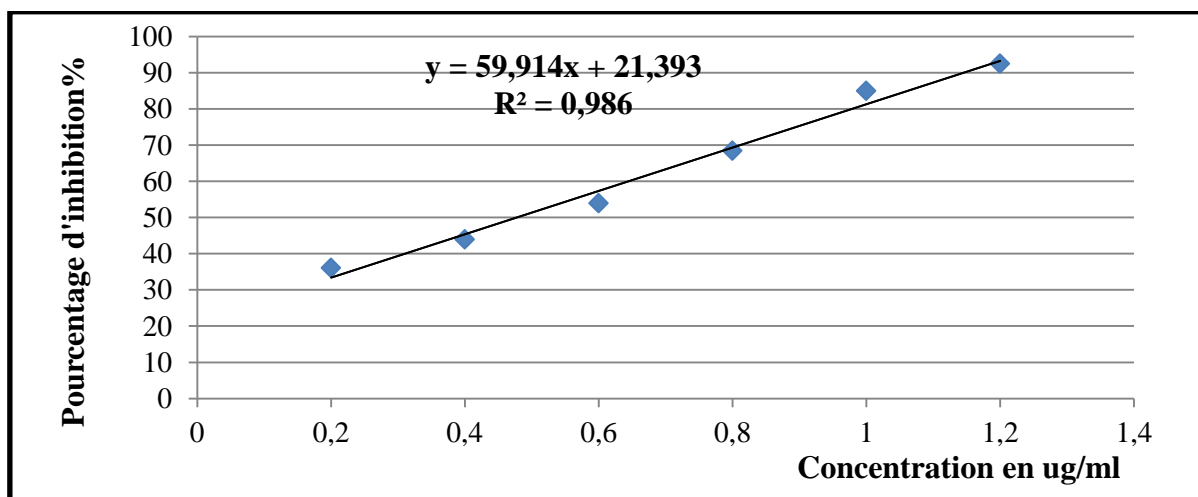


Figure 16 : Activité antioxydante de l'acide gallique vis-à-vis de DPPH.

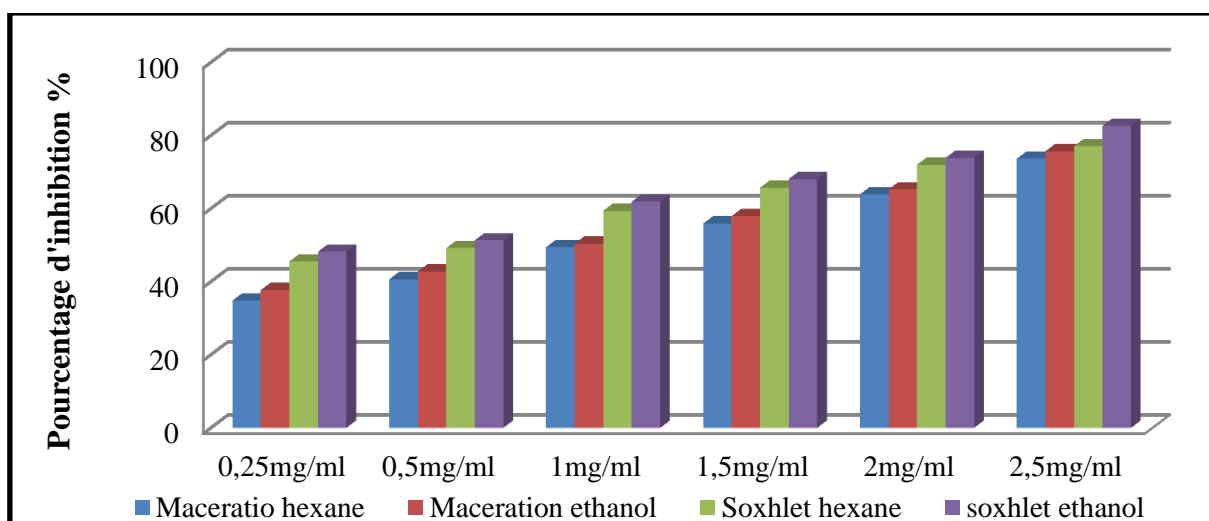


Figure 17 : Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• des antioxydants des extraits testés (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

D'après les résultats représentés dans les (figures 16 et 17), il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour le

standard (l'acide gallique) ou pour les différents extraits de la plante.

On a remarqué que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour les extraits était inférieur à celui de standard pour toutes les concentrations utilisées.

Pour une concentration de 1.2 $\mu\text{g/ml}$ le standard ont révélé un pourcentage d'inhibition de DPPH de 92.48%, concernant l'extrait éthanolique obtenue par Soxhlet avec une concentration de 2.5 mg/ml, le pourcentage d'inhibition de DPPH est de 82.63% ; ces pourcentages sont correspond à une inhibition totale du DPPH reflétée par la décoloration complète du DPPH du violet en jaune pâle.



Solution fraîche de DPPH sans échantillon.

Décoloration du violet
au jaune



Solution de DPPH mise à réagir avec l'échantillon

Figure 18 : Résultats du test DPPH.

Dans la **figure 18** la décoloration du DPPH due l'activité antioxydante des extraits de différentes concentrations qui sont de 2,5 mg/ml à gauche (jaune foncée) jusqu'à 0,25 mg/ml à droite (violet claire).

L'analyse des résultats du test DPPH a montré une différence significative entre les extraits éthanoliques et les extraits de l'hexane pour chaque technique d'extraction et pour toutes les

concentrations testées.

Pour toutes les concentrations testées, le plus haut pourcentage d'inhibition du radical DPPH, est obtenu avec les extraits de Soxhlet suivi par les extraits de la macération.

Cependant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH le plus élevé est dans la concentration de 2.5 mg/ml, de 82,63% représenté par l'extrait éthanoliques, suivi par 77,08% représenté par l'extrait de l'hexane, suivie par 75,7% est assurée par l'extrait éthanolique de la deuxième méthode, et la dernière est de 73,66% est assurée par l'extrait de l'hexane.

La technique du radical DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est l'une des méthodes la plus couramment employée. Elle est rapide, facile à mettre en œuvre et s'effectue à température ambiante, ce qui permet l'élimination de tous risques de dégradation thermique des molécules testées (**Katalinic et al., 2006**). Une diminution de l'absorbance pour un mélange est due à la décoloration des réactifs impliqués dans la réaction en indiquant une activité élevée de l'effet scavenger du radical DPPH par les antioxydants mis en réaction.

L'efficacité d'un antioxydant peut être définie comme sa capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne et prévenir le stress oxydatif (**Molyneux, 2004**).

L'analyse des résultats a permis de démontrer que les solvants utilisés et les concentrations considérées exercent une influence sur les activités antioxydantes d'*Urtica dioica* comme par **Kataki et al.(2012)** la différence de l'activité antioxydante des extraits de la même plante est peut être due à la différence de protocole de dosage suivie ainsi qu'à la méthode d'extraction utilisé et la polarité du solvant utilisé.

Dans une étude réalisée par **Zeipina et al.(2015)** sur l'efficacité d'*Urtica dioica* à piéger le radical DPPH, des pourcentages d'inhibitions compris entre 75,5 et 78,5%. Ces résultats sont plus ou moins similaires à ceux obtenus dans la présente étude.

La capacité antioxydant des différents extraits a été déterminée à partir de l'IC50, c'est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (**Hobiet et Eddouks, 2016**).

Nous avons déterminés pour chaque extrait, la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical libre DPPH ou IC50. À partir des équations des régressions linéaires des graphes.

D'après les résultats ; l'IC₅₀ obtenu pour l'acide gallique (0.47µg/ml), utilisés comme référence, est bien plus inférieur à ceux des extraits et donc, une activité antioxydante très élevée. L'extrait éthanolique avec Soxhlet présent un IC₅₀ (de l'ordre de 343 ± 0,012 µg /ml) largement inférieur à ceux des autres extraits, dont l'extrait de l'hexane avec Soxhlet présent un IC₅₀ (de l'ordre 485 ± 0.014 µg /ml) suivi par l'extrait éthanolique avec macération (996 ± 0.019 µg /ml) et enfin l'extrait de l'hexane avec macération (1100 ± 0.014 µg /ml).

L'analyse des résultats a montré que le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est influencé par le type du solvant et la technique d'extraction. Donc l'éthanol est le meilleur solvant et Soxhlet est la meilleure méthode d'extraction dans notre étude.

Dans une étude **Mavi et al.(2004)** ont obtenu une IC₅₀ de 335µg/ml ce qui veut dire l'extrait méthanolique a été plus efficace que les extraits de notre étude.

3.5.2 Pouvoir réducteur du fer

Les métaux de transition comme le fer sont des catalyseurs importants pour la génération des radicaux et peuvent ainsi stimuler la peroxydation lipidique, donc tous les ions des métaux de transition ayant deux ou plusieurs états de valence sont de puissants prooxydants (**Pitchaon, 2011**). La capacité de réduire le Fer des extraits d'*Urtica dioica* est mesurée en suivant l'inhibition de la formation d'un complexe entre l'ion ferreux (Fe²⁺) libéré après ionisation du FeCl₂ et la Ferrozine, cette inhibition dépend de la concentration et du type de composés antioxydants présents dans chaque extrait (**Bourgou et al., 2008**).

Les résultats de l'étude de la capacité des extraits d'*Urtica dioica* à réduire le fer selon la concentration testée (2,5 mg/ml) et le solvant et type d'extraction utilisés présentés dans la **figure 19** :

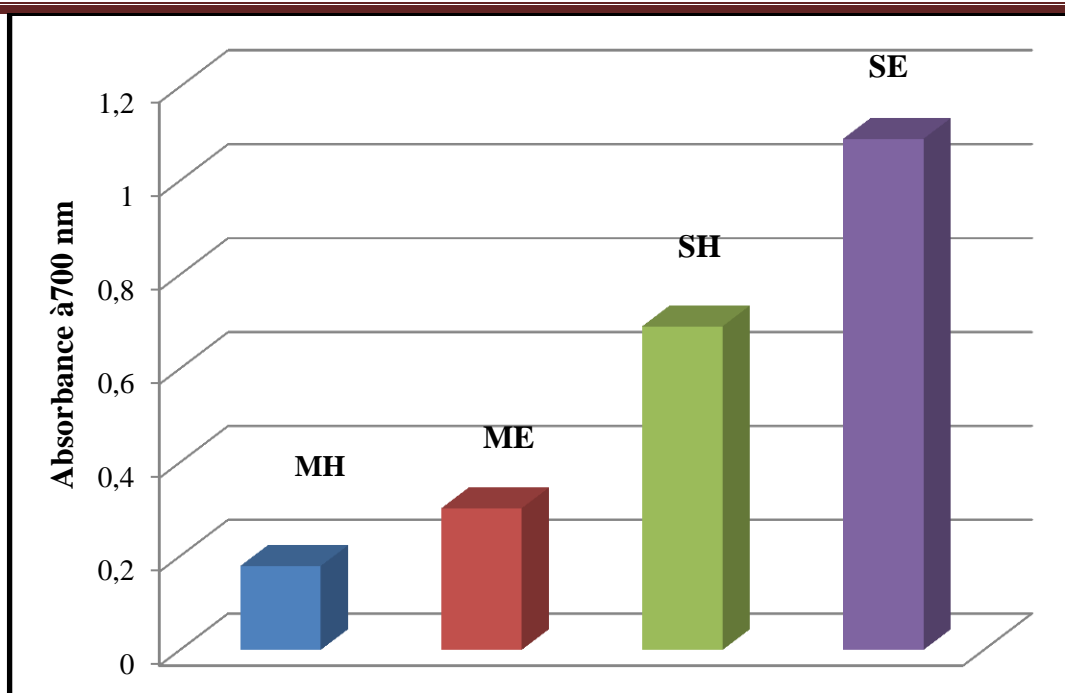


Figure 19 : Effet de la concentration, du solvant et type d'extraction sur l'activité réductrice du fer des extraits d'*Urtica dioica* L.

On utilise trois standards l'acide ascorbique, l'acide gallique et le quercétine avec une seule concentration (2.5 mg/ml), dont les résultats sont présents dans la **figure 20** :

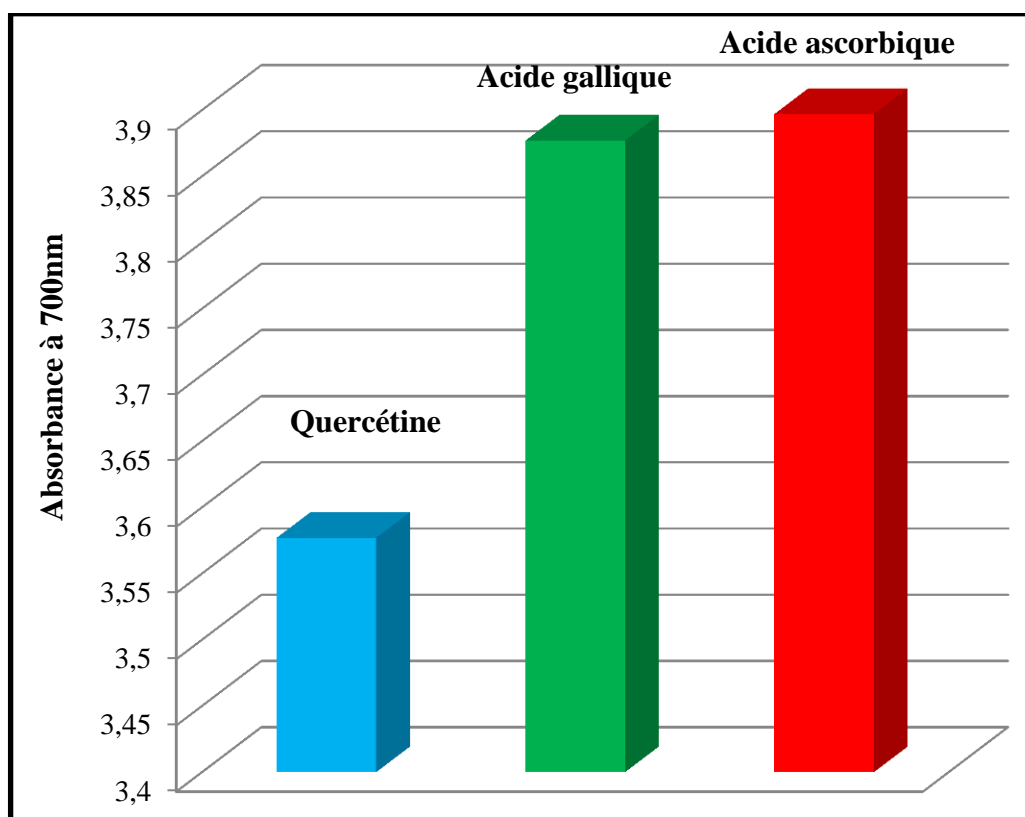


Figure 20 : La capacité réductrice des standards utilisés.

Les résultats obtenus montrent que la capacité des extraits de réduire le Fer est largement inférieure à celle des standards. A la concentration de 2.5 mg/ml, le pouvoir réducteur est beaucoup plus important dans l'acide ascorbique avec (DO = 4), suivi par l'acide gallique (DO = 3.98), et enfin quercétine (DO = 3.68)

Les résultats ainsi obtenus montrent clairement et toujours que l'extrait de Soxhlet avec l'éthanol présente l'activité la plus élevée avec une plus forte absorbance $1,089 \pm 0,08$ très supérieur à la valeur obtenue par Soxhlet avec l'hexane $0,69 \pm 0,086$, pour les extrait de la macération, la macération avec l'éthanol présente une absorbance plus inférieure à celle obtenue par Soxhlet qui est de $0,307 \pm 0,0063$, alors que l'activité la plus faible a été obtenue par l'extrait de macération avec l'hexane $0,179 \pm 0,0021$, donc notre résultats a montré toujours que le Soxhlet est la méthode la plus puissante n'oubliez pas que l'éthanol est le plus efficace solvant.

La différence dans l'activité antioxydante des extraits des feuilles d'*Urtica dioica* par différents solvants peut être expliquée par le fait que les polarités des composés bioactifs dans chaque extrait peuvent être différentes, et le type de solvants peuvent influencer sur leur solubilité et leur pouvoir réducteur (Turkman *et al.*, 2006 ; Jayaprakasha et Patirol, 2007). Selon Gülçin *et al.*(2004) ; Katakai *et al.*(2012), *Urtica dioica* est très riche en composés bioactifs qui manifestent un pouvoir réducteur important, ce qui concorde avec nos résultats.

Selon Schinella *et al.*(2010), la capacité des antioxydants à réduire des ions de métaux de transition est fortement dépendante du nombre de composés antioxydants mis en réaction, et que la capacité à réduire ces métaux réduit leurs concentration, entraînant la réduction de la peroxydation lipidique. Ce qui implique que la plante est très riche en antioxydants polaires. Le pouvoir réducteur que possèdent nos extraits est important, il permet d'inhiber la peroxydation.

Les variations de l'activité réductrice des radicaux libres, sont, en général, directement liées aux taux des composés phénoliques présents dans la plante récoltée (Yesilyurt *et al.*, 2008).

Il a été reporté que les agents chélateurs, qui forment des liaisons avec le métal, sont considéré comme des antioxydants secondaire parce qu'ils réduisent le potentiel redox et par conséquent ils vont stabiliser la forme oxydée du métal (**Gordon, 1990**).

Notre étude a porté sur l'espèce *Urtica dioica* L qui appartient à la famille des *Urticaceae*. Cette famille regroupe des plantes médicinales, utilisées pour leurs constituants moléculaires de métabolites secondaires qui participent dans la défense contre les insectes, en revanche l'homme les utilise dans le domaine pharmacologique.

D'après l'enquête ethnopharmacologie effectuée sur les plantes médicinales, *Urtica dioica* reste parmi les moins utilisées dans la médecine alternative Algérienne. Pour cela l'objectif assigné dans cette étude est axé sur le dosage des composés phénoliques, flavonoïdes ainsi d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits obtenus à partir de la partie aérienne d'*Urtica dioica* récoltées dans la région de Bordj Bou Arreridj.

Dans le premier volet de ce travail est séchage puis détermination du taux d'humidité de la partie aérienne de la plante *Urtica dioica*, Cette humidité demeure toujours un indice très important car elle donne une idée sur la qualité de notre échantillon.

Dans le deuxième volet, nous avons procédé à l'extraction des molécules bioactives par macération et par Soxhlet en utilisant deux types du solvant de différentes polarités : l'éthanol (polaire) et l'hexane (apolaire).

Dans le troisième volet, nous avons mis en évidence et évalué l'activité antioxydante de ces extraits.

D'après nos résultats, la partie aérienne d'*Urtica dioica* renferment un taux important en eau de l'ordre de 81,91% qui se traduit par 18,09% de matière sèche.

Les analyses statistiques ont montré que l'extrait de Soxhlet avec l'éthanol permet d'obtenir un rendement plus fort que les autres extraits, et qui est le plus efficace pour l'extraction des composés phénoliques, et en flavonoïde à partir de la partie aérienne de l'ortie.

Le potentiel antiradicalaire des différentes extraits d'*Urtica dioica* a été déterminé par deux techniques: la méthode de piégeage du radical DPPH à différentes concentrations, et le teste de pouvoir réducteur du fer à une seul concentration, les résultats montrent que ces extraits possèdent une bonne activité antioxydante qui varie en fonction du solvant d'extraction, de la concentration et la méthode d'extraction, dont l'extrait de Soxhlet avec l'éthanol possède une forte activité inhibitrice, et doté d'un pouvoir réducteur fort que les autre extraits.

Donc, cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques.

L'étude réalisée sur les corrélations entre les teneurs en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes, et les différents tests de l'activité antioxydante, nous a permis d'aboutir à ces résultats suivants :

- ✓ La nature du solvant et la méthode d'extraction affectent significativement les rendements et la teneur en métabolite secondaire ainsi que l'activité antioxydante des extraits d'*Urtica dioica*.
- ✓ L'existence d'une très bonne corrélation entre l'activité antiradicalaire et les composés phénoliques des extraits d'*Urtica dioica*, témoignant ainsi que les teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes modulent l'activité antioxydante.

