



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQ



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Ecologie et physiologie végétale

قسم

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Métabolisme secondaire et molécule bioactive

Intitulé :

**Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes
Chez *Urtica dioica* L. et évaluation de leur
Pouvoir antibactérien**

Présenté et soutenu par : GUESSOUM Djaber

Le : 25/06/2015

LECHEHEB Hassan

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme HAMMOUDA Dounia (MCB - UFM Constantine).

Rapporteur : Mme BOUCHOUKH Imane (MAA- UFM Constantine).

Examineurs : Mme KARA Karima (MAA - UFM Constantine).

***Année universitaire
2014 – 2015***

Remerciement :

AVANT DE COMMENCER , Nos remerciements vont en particulier à ALLAH le tout puissant.

Aussi, nous voudrions exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur, Madame Bouchoukh Imane , maître assistante « A » à l'université Constantine1 pour son soutien et sa compréhension pertinente de ce travail, merci Madame de nous avoir guidés et orientés durant l'accomplissement de ce travail. Avec beaucoup de patience et de savoir faire.

Nous tenons à remercier ainsi la présidente de jury, Madame Hamouda Dounia, Maître de conférence à l'université Constantine1 et l'examinatrice Madame Kara Karima, Maître assistante « A » à l'université Constantine 1, d'avoir accepter d'évaluer notre travail

A tous ceux qui nous ont aidés, qu'ils trouvent ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

المخلص :

يتضمن هذا العمل الدراسة الكمية و الكيفية لنوع كيميائي من مركبات الايض الثانوي وهي الفلافونويدات المستخلصة من نبات الحرايق , الذي ينمو في منطقة البحر الأبيض المتوسط , والمعروف عنه بقدرته العلاجية كنبات طبي .

كما تطرقنا إلى إثبات وجود وكذا تحديد الأنواع المميزة لهذا المركب الفينولي في هذا النبات عن طريق الفصل الصبغي الكروماتوغرافي ذو الطبقة الرقيقة

استكمل هذا العمل بتقييم إمكانية و فعالية هذه المركبات المستخلصة في القوة ضد البكتريا علي نوعين من البكتيريا والتي أظهرت نتائج ايجابية.

الكلمات المفتاحية

النباتات الطبية - الحرايق- الايض الثانوي - الفلافونويدات - الفصل الصبغي الكروماتوغرافي ذو الطبقة الرقيقة - البكتيريا - القوة المضادة للبكتريا.

Résumé :

Ce travail comprend l'étude qualitative et quantitative de la nature chimique des composés du métabolisme secondaire particulièrement les flavonoïdes

Les Extraits de la plante *Urtica dioica*, qui pousse dans la région méditerranéenne, sont connus pour leur capacité thérapeutique comme plante médicinale.

Nous avons essayé de déterminer les espèces spécifiques de ces composés phénoliques en séparant par chromatographie sur couche mince (CCM) les extraits.

Ce travail a été complété par l'étude de l'efficacité de ces composés dans le pouvoir antibactérien sur deux types de bactéries. Les résultats sont positifs.

Mots clés :

Plantes médicinales - *Urtica dioica* - métabolismes secondaire - les flavonoïdes
- chromatographie sur couche mince (CCM) - bactéries - pouvoir antibactériennes.

Summary :

This work includes qualitative and quantitative study of the chemical nature of the compounds is secondary metabolisms she flavonoids

The extract of the plant *Urtica dioica* , which grows in the Mediterranean region, it is known for its therapeutic capacity as a medicinal plant.

As we talked to prove the existence and determine the specific species of this phenolic compound by separating with thin layer chromatography (TLC)

This work was completed to assess the feasibility and efficacy of these compounds in the antibacterial power of two types of bacteria this showed positive results.

Keywords :

Medicinal plant - *Urtica dioica* - secondary metabolisms - flavonoids - separating with thin layer chromatography (TLC) - bacteria - the antibacterial power.

Liste d'abréviation

FED : fraction éther di éthylique.

FAE : fraction acétate d'éthyle.

FBU : fraction butanol.

FAQ : fraction aqueuse.

CCM : chromatographie sur couche mince

Liste des figures :

Figure 01: structure de Phénol.....	13
Figure 02 : Squelette moléculaire de base des Flavonoïdes.....	15
Figure 03 : structures de base des flavone.....	17
Figure 04 : structures de base des flavonol.....	17
Figure 05 : structures de base des flavonone.....	18
Figure 06 : structures de base des flavanol.....	18
Figure 07 : structures de base des chalcone.....	19
Figure 08 : structures de base des anthocyane.....	19
Figure 09 : <i>Urtica dioica</i>	28
Figure 10 : l'extrait des feuilles.....	29
Figure 11 : l'évaporateur rotatif de laboratoire.....	31
Figure 12 : Clarification des dépôts de l'échantillon.....	34
Figure 13 : plaque CCM après séchée.....	35
Figure14 : Préparation de milieu d'culture.....	37
Figure15 : Les disques avec (l'extrait).....	37
Figure 16 : Résultats des tests du criblage des flavonoïdes par l'extrait des feuilles.....	40
Figure17 : par l'UV à (254 nm)de plaque CCM.....	41
Figure 18 : Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes les (4 phases) sur l'espèce bactérienne d « <i>Escherichia coli</i> ».....	43
Figure 19: Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes les (4 phases) sur l'espèces bactérienne d' « <i>bacillus cereus</i> ».....	43
Figure 20 : Diamètre des zones d'inhibition des fractions de l'extrait contre différentes Bactéries.....	44

Liste de tableau

Tableau 01 : Les principales classes de Compose phénoliques	13
Tableau 02 : Les classe des flavonoïdes	19
Tableau03 : les spots qui existe sur la plaque CCM.....	42
Tableau04 : Les résultats des diamètres des zones d'inhibition.....	43

Table des matières

Partie I: Synthèses bibliographique :

Introduction générale

Chapitre I : Description de la plante

I-1-La famille <i>Urticacées</i>	01
I-1-1- Distribution.....	01
I-1-2- Appareil végétatif.....	01
I-1-2- Anatomie.....	01
I-1-3 Reproduction.....	02
I-1-4- Phylogénie.....	02
I-1-5- Intérêts	03
I-2- Dénomination.....	03
I-3- Classification de la plante.....	04
I-4- Caractéristiques et botanique de <i>l'Urtica dioica</i>	04
I-5- Biotope et caractères écologique.....	05
I-6- La phytochimie d' <i>urtica dioica</i>	05
I-7-1- La feuille.....	06
I-7- les parties de la plante (<i>urtica dioica</i>	06
I-7-2- les fleurs.....	06
I-7-2-1- fleurs femelles.....	06
I-7-2-2- fleurs male.....	06
I-7-3- le fruit et la graine.....	06
I-7-4- les racines.....	07
I-7-5- les poils (L' action urticant).....	07
I-8- propriétés pharmacologiques de <i>l'urtica dioica</i>	07
I-9- composition chimique des feuilles.....	08
I-10- Principales utilisations thérapeutiques.....	08
I-10-1- utilisations thérapeutiques traditionnelle	08
I-10-2- utilisations thérapeutiques actuelle.....	08
I-11- Les contre-indications.....	09

Chapitre II: Le métabolismes secondaires

II-1-Les métabolites secondaires.....	10
II-1-1- Rôle biologiques des métabolismes secondaires	11
II-2- les composés phénoliques	11
II-2-1-Définition des polyphénols (Composés phénoliques).....	11
II-2-2-les principales classe des composées phénolique.....	13
II-2-3- les flavonoïdes.....	15
II-2-3-1- la couleur.....	16
II-2-3-2- la structure chimiques des flavonoides	16
II-2-3-3- Les différentes classes des flavonoïdes.....	17
II-2-3-3-1- les flavones.....	17
II-2-3-3-2-les flavonols.....	17
II-2-3-3-3- les flavonones.....	17
II-2-3-3-4- les flavanoles.	18
II-2-3-3-5- les chalcones.	18
II-2-3-3-6- les anthocyanidines.	19
II-2-3-4- Les principales classes des flavonoides s'inspire de Bruneton, (2009).....	19
II-2-3-5- propriétés physico-chimique des flavonoïdes.....	22
II-2-3-6- propriétés biologiques.....	22
II-2-3-6-1- Activité antioxydante.....	22
II-2-3-6-2- Inhibiteurs enzymatiques.....	23
II-2-3-6-3- Interactions avec les facteurs de transcription.....	23
II-2-3-6-4- effets anti-microbiennes.....	23
II-2-4- les coumarines.....	24
II-2-5-Les tanin.	24
II-2-6- Les terpènes.....	25
II-3-Les composés azotiques (alcaloïdes)	26

Partie II: Matériels et méthodes

II -1- Matériel végétale utilisé.....	28
II -2- Criblage des flavonoïdes.....	28
III- Extraction des flavonoïdes.....	30

III- 1- Macération et préparation de l'extrait méthanoliques.....	30
III- 2 - Evaporation à sec.....	31
III- 3 - L'évaporateur rotatif	31
III-4-Fractionnement l'extrait bruts par extraction liquide-liquide (ELL)	31
IV- Séparation des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM).....	32
IV-1 - Définition	32
IV-2 –Principe.....	32
IV-3 - Préparation de la phase mobile (l'éluant).....	33
IV-4 - Préparation de la phase stationnaire (fixe).....	33
IV-5 - La préparation de la cuve	34
IV- 6 - Dépôts de l'échantillon	34
IV- 7 - L'application.....	34
IV- 8 - Développement de la chromatographie.....	35
IV- 9 - La révélation.....	35
V- Etude de l'activité antibactérienne.....	35
V-1- Objectif	35
V-2 -principe	36
V -3 – Préparation des souches bactériennes.....	36
V -4 - L'extrait des flavonoïdes utilisé.....	36
V -5 – Préparation du milieu de culture.....	36
V -6 - Préparation des disques.....	37
V -7 – Culture des bactérie	37
V -8 – Dépôt des extraits.....	37
V -9 – La conservation des boites de pétri.....	38

Partie III : Résultat et discussion

I - Criblage des flavonoïdes.....	40
-----------------------------------	----

I-1-Résultat	40
I-2- Discussion	40
II- Séparation l'extrait méthanolique par chromatographie sur couche mince	41
II-1-Résultat	41
II-2-Discussion	42
III-Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes	43
III-1-Résultat	43
III-2-Discussion.....	44
Conclusion.....	45
Références bibliographique.....	46

Introduction

A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (Iserin, 2001).

La phytothérapie qui repose sur des remèdes naturels est bien acceptée par l'organisme, et souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques comme l'asthme ou l'arthrite (Iserin et al, 2001).

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (Farnsworth et al, 1986).

Environ 35 000 espèces de plantes sont employées par le monde à des fins médicinales, ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent de répondre à un besoin important malgré l'influence croissante du système sanitaire moderne (Elqaj et *al.*, 2007).

L'humanité a utilisé diverses plantes qui existent dans leurs habitats, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir très vastes et riches par des composés potentiels attribués 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.

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, les flavonoïdes etc.... , cette molécules est représentes une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie (médicamentes ; ex l'aspirine contre le maux de tête) , ou l'agroalimentaire.

L'objectif de notre travail est de démontrer la richesse d'une plantes médicinale en flavonoïdes et à déterminer leurs propriétés biologiques (bienfaits, inconvénient de l'ortie), pour cela notre étude englobe deux aspects, dont le premier est d'ordre phytochimique basé

principalement sur l'extraction des flavonoïdes, il porte également sur le diagnostic et la séparation des principaux flavonoïdes par l'utilisation de la technique de chromatographie sur couche mince (CCM).

Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes contre *E. coli* et *bacillus cereus*.

PARTIE I

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: Description de la plante :

I-1-La famille de *Urticacées* :

I-1-1-Distribution :

Les *Urticaceae* sont répandues dans la plupart des régions tropicales. Quelques genres, en particulier *Urtica*, sont originaires des régions tempérées.

I-1-2-Appareil végétatif :

Les *Urticaceae* sont une famille de plantes herbacées ou de petits arbustes généralement caducs, quelquefois lianes cents. Les arbres sont rares, et limités à une des tribus de la famille.

Les feuilles sont alternes ou opposées, stipulées, ordinairement trinervées. Le limbe est simple, et les marges sont quelquefois entières, plus fréquemment dentées à crénelées. Tiges et feuilles sont souvent pubescentes.

I-1-3-Anatomie

Les *Urticaceae* comportent des plantes qui possèdent des poils urticants couvrant tiges et feuilles de beaucoup de ses représentants (*Urtica*, *Fleurya*, *Laportea*, *Urera*, *Girardinia*). La raideur des poils est due à une minéralisation partielle de la paroi cellulosique (silicification et calcification) avec présence fréquente de cystolithes. Chez d'autres genres, on peut rencontrer des poils tecteurs unicellulaires et des poils sécréteurs à tête unicellulaire. L'appareil sécréteur est constitué de canaux lysigènes, de poches ou de cellules à mucilage. La tige renferme des fibres péricycliques longues et abondantes, ayant souvent une bonne valeur textile.

Les composés urticants sont principalement l'histamine, l'acétylcholine, 5-hydroxytryptamine et une autre substance, inconnue, responsable de la douleur (E. L. Thurston and N. R. Lester 1969). Lors d'une pique, le sommet des poils urticants rigides casse sous l'effet du contact, laissant l'extrémité brisée et pointue pénétrer dans la peau et évacue son contenu. Ces poils urticants agissent comme de véritables piques hypodermiques miniatures.

On observe aussi des fibres péricycliques cellulosiques ou peu lignifiées, très longues, parfois utilisées comme textile, et un périoderme superficiel.

I-1-4-Reproduction

Les fleurs, actinomorphes, petites et verdâtres, sont généralement unisexuées (dioecie ou monécie), rarement bisexuées. Elles sont réunies en cymes contractées, axillaires ou terminales, groupées elles-mêmes en panicules, en épis ou en chatons. Les fleurs solitaires sont exceptionnelles. Asépale, le périanthe est composé de 4-5 pétales sépaloïdes, libres ou diversement connés, parfois absents, persistants ou accrescents. La fleur mâle comporte 4-5 étamines aux anthères souvent renversées dans le bouton floral, basifixes, biloculaires et à dehiscence longitudinale. Les fleurs femelles possèdent parfois quelques staminodes et un ovaire supère, libre ou adné au périanthe. Unicarpellé, il ne contient qu'un seul ovule basal et érigé. Le style est unique, et le stigmate a une forme variable.

Les types d'organisation des appareils reproducteurs sont très variés et intéressants, car il est possible de les décomposer en unités élémentaires. R. Rivières a démontré ainsi que les fleurs d'*Urticaceae* sont en réalité des pseudo-fleurs, formées par association d'unités florales plus simples. Elles correspondraient donc à des états préfloraux, et le périanthe serait d'origine bractéale. En considérant les inflorescences, on découvre une série dont les premiers termes sont ramifiés et lâches (*Urera*) et les derniers compacts (*Parietaria cretica*), cette série phylogénétique présentant tous les intermédiaires. La pollinisation est anémophile. Des cas d'apogamie sont connus.

Le fruit est un akène, parfois une drupe. Il est souvent enveloppé par le périanthe accrescent. La graine possède un albumen huileux et un embryon droit. La dissémination est mécanique (*Pilea*, *Elatostema*) ou bien se fait par les oiseaux (*Urera*). La géocarpie se rencontre chez *Fleurya podocarpa*.

I-1-5-Phylogénie

Le caractère d'abord infléchi des étamines, la présence d'un seul carpelle, dont l'ovule est orthotrope, et l'absence de laticifères distinguent les *Urticaceae* des familles voisines. La famille est divisée en cinq tribus fondées principalement sur les différences florales.

Les *Urticeae* se distinguent par leurs poils urticants caractéristiques (*Urtica* , *Urera*, *Laportea*...).

Les Procridaeae représentent la plus grande tribu. Le périanthe des fleurs femelles est trilobé, et le stigmate a l'apparence d'un pinceau. Les principaux genres sont *Pilea*, *Elatostema*, *Pellionia*.

La petite tribu des Forkskohleae possède des fleurs mâles réduites à une seule étamine, et ne comprend que le petit genre *Forskohlea*.

Les deux tribus des Boehmerieae (*Boehramia*, *Maoutia*...) et des Parietarieae (*Paretaria*...) se différencient par la présence d'un involucre de bractées souvent soudées chez la dernière.

I-1-6-Intérêts

Parmi les *Urticaceae* les plus répandues dans les régions tempérées, il y a les orties, plantes nitrophiles dont l'action urticante est due aux acides formique et résinique : l'ortie brûlante (*Urtica urens*) est annuelle, monoïque, alors que la grande ortie (*Urtica dioica*) est vivace. Autrefois consommée, cette dernière sert à la préparation industrielle de la chlorophylle.

Les ramies blanche (*Boehmeria nivea*) et verte (*Boehramia utilis*), non urticantes, sont de grandes herbes vivaces, originaires de Chine, cultivées pour leurs fibres péricycliques et libériennes particulièrement résistantes et d'excellente qualité (soie végétale) mais qu'il est difficile d'isoler. Elles servent à la fabrication de billets de banque. Les plantes sont multipliées par fragments de rhizomes. Elles sont sensibles au photopériodisme.

Les *Pilea* sont des herbes annuelles ou vivaces des régions intertropicales. *Pilea microphylla*, plante ornementale d'Amérique tropicale, est appelée artillery plant, car elle projette ses graines au loin.

Les *Parietalis* (pariétaires) sont de mauvaises herbes nitrophiles cosmopolites. Les *Elatostema* d'Afrique occidentale entrent dans la fabrication de la poudre à fusil.

I-2- Dénomination :

Le nom latin (universel) de l'ortie est *urtica dioica* L., ortie se disait *urtica* en latin mot venant lui - même du verbe urere signifier brûler par extension urticaire , urticant urtication .se disent de tout espèce de tout démangeaisons similaires à celles provoquées par les piquantes d'orties.

Le nom d'espèce *dioica dioique* en français, concerne un végétale dont les fleurs males et femelles sont portées par des pieds différents. (bertrnd , 2008 ; valnet , 1992)

Dans l'*Urtica dioica* L , le (L) : fait référence à la classification de carl linné(1707-1778).

I-3 - Classification de la plante :

Règne: *Plantae*

Classe: *Mgnoliopsida*

Ordre: *Urticale*

Famille: *Urticaceae*

Genre: *Urtica*

Genre espèce: *Urtica dioica* L

I-4 - Caractéristiques et botanique de l'*Urtica dioica* :

La grande ortie (*Urtica dioica*) encore appelée ortie dioïque ou ortie commune, est un ortie d'origine eurasiatique qui est aujourd'hui présente dans le monde entier. C'est une plante herbacée, vivace.

Détestée en raison des brûlures qu'elle provoque, privée des charmes de la couleur et du parfum, cette mal-aimé n'est pourtant pas dénuée d'intérêts.

Outre ses usages alimentaires, agricoles, industriels et médicaux, cette plante aux fleurs unisexuées, portées soit par des pieds différents (diécie), soit par le même pied (monœcie très rare), offre aux chercheurs une occasion unique pour comprendre les mécanismes génétiques de la séparation sexuelle des plantes.

L'ortie ou *Urtica dioica* L, est une plante vigoureuse, vivace et herbacée avec une taille de 60 à 120 cm de hauteur. Elle forme des colonies grâce à son système racinaire qui lui permet de se propager rapidement (Bertrand et Jeanne, 2008).

- Cette plante est mauvaise herbe étant nitrophile, il est très commune autour des habitations, dans les décombres et les fossés.
- Il porte, sur les deux faces, des poils urticants et des poils tecteurs, plus abondants sur les nervures et les bords de la face inférieure.
- Pétiole et tige portent aussi des poils urticants.
- Les fleurs généralement unisexuées, sont disposées en longues grappes ramifiées insérées à l'aisselle des feuilles.
- Les poils urticants de l'ortie de 2 mm de long constitués d'une seule cellule allongée et fuselée à pointe cassante, issue d'une base multicellulaire saillante.
- Les poils tecteurs sont plus petits (...700 µm).

- Les feuilles d'ortie sont riches en sels minéraux , en protéines , en vitamines , en carotènes et on compose phénoliques (flavonoïdes , acides phénols , scopolétole) et on note la présence de faibles quantités d'histamine , de sérotonine et d'acétylcholine .

I-5- Biotope et Caractères écologiques :

L'Ortie est une plante cosmopolite qu'on trouve dans le monde entier. C'est aussi une plante rudérale. Ce qui signifie qu'elle apprécie les endroits pollués qu'elle se charge d'assainir. En tant que plante nitrophile, elle suit la culture humaine et pousse spontanément jusqu'à 2500 m d'altitude, particulièrement sur les sols contaminés par les engrais (Preston *et al.*, 2002).

Agissant comme un puissant régulateur d'azote, c'est une plante bio-indicatrice. Au moment de sa décomposition, elle libère l'azote sous forme assimilable, ainsi disponible pour les plantes. Sa place dans l'assolement d'une exploitation, pourrait résoudre en partie les problèmes liés aux excès de nitrates dans les sols pollués. Elle peut donc être considérée comme une plante *CIPAN* (Culture Intermédiaire Piège à Nitrates) (Petiot *et al.*, 2010).

Elle se produit dans une grande variété d'habitats, comme les clairières des bois, les prairies non managées, broussailles, haies, bords des routes, jardins et champs. Elle est capable même de pousser au sein de vieux tas de ferraille. On la trouve plus rarement dans les régions de nature vierge. (Pojar et Kinnon, 1994).

Elle fait partie du groupe des plantes photosensibles. Grâce à son appareil photosynthétique, elle est en mesure de subsister dans des conditions de luminosité très variables (Bertrand *et al.*, 2004).

I-6- La phytochimie d'*Urtica Dioica* :

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des composés chimiques. Parmi ces derniers nous avons de nombreux composés appelés *métabolites primaires* et qui sont indispensables à leurs existences, ceux-ci englobent des protéines, des lipides, des fibres alimentaires et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et à la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux qui s'en nourrissent. De plus, les plantes synthétisent aussi une gamme extraordinaire d'autres composés appelés *métabolites secondaires* dont la fonction est loin de faire l'unanimité (Cox *et al.*, 1994).

I-7 - Les parties de la plante (*Urtica dioica*) :

I-7-1 - La feuille :

Urtica dioica est constituée de feuilles simples charnues, tombantes , dentelées , grossièrement en forme de cœur , et la tige sont recouverts de poils urticants blanc (Alternatine medicine review,2007).

Les feuilles simples à long pétiole sont opposées deux à deux , de couleur vert foncé – en raison de leur richesse en chlorophylle – et générale long de plus de 5 cm (schaffner,1992 ; moutsie,2008).

I-7 – 2 – Les fleurs :

Sont déposées en grappes ramifiées, allongées et pendentes ,les grappes se situent à l'aisselle des feuilles comme déjà dit , la *grande ortie* et dioïque car elle porte les fleurs femelles et male sur des plants différents, alors que l'ortie brulante est monoïque (fleurentin,2008 ;alternative medicine review,2007 ;boullard,2001).

I-7-2-1-Fleurs femelles :

Elles ont 4 sépales et un ovaire velu de couler verdâtre, les grappes qui les portent pendent , en particulier lorsque les graines se forment ,elles sont dépourvues de nectar (moutsie,2008).

- la formule florale est : $4 T + 1 C + 0 E + 0 P$

I-7-2-2-Fleurs male :

Elles ont 4 sépales et 4 étamines, elles sont portées par longues grappes serrées très rameuses , développées par paires ,à l'aisselles des feuilles .
chaque étamine libère environ 15000 graines de pollen jaune , à la réputation allergisante (moutsie,2008).

- la formule florale est donc : $4 T + 4 E + 0 C + 0 P$

I-7 - 3 - Le fruit et la graine :

Le fruit d'*urtica dioica* est constitué d'un akène ,formé dans un calice persistant , contient une graine provenant des panicules à maturité ,leur couleur sable à jaune – brun ,

de forme aplatie ,ovoïde et pointue ,mesure 1.0 à 1.5 mm de long sur 0.7 à 1.0 mm de large.

Son extrémité pointue porte des restes de stigmates pénicillés . ces fruits sont très souvent entourés de deux petites feuilles extérieurs , étroites ,et de deux feuilles intérieurs plus grandes ,larges et obovales de couleurs verte – ou de leurs restes .(wichtl et anton,2003).

I-7- 4 - Les racines :

Ce sont des rhizomes – tiges souterraines , jaunâtres , traçants et abondement ramifier qui développent chaque année de nouvelles pousses, d'où le caractère par fois envahissant de l'ortie ils fixent l'azote de l'aire grâce à l'action de micro – organismes (Rhizobium frankia) qui vivent en symbiose avec l'ortie (moutsie,2008).

I-7 - 5 – Les poils (L'action urticant):

L'action urticants est due au liquide contenu dans les poils et qui est libéré au moindre choc qui casse leur extrémité , les transformant ainsi en une véritable aiguille hypodermique . ce liquide contient de l'acétylcholine , de l'histamine et ,d'après des travaux publiés en 1990 , des leucotriènes , (Cf : oliver .F.,amon , EU.,breathnach,A. et al.(1991).contact urticaria due to common stinging nettle (urtica dioica).

Les poils urticant contiennent de l'histamine, de l'acide formique, de l'acide acétique, de l'acétylcholine , de l'acide butyrique, que ,des leucotriènes,de la 5-hydroxytryptamine (sérotonine) ainsi que d'autres substances irritantes (alternative medicine review, 2007 ; fleurentin,2008).

I-8- Propriétés pharmacologiques de l'*urtica dioica* :

Il existe des propriétés pharmacologiques de l'ortie vraie selon la nature du sol, de l'exposition de la plante et de la saison (**moutsie ,2008**).

la grande ortie est une plante qui à la particularité de synthétiser des substances spécifiques ou règne animale, ce sont : histamine, sérotonine , acétylcholine, acide formique . (morel,2008).

I-9 –Composition chimique des feuilles :

On trouve principalement des flavonoïdes dans les feuilles d'*Urtica dioica*. celles-ci sont également composées d'éléments minéraux, d'acides organiques, de composés phénoliques, de vitamines et de chlorophylle, et d'autres composants en faible quantité.

Les flavonoïdes (1 à 2 %) : 3-glucosides (quercétol 3-O-glucoside), et 3-rutinosides du quercétol (quercétol=quercétine), du kaempférol et de l'isorhamnétol (=isorhamnétine). (fleurentin,2008 ;wichtl et anton,2003). autres constituants (tassier,1994 ;fleurentin,2008 ;wichtl et anton,2003 ;toldy et al,2005) : plus de 20% d'éléments minéraux constitués de calcium, de potassium, de silicate partiellement solubles 1 à 4% de fer.

Bien que l'emploi de l'ortie comme composant unique de la pâte à papier ait été relativement limité, son incorporation à d'autres matières, courante. aujourd'hui, la pratique en est, à quelques rares exceptions près abandonnée pour cause de rentabilité insuffisante (bertrand,2008).

I-10- Principales utilisations thérapeutiques :

I-10-1 - 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)

I-10 -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. 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.

De nos jours, 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).

I-11 - Les contre-indications:

L'ortie ne doit pas être consommée en cas d'œdème par rétention due à une insuffisance cardiaque ou rénale. Tout comme le millepertuis, l'ortie est incompatible avec un certain nombre de traitements médicamenteux, dont elle entrave ou au contraire accentue l'action. En particulier les diurétiques, les anti-inflammatoires, les anticoagulants, les sédatifs, de même que la digitaline et les traitements contre l'hypertension.

Pour ce qui concerne le diabète, si la tradition considérait l'ortie comme l'un de ses remèdes, les études cliniques sont divergentes. Il est donc difficile de se faire une opinion

- L'Ortie, durant la grossesse : attention !

L'Ortie, malgré tous ses bienfaits pour la santé, sera d'un usage particulièrement restreint durant la grossesse et des précautions s'imposent quant à son utilisation durant cette période.

Des études cliniques ont démontré quelques cas d'avortement chez la lapine ayant été nourri_d'ortie, pour cette raison le corps médical déconseille la consommation d'ortie durant la grossesse.

Or, les Amérindiens la recommandent durant cette période aussi il n'est pas rare que l'Ortie soit conseillée par les herboristes américains aux femmes enceintes.

Ainsi, Anny Schneider, Herboriste Québécoise, déconseille la consommation d'Ortie en début de grossesse, l'Ortie étant emmenagogue les risques peuvent s'avérer catastrophiques, en revanche elle conseille de petites doses d'Ortie pour préparer et faciliter l'accouchement et durant toute la lactation puisque l'Ortie présente d'importantes propriétés galactogènes.

Chapitre II:

Le métabolismes secondaires

I-1-Le 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 ne sont pas nécessaires pour leurs événements biochimiques essentiels, et diffèrent en fonctions des espèces.

Leur rôle intervient peut être intervient dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent (parasites, pathogènes, prédateurs...).

Le fait beaucoup de ces composés ne se rencontrent pas chez tous les espèces montrés qu'ils n'entre pas dans le métabolisme générale (primaire) : se sont des métabolites secondaires qui n'exerce aucune fonction directe au niveaux des activités fondamentale de l'organisme végétale (croissance, développement, reproduction....) mais peuvent jouer différent rôle pour la suivre du végétale lui-même, rôle de défense, rôle de résistance (Merghem, 2009).

Les composés du métabolisme secondaire sont classés en 3 grandes classes :

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

Ces molécules très diversifiées qui permet les tentatives d'une classification chimique des végétaux au chimiotaxonomie. Cette classification consiste à établir les corrélations entre la présence de certains types de métabolite secondaires et les entités taxonomique (Merghem, 2009).

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 (juad, 2002).

Le métabolisme secondaires implique les voies métaboliques primaires spécifiques a certain organisme végétaux .

Donc les métabolisme secondaires sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt intervenaient dans relations avec les stress biotiques et abiotiques ou améliorent l'efficacité de la reproduction (leurent.,2012).

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées (Macheix et *al.*, 2005).

En effet, à coté des métabolites primaires classiques (glucides, protides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Herbert, 1989).

Les métabolites secondaires appartiennent à des groupes chimiques très variés tels les alcaloïdes, les terpènes, les composés phénoliques, etc. (Marouf, 2000; Macheix et *al.*, 2005).

I-1-1- Rôle biologiques des métabolisme secondaires :

- défense contre les herbivores (insectes , verbébrés ...).
- défense contre les moisissures et les bactéries .
- défense contre les virus .
- défense contre les autres plantes qui rivalisent pour lumière , eau et éléments nutritifs (ex : allélopathie).
- composés du signale attirer pollinisateur et les animaux disperser les graines disséminateur signaux pour communication entre plantes et micro-organisme symbiotique (rhizobium fixe N ou moisissures du mycorhize).
- la protection contre les rayons UV ou autre stress physique .
- A sélectionné des fonctions physiologique (wink, 2010).

II-2 - Les composés phénoliques :

II-2-1-Définition des polyphénols (Composés phénoliques) :

Composés phénoliques ou polyphénols ? Ils constituent un groupe de substances variées et ubiquistes. En font partie les flavonoïdes, les tanins les dérivés phénylpropanoïdes tels que les lignanes, les esters et amides hydroxybenzoïques, les stilbènes, les coumarines, les acides

hydroxybenzoïques, les xanthones et de nouveaux composés sont identifiés continuellement (Marouf, 2000; Hopkins, 2003; Georgé et *al.*, 2005).

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considérés. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal.

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal . on les trouve dans les plants , de puis les racines jusqu' aux fruits , les polyphénols sont des métabolites secondaires ce qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance , ou la reproduction (fleuriet, 1982 ;yusuf, 2006).

L'expression « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possèdent dans sa structures un noyau aromatique , portant on ou plusieurs groupements hydroxyles (bloor.,2001).

Les polyphénols sont également utilisés dans l' industrie agro-alimentaire comme additif, un nombre considérable de ces composés sont formés de deux noyaux benzénique A et B reliés par un hétérocycle de type pyrane , ces composés différent les uns des autres par la position substitutions sur les noyaux A et B , par la nature de l'élément central et par la position, la nature et le nombre de molécules de sucre fixées ainsi que par la nature de la liaison hétérosidique .

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. Alors les composés phénoliques sont une classe qui constitue 8000 composés.

Ils sont divisés en plusieurs catégories:

Les acides phénoliques.

Les flavonoïdes.

Les tanins obtenus par polymérisation des flavonoïdes.

Les lignanes avec les isoflavones sont nommés phyto-oestrogènes (SFA, 2005).

II-2-2-Les principales classes de composés phénoliques :

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Tableau 01) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées). 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.) (Herbert, 1989; Macheix et al., 2005; Beta et al., 2005).

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant de simple phénol en C6 aux flavonoïdes en C15 et à des molécules proches.

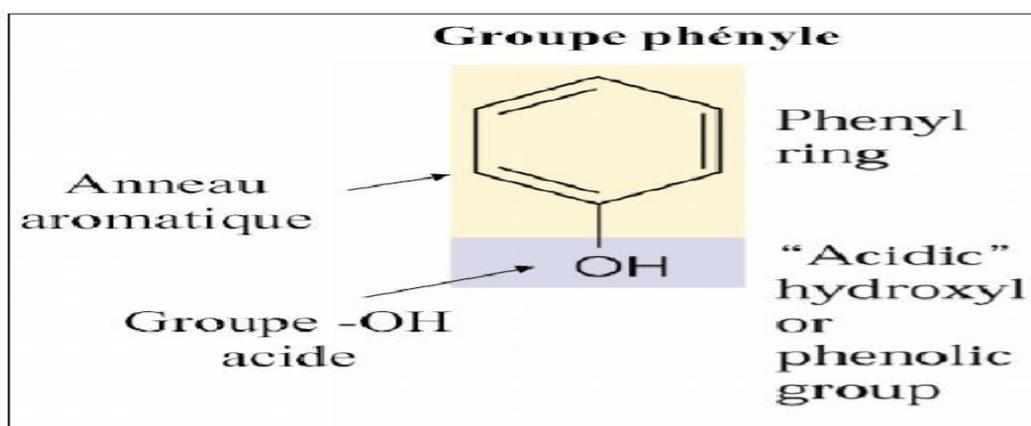
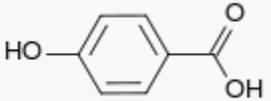


Figure 01: Structure de Phénol .

Tableau 01: Les principales classes de composés phénoliques s'inspire de Macheix *et al.* dans Sarni-Manchado et Cheynier (2006), ainsi que de Bruneton (1999).

COMPOSES PHENOLIQUES				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Formule	Origine
C6	Phénols simples	hydroquinone		Busserole
C6-C1	Acides hydroxybenzoïques	acide parahydroxybenzoïque		Epices, fraises

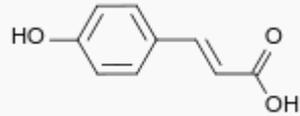
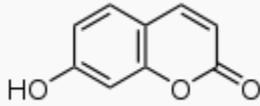
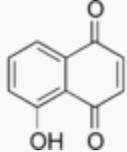
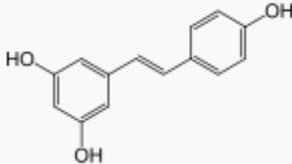
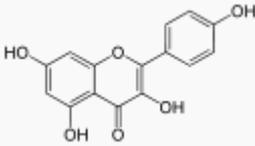
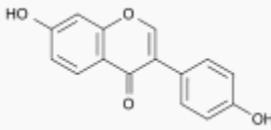
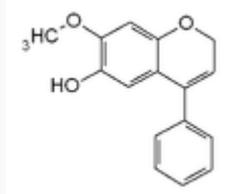
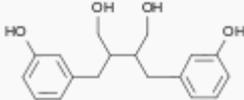
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	acide p-coumarique		Tomates, ail
	Coumarines	Ombelliférone		Carottes, coriandre
C6-C4	Naphtoquinones	Juglon		Noix
C6-C2-C6	Stilbénoides	trans-resvératrol		Raisin
C6-C3-C6	Flavonoïdes <i>lato sensu</i>	Kaempférol		Fraises
	Isoflavonoïdes	Daidzéine		Graines de soja
	anthocyanes	Dalphinol		<i>Dalbergia sissoo</i>
(C6-C3)₂	Lignanes	Entérodiol		Bactéries intestinales
(C6-C3)_n	Lignines			Bois, fruits à noyaux
(C6-C3-C6)_n	Tanins condensés	Procyanidol		Raisins, kaki

Tableau :01 : Les principales classes de composés phénoliques s'inspire de Macheix *et al.* dans Sarni-Manchado et Cheynier (2006), ainsi que de Bruneton (1999).

II-2-3- les flavonoïdes :

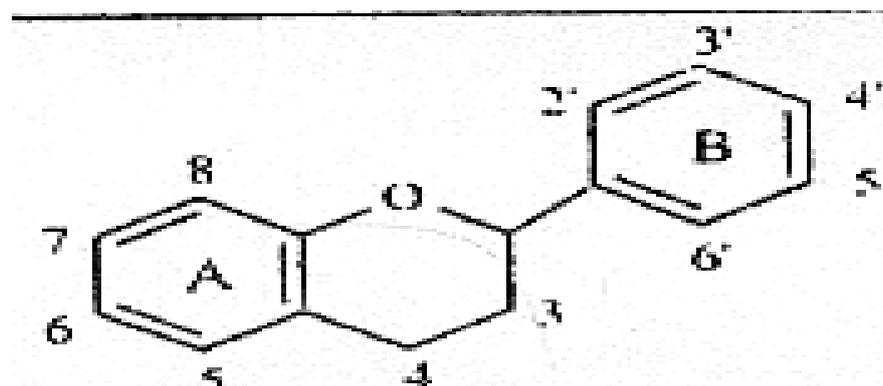


Figure 02 : Squelette moléculaire de base des Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles. (Portet Bénédicte, 2007).

Les flavonoïdes ont été découverts par Albert Szent-Györgyi en 1936 qui a reçu le prix Nobel de physiologie ou médecine, en 1937 , Dans les années 50, Jack Masquelier, de l'université de Bordeaux entreprend une étude des composés flavaniques de l'écorce de pin et des pépins de raisin et dépose des brevets sur la purification des procyanidines oligomères (ou pycnogénol) et leurs utilisations thérapeutiques.

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. Par définition, ce sont les composés qui ont en commun la structure du diphenyl propane C6-C3 C6 ; les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C.

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés quotidiennement sous forme de fruits, légumes et boissons telles que

le vin et le thé. Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives (k.Gherdia,2005).

II-2-3-1-La couleur :

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la colorations des fleurs et des fruits. Ils couvrent une large gamme de couleur allant du rouge à l'ultraviolet en passant par le jaune. Leur couleur dépend de leur structure mais aussi de l'acidité du milieu (pH). Les jaunes viennent des chalcones, aurones et flavonols jaunes, les rouges et les mauves des anthocyanosides, les bleus trouvent leurs origines dans les co-pigments flavones-anthocyanosides. L'absorption dans l'ultraviolet produit des motifs perceptibles par les insectes et capables de les guider vers le nectar.

Les pigments colorés des fleurs servent à attirer les insectes pollinisateurs. Ils jouent aussi un rôle dans la protection de la plante contre les UV et de défense contre les pathogènes et les insectes ravageurs.

On trouve ces pigments dans le rouge des pommes et des poires, dans les baies de genièvre, le miel, le raisin et le vin...

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes sont hydrosolubles et s'accumulent dans les vacuoles.

II-2-3-2- La structure chimiques des flavonoïdes :

Leur structure de base est celle d'un d' un diphényle propane à 15 atome de carbone (C₆-C₃-C₆) constitué de deux noyaux aromatiques (ou annaux), que désignent des lettres A et B , reliés par un hétérocycle oxygène , que désigne la lettre C comme le nombre dans la (figure 03). (harbone et williams,2000).

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques C₆ reliés par une chaîne en C₃. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone.

La distinction des sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale C.

II-2-3-3- Les différentes classes des flavonoïdes :

II-2-3-3-1- 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 .

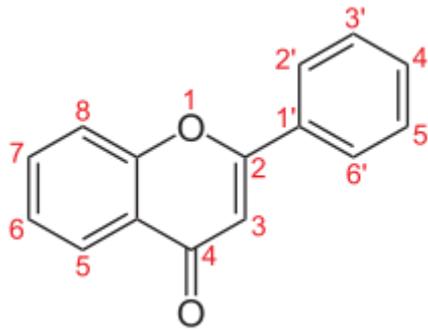


Figure 03 : structures de base des flavone

II-2-3-3-2- Les flavonols :

Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement OH, les divers molécules de flavonols en comprennent deux , trois , quatre , ou cinq autres. les flavonols sont beaucoup plus abondants le règne végétale que les flavones et leurs concentrations sont plus élevées . les principaux sont la quercétine , kaempférol , myricétine .

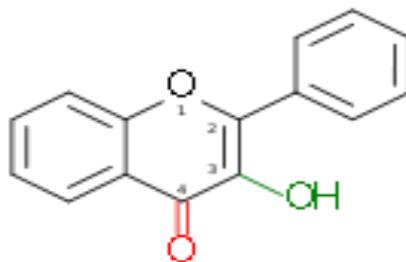


Figure 04 : structures de base des flavonol

II-2-3-3-3- Les flavonones :

Ces molécules sont caractérisés par l'absence de double liaison en 2,3 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, le cycle B peut aussi être substitué en position 3', 4', 5', et 6'.

la principale flavonone est la marigénine

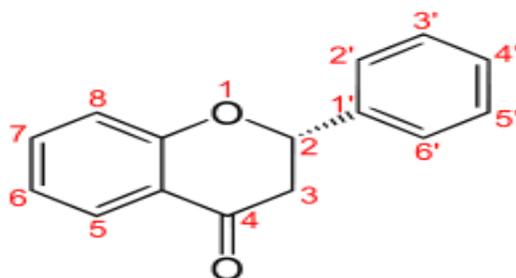


Figure 05 : structures de base des flavonone

II-2-3-3-4- Les flavanols :

Il se distingue des flavonones par l'absence à la position 4 d'un atome d'oxygène relié au carbone par une double liaison la plus rencontrée est la catéchine.

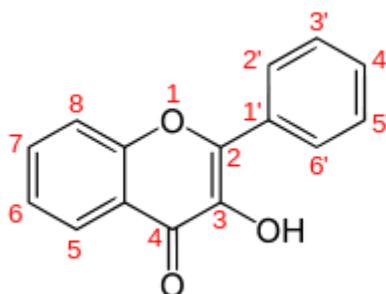


Figure 06 : structures de base des flavanol

II-2-3-3-5- Les chalcones :

Les chalcones et par défaut les dihydrochalcones sont uniques au sein de la famille des flavonoïdes dépourvus du cycle C central, les deux cycles A et B sont reliés par une chaîne tricarbonée cétonique D, E insaturée (saturée dans le cas des dihydrochalcones). Les cycles A et B sont équivalents aux cycles A et B des autres flavonoïdes mais leur numérotation est inversée. Les plus abondants sont butéine et phlorétine.

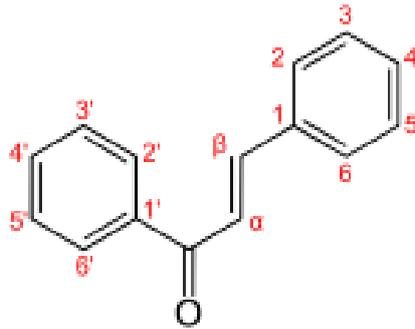


Figure 07 : structures de base des chalcone

II-3-3-6- 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 les plus importants sont : pélargonidine , cyanidine , pénonidine.

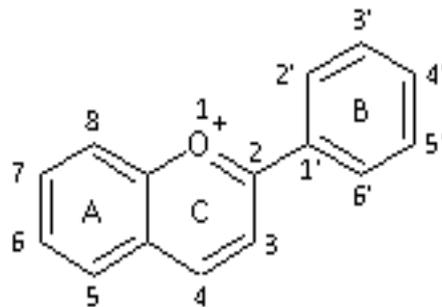
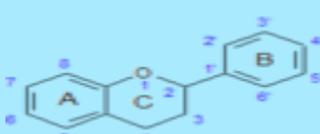
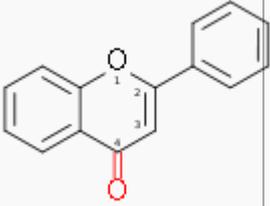
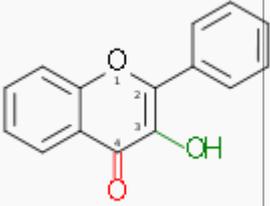
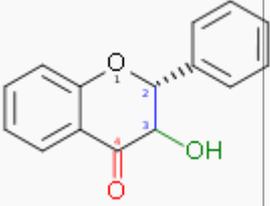


Figure 08 : structures de base des anthocyanine

II-2-3-4- Les principales classes des flavonoïdes s'inspire de Bruneton, (2009).

 FLAVONOÏDES				
CLASS E	SQUELETTE	Aglycones	Hétérosides	Dérivés méthoxylés

<p>FLAVONE</p>	 <p>2-phénylchromen-4-one</p>	<p><u>Lutéolol</u> (OH :5,7,3',4') <u>Apigénol</u> (OH :5,7,4')</p>	<p>7-O--glucoside de lutéol, 6-C-glucoside d'apigénol, <u>Apiine</u></p>	<p><u>Tangéritine</u> (CH₃:5,6,7,8,4') <u>Nobilétine</u> (CH₃:5,6,7,8,3',4') Géraldone (7,4'-dihydroxy-3'-méthoxyflavone)</p>
<p>FLAVONOL</p>	 <p>3-hydroxy-2-phénylchromen-4-one</p>	<p><u>Quercétol</u>, <u>Kaempférol</u>, <u>Myricétol</u>, <u>Fisétol</u></p>	<p><u>Rutine</u> (ou rutoside), 3,7,4'-O-triglucoside de kaempférol, 3-O-galactoside d'isorhamnétol</p>	<p><u>Pachypodol</u>, <u>Rhamnazine</u>, 3,7-diméthylquercétol, Isorhamnétol (=3-méthylquercétol)</p>
<p>DIHYDROFLAVONOL ou FLAVANONOL</p>	 <p>3-hydroxy-2,3-dihydro-2-phénylchromen-4-one</p>	<p><u>dihydrokaempférol</u>, <u>dihydroquercétol</u> (=Taxifoline, extraite du <u>mélèze</u> <i>Larix gmelinii</i>⁴⁾)</p>	<p>3-O-rhamnoside de dihydroquercétol, 3-O-rhamnoside de dihydromyricétol</p>	

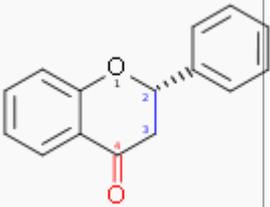
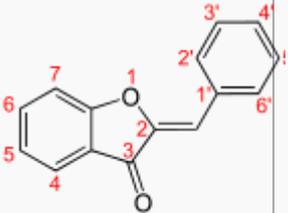
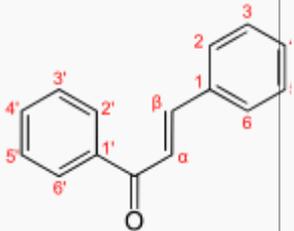
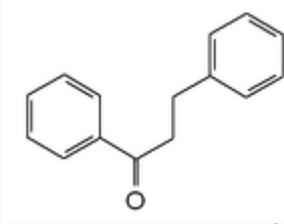
	one			
<u>FLAVANONE</u>	 <p>2,3-dihydro-2-phenylchromen-4-one</p>	<u>Naringétol</u> , <u>Eriodictyol</u> , <u>Butine</u>	<u>Hespéridine</u> (7-O-rutoside d'hespéridine), <u>Naringine</u> , <u>Néohespéridine</u> , <u>Didymine</u>	<u>Hespéridine</u> , <u>Homoeriodictyol</u>
<u>AURONE</u>		<u>Hispidol</u> , <u>Aureusidine</u> , <u>Sulfurétine</u> , <u>Maritimétine</u>		
<u>CHALCONE</u>		<u>Isoliquiritigénine</u> , <u>Butéine</u>		<u>Xanthohumol</u>
<u>DIHYDROCHALCONE</u>		<u>Phlorétine</u>	<u>Aspalathine</u> (=3-C-glucopyranosyl dihydrochalcone), <u>Naringine dihydrochalcone</u> , <u>Néohespéridine dihydrochalcone</u> , <u>Nothofagine</u> , <u>Phloridzine</u>	

Tableau 02 : les classe des flavonoïdes par Bruneton (2009).

II-2-3-5- Propriétés physico-chimique des flavonoïdes :

- Les hétérosides de flavonoïdes sont en général solubles dans l'eau et les alcools. Les génines sont pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires.
- L'extraction est réalisée habituellement à l'aide du méthanol ou de mélanges méthanol-eau parfois d'acétonitrile-eau.

II-2-3-6- Propriétés biologiques :

Renforcement de la résistance des capillaires Historiquement, c'est la première propriété reconnue aux flavonoïdes.

On les dit "veinotoniques" car on peut montrer qu'ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires et de renforcer leur résistance.

Pour « les revues générales et les synthèses méthodiques avec méta-analyse récentes aboutissent plutôt à constater l'absence ou la faiblesse de preuves de l'effet des flavonoïdes dans le traitement de l'insuffisante veineuse chronique, effet au demeurant de valeur clinique incertaine » Bruneton(2009).

II-2-3-6-1-Activité antioxydante :

Les flavonoïdes agissent principalement comme antioxydants primaires, en stabilisant les radicaux peroxydes mais ils peuvent aussi désactiver les espèces oxygénées réactives (ion superoxyde, radical OH[•], oxygène singulet), inhiber la lipoxygénase ou encore chélater les métaux (p. sarni-manchado, v . cheynier , 2006).

La limitation principale de cette activité antioxydante est la faible biodisponibilité des flavonoïdes après ingestion d'aliments riches dans ces composés. La faible quantité absorbée entre en concurrence avec les autres piègeurs de radicaux libres

(α -tocophérol, ascorbates et glutathione) présents dans des concentrations très supérieures (Mónica Galleano et al.,2010).

Exception faite du tractus gastro-intestinal et peut-être du sang, l'action potentielle des polyphénols comme piègeurs de radicaux libres n'a probablement aucune signification physiologique dans la plupart des organes (Cesar G. Fraga,2010)

II-2-3-6-2- Inhibiteurs enzymatiques :

Les flavonoïdes sont, *in vitro*, des inhibiteurs enzymatiques de :

- l'histidine décarboxylase (par le quercétol et naringénine).
- l'élastase.
- la hyaluronidase (par les flavones et les proanthocyanidols).
- la catéchol-O-méthyltransférase.

II-2-3-6-3- Interactions avec les facteurs de transcription :

Les flavanols (catéchines et procyanidines) peuvent moduler l'expression de nombreux gènes régulés par le facteur de transcription NF- κ B. (Cesar G. Fraga,2010).

Ce sont des molécules douées de plusieurs propriétés biologiques : Propriétés anti - inflammatoires, antivirales et antibactériennes, anti - carcinogènes, antioxydante, pro - **oxydante** (Hadi Milaine, 2004).

Inhibitrices d'enzymes, elles sont impliquées dans d'importantes fonctions cellulaires, en affectant l'activité de nombreux systèmes enzymatiques *in vitro* mais également *in vivo*. Certaines possèdent des propriétés lyopolitiques, protectrices de l'ADN (Girotti - Chanu Catherine, 2006).

II-2-3-6-4- Eeffets anti-microbiennes :

Les propriétés antimicrobiennes des flavonoïdes vis à-vis de différents micro-organismes pathogènes ont été mises en évidence (jassim et naji, 2003 ;tagouri et *al.*, 2014).

Les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes ont été rapporté posséder une activité antimicrobiennes (terschuk et al., 1997 ;essawi et srour, 2000).

Les propriétés antibactériennement de propolis ont été attribuées à teneur élevée en flavonoides (grange et davery,1990). stato et sescollaborateurs (1995),ont démontré l'effet bactericide de différentes flavonones sur un staphylococcus aureus.

Une étude plus récente a montré le pouvoir antibactériennes d'un flavonoïde glycoside contre des souches de bactéries gram(+) et gram(-).(harikishna et *al.* , 2004) , en raison de la capacité répondeuse des flavonoides d'inhiber la germination des spores pathogènes des plantes ,

on leur a proposé pour l'usage contre les microbes fongiques de pathogènes de l'homme (harbone et williams,2000).

Deux nouveaux flavonoides , un flavone et un flavonone, respectivement isolés des fruits de *Terminalia litoralis* et de l'arbuste *Eysenhardtia texana* ont été montrés comme posséder l'activité contre le microbe pathogène opportuniste *Candida albicans* (valsaraj et al., 1997 ; wachter1999).

Deux autres flavones isolés de plantes *Artemisia giralid* ont été rapportés exhiber une activité contre l'espèce *Aspergillus flavus* , une espèce de mycète qui cause la maladie envahissante chez patient immunosuppresseurs (zheug,1996).

Le mécanisme des effets antimicrobiens des flavonoides est sans doute très complexe parmi les hypothèses avancées , on va citer :

- inhibition de la synthèse d'acide nucléique (hilliard,1995).
- inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique, (tsuchiya et linuma,2000).
- inhibition du métabolisme énergétique microbien (haraguchi et al.,1998).

II-2-4- Les coumarines :

Comme les autres phénylpropanoïdes les coumarines constituent une classe de métabolite secondaire des plantes dérivées d'acides cinnamiques par cyclisation de la chaîne latérale de l'acide *o*-coumarique (Giada, 2013).

Ce groupe peut être trouvé libre dans la nature ou à la forme combinée avec les sucres comme les hétérosides et glycosides dans beaucoup de familles des dicotylédones , y compris l'apiacées , astéracées, fabacées, moracées, rosacées, rubiacées et solanacées .

II-2-5- Les tanins :

Les tanins sont des composés phénoliques complexes , hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000Da (kamra et al., 2006).

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 (zimmer et cardesse ,1996).

Les tanins sont des molécules biologiquement activités pharmacologiques remarquable est des effets significants sur la santé humaine (chavan et *al.*, 2001).

ont de grande capacités oxydantes dues à leurs noyaux phénolique (peronny ,2005).

Elles ont la particularité d'inhibier la peroxydation des lipides, en agissent comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'autre oxydation (perret ,2001).

Selon leur nature chimique ces composés sont divisés en deux classes ; les tanins hydrolysable et les tanins condensées (cowan MM, 1999 ; kamra,2009).

Il est classique de distinguer deux grands groupes de tanins, différents à la fois par leur ité chimique et par leur composition (Haslam, 1989).

Les tanins hydrolysables: ce 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 (enzymatique). 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 – l'acide éllagique (Guignard, 2000).

Les tanins condensés: ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3 ol dérivés de la (+) catéchine ou de ses nombreux isomères (Harborne, 1980; Awika & Rooney, 2004). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (Guignard, 2000).

II-2-6-- Les 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).

Le terme terpène inventé par Kékulé (Teisseire, 1991).

Du point de vue structural, les terpènes constituent une grande famille de composés prénologues, c'est-à-dire d'homologues a enchaînement isoprénique (Donald, et Gearge, 1968). Ces substances organiques font parti des métabolites secondaires, les plus répandus dans la nature (Bouvier et *al.*,2005).

En effet, plus de 36.000 structures différentes ont été identifiées (Hill, 2002).

Plusieurs sont isolés à partir des fleurs, des tiges, des racines et différentes parties

Des plantes (Schulz et *al.*,2003). On peut en rencontrer encore, chez les animaux, les phéromones et hormones juvéniles sesquiterpéniques des insectes et dans les organismes marins (Bruneton, 1993).

II-3- Les composés azotiques (alcaloïdes) :

le mot alcaloïde en arabe al- kali qui vous dire un alcaloïde est un substance organique d'origine végétale et azotée à caractère alcalin .

Les alcaloïdes sont produit d'origine végétale , molécules organiques hétérocycliques azotées et pharmacologiquement actifs (friderich s.,1806 ;meixni c.,1819).

Les alcaloïdes sont des composés de métabolismes secondaires, il existe environs 12000 répertoriés.

Les alcaloïdes constituent un vaste groupe de substance secondaires et paraissent servir comme moyen de dissuasion chimiques contre les prédateurs .

Ils se caractérisent par un gout aussez amer ,chimiquement ils sont constitués de C, H , O , N, ce sont essentiellement les acides aminés qui donnent naissance aux alcaloïdes (brunten j, 1999).

PARTIE II

MATRIELS ET METHODES

I – 1- Matériel végétale utilisé :

L'espèce sélectionnée (*Urtica dioica*) a été collectée dans leurs habitats naturels entre le mois de Mars et Avril 2015. La récolte a été effectuée à l'Est algérien dans la région Ain Abid (wilaya de Constantine).



Figure 09 : *Urtica dioica* .

Afin d'obtenir d'une préparation optimale de cette échantillon (la conservation de leur composants moléculaire - métabolisme secondaire- qui existe au niveaux de cette organe).

- la récolte ; les feuilles il est fraîches.
- sécher a l'ombre de la lumière de soleil.
- broyer à l'aide d'un appareil électrique.

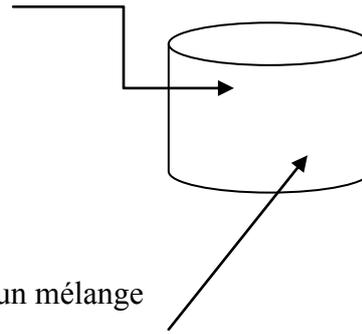
II – Criblage des flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à La famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des Végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des Feuilles. (Portet Bénédicte, 2007).

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mis en évidence par des tests simples et rapides « les réaction à cyanidine » (Karumi et *al.*,2004).

Ce sont des tests pour voir s'il y'a des flavonoïdes dans cette échantillons , à partir de 25 g du matériel végétale mettre dans un bicher et ajouter 250 ml d' un mélange préparer de deux solvants : (méthanol + l' eau distillé) , garder le rapport solvant/matériel végétale utilisé est : 10/1 (ml/g), pour le mélange du solvants on garder le rapport de volume 7/3(v/v) 250 ml mélange : 175 ml méthanol /75 ml eau.

25 g du matériel
Végétale



250 ml d'un mélange
(Méthanol + eau distillé)

On laisse le mélange pendant de 24 heures pour la (macération), après 24h on filtre le Broyat a l'aide (papier filtrer, entonnoir) pendant de quelque minutes, récupérer le solution filtrer dans l'ampoule à décantation et ajouter le même volume de cyclohexane, dans ce opération en utilise les feuilles (pour éliminé la chlorophylle), et laisser 24 heurs pour la séparation.

Après de 24 h, le mélange est an séparé a deux couches, jeter la couche supérieur (cyclohexane + chlorophylle), et la phase inférieur (l'extrait) est réparti dans (04) quatre tubes pour faire les testes suivants :



Figure10 : l'extrait des feuilles .

Le tube 1 serve de témoin.

Dans le deuxième tube (02) on rajoute quelques gouttes de HCL concentré à 50% et quelques tournes de Mg (environ 0.5 g), on laisser agir 5 minutes.

La coloration rouge implique la présence des flavone, coloration rouge pourpre implique la présence des flavonols el la coloration rouge violacée implique la présence des flavonones et flavanols .

Le troisième tube (03) on rajoute aussi à partir de l'extrait :

- quelques gouttes(5) de HCl.
- 1 ml de alcool isoamérique .
- 1 ml de H₂O.

C'est la coloration de la phase supérieure qui ils prise en considération.

On additionne dans le quatrième tube (04), 0.5 ml du HCl concentré , mette dans un bain marie pendant de 30 minutes, à degré de (80 – 90 C °) de température.

III-- Extraction des flavonoïdes :

III-1- Macération et préparation de l'extrait méthanoliques :

Le matériel végétale broyé est soumis à une extraction par macération pendent 72 heurs avec renouvellement de solvant chaque 24 heurs et agitation de temps en temps dans un mélange (méthanol / eau, 7/3, v/v), le rapport : solvant / matériel végétale utilisé était de 10/1 (ml/g).

Après la préparation de l'échantillon (feuilles) on mesurer de 6 g de matériel végétale (les feuilles d'*Urtica dioica*) dans un balance .

- pour 6 g de Matériel Végétale ajuter 60 ml de mélange du solvant (méthanol + l'eau distillé).

- 60 ml de mélange est consiste :(7 V / 3 V) : 42ml de méthanol et 18 ml l'eau distillé, agiter bien, et laissés pendant 24 h, afin pour la premier macération.

- après la macération, on a filtre de quelque minute.

On récupère l'extrait N°01 dans fiole.

- Et on préparer le solvant de même mesure : 42 méthanol / 18 eau distillé, et ajouter avec la matière végétale précédent, et laisser le deuxième macération elle est duré d'autre 24 heurs.

- Le même protocole expérimental dans deuxième et troisième macération, est récupérer les extraits 2 et 3, donc on obtient à trois extraits à partir de la même matière végétale. On mélanger les trois extraits pour obtient un extrait (1+2+3).

III- 2 - Evaporation à sec :

Après cette étape on met l'extrait méthanolique dans le L'évaporateur rotatif.

III -2-1- L'évaporateur rotatif :

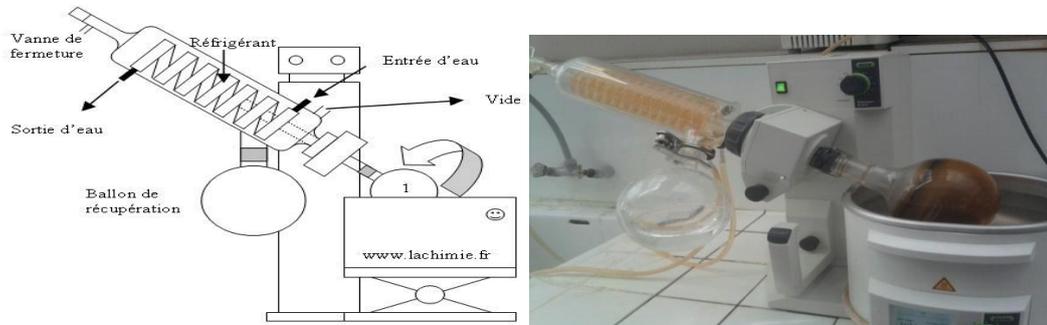


Figure 11 : L'évaporateur rotatif de laboratoire.

III-3-Fractionnement l'extrait bruts par extraction liquide-liquide (ELL) :

- L'objectif de cette étape est d'identifier les flavonoïdes présents dans l'extrait méthanolique afin de déterminer la richesse de la plante en ces composés.
- Pour l'affrontement on a utilisé des solvants de polarité croissance, allant du moins polaire vers le plus polaire. L'extrait MOeH on été ramené à un volume de 100 ml dans Ether de pétrole, la même quantité du solvant a été utilisé (1/1 : V/V).
- La phase aqueuse et le solvant (éther de pétrole) sont agités et laissés pendant 24 h, dans des ampoules à décanter. jeter la phase supérieure et on ajoute le même volume de la phase aqueuse par d'autre solvant (éther di éthylique), agiter et laissé 24h.
- Après 24 h, on récupère la couche supérieure, évaporé et reprise par 5 ml du méthanol.



Ether di Ethylique

Acétate di éthyle

Butanol et aqueuse

On fait le même protocole avec les autres solvants (Acétate di éthyle, Butanol), mais dans le dernier, on récupère les deux phases (butanol et phase aqueuse), chaque phase, évaporées et reprises par 5 ml du méthanol. L'affrontement on a utilisé sont :

- l'affrontement avec l'éther de pétrole enlevait les composés non phénoliques (les acides gras, chlorophylle, huiles, résine ...), donc cette fraction est rejetée.
- l'affrontement avec l'éther di Ethylique soutirait les glycones
- l'affrontement avec l'acétate d'éthyle soutirait les flavonoïdes mono glycolyses.
- l'affrontement avec le butanol soutirait les di-glycolyses et les tri-glycolyses.
- l'affrontement avec la phase aqueuse restante contenait alors les flavonoides non soutirés.(Merghem,1982, in Zeghad, 2008).
- on été évaporé presque à sec dans un rota vapeur à 40°C, Rotation de la ballon 4 rotation / minute .

IV- Séparation des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince (CCM) :

IV-1 - Définition :

La chromatographie est à la fois une méthode de séparation et d'identification de divers constituants d'un mélange (Marouf, 2002). La chromatographie sur une couche mince est essentiellement une chromatographie liquide exécutée sur une couche de particules d'une substance polymérisée immobilisée sur un support planaire (Yrjonen, 2004).

C'est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases , l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile(éluant),selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résultat soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire , soit de leur solubilité différente dans chaque phase (Marchal,1998).

IV-2 -Principe :

Le principe de la chromatographie sur couche mince repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile à travers une phase stationnaire après que l'échantillon à été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (Anton et al. 1998).

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange des solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une plaque semi-rigide de matière de plastique ou d'aluminium (Anton et *al*, 1998).

Les substances peuvent être identifiées en calculant la valeur R_f qui peut être comparée à celle de la littérature ou à celles des étalons. $R_f = \text{distance parcourue par l'échantillon} / \text{distance parcourue par le front de solvant}$. Et la distance de migration des

substances dépend essentiellement de leur polarité : les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de R_f (0.00-0.25), les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de R_f comprises entre (0.3-0.5), les flavonones, les flavonols, méthoxyflavanes ont les valeurs les plus élevées de R_f (0.5-0.75). (Bandyukova et Shinkarenko, 1973 ; in Zeghad, 2009 ; in Allal, 2013).

IV-3 - Préparation de la phase mobile (l'éluant) :

- la phase mobile (éluant) est constituée par un mélange des solvants organiques.
- l'élution est commencée avec des solvants peu polaire puis poursuivie par des solvants plus polaire (Gwenola et *al*, 2011).

Système solvants : butanol / acide acétique / H₂O

proportions : 4V / 1V / 5V. (Marston et Hostettmann, 2006).

A partir de Système solvants (l'éluant) suivant on fait :

Pour 1 cm de hauteur de l'éluant dans la cuve ;

- 150 ml de l'éluant :
- 60 ml de Butanol.
- 15 ml de l'Acide Acétique.
- 75 ml de H₂O.

IV-4 - Préparation de la phase stationnaire (fixe) :

On utilise comme phase fixe : le gel de silice, déposé en fine couche (couche mince) sur une plaque rigide (aluminium), plaque préparée déjà (plaque commerciale). à l'aide d'un crayon et règle, à partir de l'extrémité inférieure de papier chromatographique : on trace une

lignée très fine (de 2 cm), pour éviter le grattage de la couche de silice, c'est pour le succès du processus de séparation. On dépose quelques points sur la ligne, également la même distance entre les deux points

IV-5 - La préparation de la cuve :

- cuve de nature de verre pour bonne observation.
- couvercle nature aussi (verre) pour éliminer l'évaporation des solvants pendant la séparation.

IV- 6 - Dépôts de l'échantillon :

Le dépôt de l'échantillon sur la plaque, il est conseillé de tracer une ligne droite parallèle au bord inférieur et d'y placer les marques des futurs dépôts, espacés d'un minimum de 0.5cm le dépôt doit être effectué de façon homogène à l'aide d'un capillaire sans creuser le support solide (Erika et *al.*,2008).

IV- 7 - L'application :

- on mélange les solvants utilisés pour obtenir (l'éluant), verser cet éluant dans la cuve, leur hauteur est 1 cm, couvrir par le couvercle et laisser pendant quelques minutes, (30 min environ), il est important saturer la cuve chromatographique en vapeur de l'éluant.
- Le dépôt des extraits a été fait linéairement de façon ponctuelle avec un capillaire. Les extraits doivent être dilués. On a fait plusieurs dépôts du même échantillon en même temps pour obtenir les produits séparés en grande quantité. Les capillaires devaient être posés prudemment sur la plaque afin de ne pas endommager et gratter le gel.
- pour les extraits méthanoliques on a réalisé la séparation des phases suivantes ; Ether diéthylique, Acétate d'éthyle, Butanol et la phase aqueuse.
- après la saturation par la vapeur du solvant d'éluant, la plaque est déposée en position légèrement inclinée dans la cuve chromatographique. Le dépôt (la plaque) a été effectué et trempé dans le solvant approprié, chaque constituant de l'échantillon déposé migre avec des vitesses différentes



Figure12 : Clarification des dépôts de l'échantillon.

IV- 8 - Développement de la chromatographie :

- Retirer la plaque allant la cuve, le niveau attiré par le solvant est tracé par un trait fin (par crayon), puis la plaque est séchée à l'air libre, marquer les taches saillantes au sein de la plaque aussi avec d'un crayon, comme la photo suivant :



Figure13 : plaque CCM après séchée.

IV- 9 - La révélation :

- Après migration et séchage, la visualisation des spots obtenus a été faite sous UV ($\lambda=254\text{nm}$) dans une chambre noire, par la loupe UV.

V- Etude de l'activité antibactérienne :

V-1- Objectif :

Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne de quatre extraits des feuilles de *urtica dioica* sur les espèces bactérienne *bacillus cereus* et *E.coli* , ces deux germes pathogènes (gram positif et gram négatif). par le méthode de diffusion des disques en milieu solide ont été utilisée respectivement pour la détermination des diamètres d'inhibition des antibactériens et évaluer le pouvoir inhibitrice et bactéricide des deux espèces (Gram positif ou négatif).

V-2 -principe :

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disques en gélose dite méthode de diffusion de disques (Rahal et *al.*,2005).

L'activité inhibitrice du produit se manifeste par la formation d'une auréole d'inhibition autour du puits ou de disque. Elle est considérée comme positive pour tout produit donnant un diamètre d'inhibition supérieur à 8 mm (Kabouss et *al.*, 2000).

V -3 – Préparation des souches bactériennes :

On provient des souches bactérienne, laboratoire de bactériologie du CHU de Constantine(Algérie) et laboratoire de microbiologie université Constantine 1, les espèces bactérienne sont ; *Escherichia coli* (gram négatif) et *bacillus cereus* (gram positif), les deux espèces bactérienne estensemencées dans un bouillons nutritif et incubées à 37°C pendant 24h, pour optimiser leur croissance, bouillons nutritif C'est une suspension en solution saline 0.9% (sérum physiologique) ou bien de l'eau physiologique stérile .

V -4 - L'extrait des flavonoïdes utilisé :

A partir de l'extrait méthanolique du feuilles ;

L'extrait Ether di Ethylique.

L'extrait Acétate di éthyle.

L'extrait Butanolique.

L'extrait de la phase aqueuse.

Les extraits déjà préparer.

V -5 – Préparation du milieu de culture :

Le milieux de gélose (Mueller Hinton) sont préalablement préparée au niveau du laboratoire de microbiologie, cette milieu est solide mis dans un bain marie à 100 C° pour transférer vers (liquide) . il est coulé dans les boites de pétri jusqu'à au 2 mm, après le remplissages, les boites devrait être entrouverte devant la flamme de bec benzène en attendant pour la solidification de la gélose.



Figure14 : Préparation de milieu d'culture.

V -6 - Préparation des disques :

Disques de papier Wattman n°4 de 4 mm de diamètre, les disques enrobé dans des papier d'aluminium, pour la stérilisation : (stérilisation à 90-120 C° pendant 20 min par autoclavage), sont utilisés comme support chargés de l'extrait naturel à tester à l'aide d'un capillaire , les disques imprégnés de méthanol sont également utilisés qui vont servir de témoin.

V -7 – Culture des bactérie :

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boites pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, l'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée , l'écouvillon est rechargé à chaque fois qu' on ensemence plusieurs boites de pétri avec les souches donner.

V -8 – Dépôt des extraits :

On injectent d'un volume de chaque extraits (phase aqueuse, Ether di Ethylique, Acétate di éthyle et Butanolique) dans les disques à l'aide d'un capillaire, jusqu'à remplissage du disques, délicatement sur la surface de la gélose inoculée les disque , à l'aide d'une pince stérile .



Figure 15 : les disques avec (l'extrait).

V -9 – La conservation des boites de pétri :

Cette paramètre très important pour l'activité antibactérienne dans les boites de pétri, sont l'incubation pendant 24h à 37 C°.

PARTIE III

RESULTATS ET DISCUSSION

I –Criblage des flavonoïdes :

I-1- Résultats :

Le criblage phytochimique des flavonoïdes selon l'observation de la coloration (rougeur) entre autres :

- Réaction positive : +++
- Réaction moyennement positive : ++
- Teste négatif : -



Figure 16 : Résultats des tests du criblage des flavonoïdes par l'extrait des feuilles.

I -2- Discussion :

Traiter 5 ml de l'extrait préparé avec 1 ml de Hcl concentré et ajouter tout doucement quelques fragments de tournures de Mg (laisser agir) sous la haute, la présence des flavones est confirmée par l'apparition d'une couleur virage ou rouge pourpre (flavonols), rouge violacées (flavonones et flavonols), (Bruneton, 1993)

- **Dans le deuxième tube** : On observe la couleur rouge pourpre, ces couleurs identifient la classe des flavonoïdes libre, sont les **flavonols**. Donc le résultat est positif.
- **Dans le troisième tube** : Pas de coloration dans la phase supérieure, l'absence des anthocyanes. Le résultat est négatif.
- **Dans le quatrième tube** : On observe une couleur rouge violacée (**flavonones et flavonols**), la réaction est positive.

Alors dans cette espèce les flavonoïdes qui sont présentes dans les feuilles sous formes : **flavonones** et **flavonols**)

II- Séparation l'extrait méthanolique par chromatographie sur couche mince :

II-1-Résultats :

La chromatographie sur couche mince déterminé par la séparation des deux phases, phase mobile et stationnaire , développement de cette technique dépend l'espace vapeur, pour voir les empreintes des flavonoïdes de nos extrait et à partir de système solvants : butanol / acide acétique / H₂O, résultats c'est une chromatogramme comportent un série de spot ,qui apparaissent détection visible, et sous lampe UV à 254 nm.

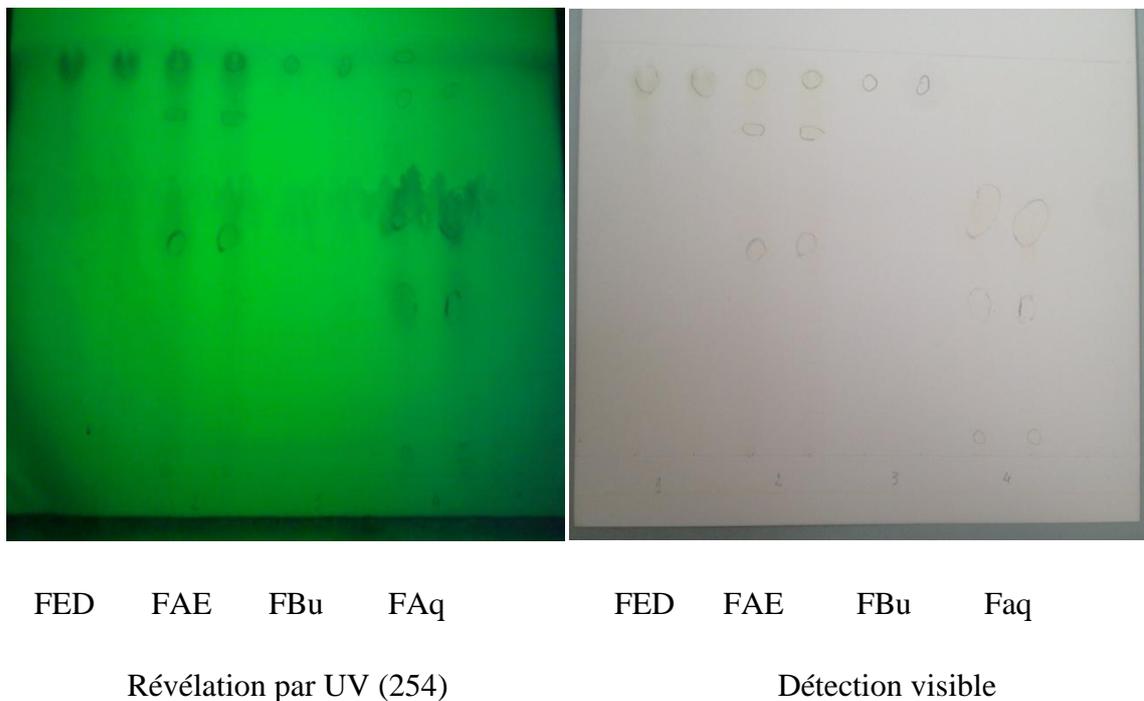


Figure17 : Chromatogramme des différentes phases de l'extrait méthanolique des feuilles chez *Urtica dioica*

FED : fraction éther di éthylique .

FAE : fraction acétate d'éthyle .

FBu : fraction butanol .

FAQ : fraction aqueuse

	Rapport frontal (RF)			
	L'extrait méthanolique			
Spots	FED	FAE	FBU	FAQ
Spot 01	0.904	0.500	0.912	0.032
Spot 02	/	0.800	/	0.360
Spot 03	/	0.920	/	0.600
Spot 04	/	/	/	0.832
Spot 05	/	/	/	0.936

Tableau 03 : les spots qui existe sur la plaque CCM.

A partir de notre chromatogramme obtenir par l'analyse de l'extrait méthnolique des feuilles de l'ortie , montre que plusieurs spots(5spots) dans le fraction aqueuse est le majoritaire qui contient les flavonoïdes, en parallèle le fraction d'acétate d'éthyle contient (3spots) . par rapport les reste fractions.

II-2-Discussion :

Selon le tableau, on remarque que les fractions de la chromatogramme obtenue des diminutions et augmentation de valeur du RF pour différentes fraction Ether di éthylique, Acétate d'éthyle, Butanol et Aqueuse. le RF de la phase aqueuse très élevé (5 spots) il est riche en flavonoïdes (0.5et 0.75) approximation sont flavonone , flavonol , méthoxyflavane, et donner un résultat optimale (majoritaire) par rapport les autres fractions, selon (**Bandyukova et Shinkarenko(1973)**), cette augmentation est due à une mutilation des groupements (OH), moins nombreuses des flavonoïdes dans le fraction de l'Acétate d'éthyle(3 spots) et donner (certains nombres de flavonoïdes), est appelé l'acétylation, la diminutions des valeurs du Rf (0 -0.25) et (0.3-0.5), est expliquée selon le même auteurs, par l'augmentation des (OH) due principalement de l'introduction de nouveaux groupement des (glycolation) , ces composés probablement sont : polyhydroxyflavones, oligohydroxy, oligométhoxyflavone. mais le restes fractions de (Butanol , Ether d'éthyle) une seul spot, est donner un faible quantité de flavonoïdes, est donc la plante étudié appartient une richesse en flavonoïdes.

III-Evaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes :

III-1-Résultats :

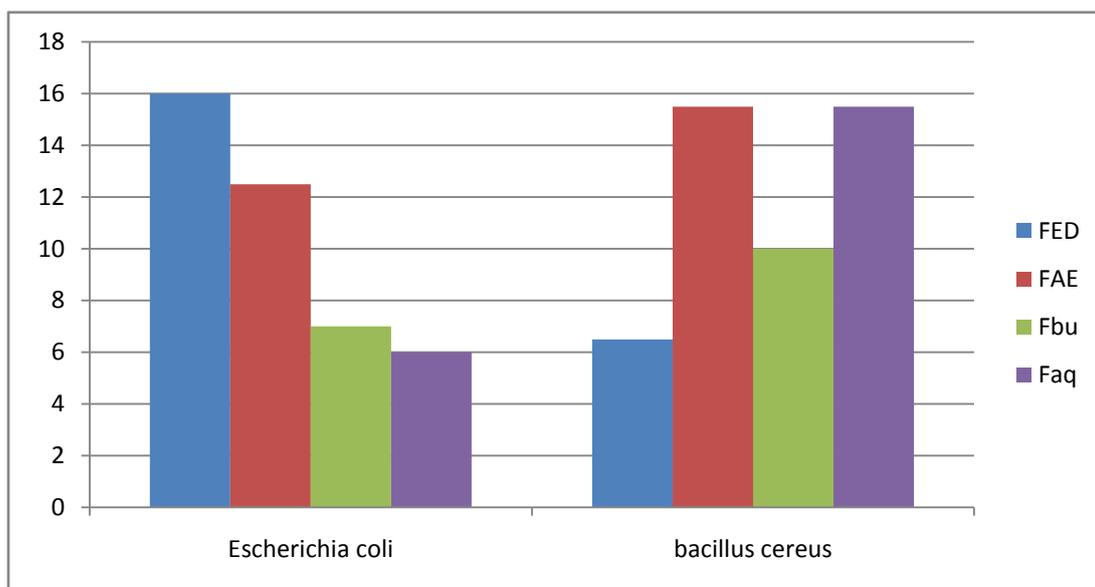
Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu' *bacillus cereus* apparait sensible vis-à-vis des extraits (flavonoïdes) testés, ces mêmes flavonoïdes développent des zones d'inhibition moyennement importantes vis-à-vis de *Escherichia coli* dont les diamètres des zones d'inhibition varient selon le tableau suivant ;

Fraction \ Bacterie	FED	FAE	FBu	Faq
<i>Escherichia coli</i> Gram -	16	12.5	7	6
<i>bacillus cereus</i> Gram +	6.5	15.5	10	15.5

Tableau04 : Les résultats des diamètres des zones d'inhibition

Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes sur l'espèces bactérienne d'*Escherichia coli* , *bacillus cereus*:

<p>Figure 18 : Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes les (4 phases) sur l'espèces bactérienne d' «<i>Escherichia coli</i> ».</p>	
<p>Figure 19: Résultats de l'activité antibactérienne des flavonoïdes les (4 phases) sur l'espèces bactérienne d' «<i>bacillus cereus</i> ».</p>	



FED : fraction éther di éthylique / FAE : fraction acétate d'éthyle / Fbu :fraction butanol

Faq :fraction aqueuse

Figure 20 : Diamètre des zones d'inhibition des fractions de l'extrait contre différentes Bactéries.

III-2-Discussion :

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérien des flavonoïdes isolés de l'urtica dioica par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton). L'activité antibactérienne de nos produits est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits flavoniques à tester vis-à-vis de deux germes pathogènes (*Escherichia coli*, et *bacillus cereus*), après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

A partir de diamètre des zones d'inhibition on obtient un grand pouvoir antibactérien, les deux fractions acétate di éthyle et butanol il est très efficace par rapport que les autres fraction, éther di éthylique et la phase aqueuse. selon le travail de (Kechkar, 2008) la phase acétate à donner également de grandes zones d'inhibition. cette phase contient les flavonoïdes monoglycosylée et la phase éther di éthylique contient les aglycones .

La sensibilité des bactéries à gram négatif traduit l'action antibactérien des flavonoïdes. on fait, cette sensibilité est en relation avec le nombre des hydroxyles libre dont on constate que les flavonoïdes les moins hydroxylés sont les plus actifs (Cowan,1990), supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupement hydroxyles libres ont plus d'activités antibactérienne par rapport à ceux qui en sont pourvus. ce qui conduit à une

augmentation de leurs affinité chimique aux lipides membranaires. selon ces données on peut supposer que les flavonoïdes testés visent la membrane cytoplasmique des microorganismes.

Les fractions acétate d'éthyle et aqueuse, donner un pouvoir antibactérienne sur l'espèce bactérien *bacillus cereus*, mais l'autre fraction éther di éthylique et acétate d'éthyle sont à été donner aussi un pouvoir antibactérienne avec *Escherichia coli*.et éprouvé par l'histogramme.

Conclusion et perspectives :

Notre étude a porté sur l'espèce *Urtica dioica* 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 herbivores et les insectes, en revanche l'homme les utilise dans le domaine pharmacologique.

Ce travail a commencé par un criblage phytochimique qui révèle la présence des flavonoïdes au niveau de cette plante.

Le résultat de la chromatographie sur couche mince montre que l'extrait méthanolique des feuilles contient de plusieurs types des flavonoïdes ; polyhydroxyflavones, oligohydroxy, oligométhoxyflavones, flavonones , flavonols , méthoxyflavanes .

L'étude antibactérienne des différentes fractions a montré un pouvoir antibactérien contre les bactéries à gram positif et celles à gram négatif.

On conclue avec les résultats obtenus que notre espèce étudiée (*Urtica dioica*) est riche en flavonoïdes, ces flavonoïdes présentent un pouvoir antibactérien très intéressant.

Comme perspectives, notre étude peut nous orienter vers d'autres objectifs plus particuliers comme l'analyse de la nature chimique des flavonoïdes présents et de leur mode d'action.

Les fleurs seraient très intéressantes dans notre étude, pour voir si elles sont aussi riches en métabolites secondaires que les feuilles.

Une étude comparative entre plusieurs espèces de la famille des *Urticacées* montrerait la richesse de ce groupe de plantes en métabolites secondaires. On pourrait également étudier terpènes et les tanins.

On pourrait également tester l'activité antimicrobienne, c'est-à-dire contre plusieurs micro-organismes comme les virus et les champignons.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE :

Abadlia, M. (2014) : Etude des huiles essentielles de la plante *Mentha piperita* et tester leurs effets sur un modèle biologique des infusions, mémoire de master université de Constantine 1, p.61

Ayad, R. (2008) : Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce : *Zygophyllum cournutum* (Zygophyllaceae), mémoire de magister, université de Constantine 1, p(32-47).

Boutaoui, N. (2012) : Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *Matricaria chamomilla* (Asteraceae) , étude de la phase acétate d'éthyle, mémoire de magister, université de Constantine 1, p : 21,(42-50) , 89, 92.

Bouklia, N. (2014) :Activité antioxydants des extraits des graines de la plante(*Nigella sativa* L), mémoire de master, université de Constantine 1, p : 5, 7.

Bouabid, S. (2014) : Evaluation de l'activité biologique de l'extraire éthyle acétate du (*Thé vert*) et l'extraire butanolique de la plante (*Chrysanthemum sp*) , vis à vis la toxicité induit par la streptozotocine, mémoire de master, université de Constantine 1, p :45, 48, 49, 55.

Boudria, H. (2013) :Contribution à l'étude des extraits bruts de la plante (*Urtica dioica*), mémoire de master, université de Kasdi Merbah Oran, p : 35p.

Bruneton, J.(2007) : Pharmacogénèse phytochimie plantes médicinales, livre, 4 eme édition, p : 901-905.

Chadi, D. (2014) : Construction à l'étude phytochimique des flavonoïdes chez l'espèce (*Prunus cersifera atropurea* L). et l'évaluation de leur pouvoirs antibactérienne , mémoire de master, université de Constantine 1, p : (34-38).

Djaaleb, S. (2014) : Etude quantitative et qualitative des composés phénoliques chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf) soumises à un stress hydrique et leur activités antimicrobienne , mémoire de master, université de Constantine 1, p : 13, 21, 22, 24.

François, P. (2010) : L'ortie dioïque, (*Urtica dioica* L.), étude bibliographique 2010, mémoire de docteur en pharmacie, université de Nantes , 139 p .

Hans w.kokhe(2007) :1000 plantes aromatiques et médicinales de A à Z propriétés et usages, p : 315.

Kismoun, S . (2014) : Etude phytochimique et bibliographique de la plante (*Satureja calaminitha*), mémoire de master, université de Constantine 1, p : (13-28).

Ramli, B. (2013) : Extraction des flavonoïdes de la plante (*Inula viscosa*) de la région d'Oran et mise en évidence de l'activité microbienne, mémoire de master, université de Constantine 1, p :77p.

Megnounif, I. (2011) :Etude de la valeur nutritive et de l'activité antioxydant d'*Urtica dioica* (l'ortie), mémoire de magister, université Aboubekr belkaid- Tlemcen , p : 77p.

Seguen, w. (2014) : Etude comparative phytochimique et biologique de deux plantes médicinal, (*Aloe barbadensis miller*) et (*Agave amiricana L.*), mémoire de master, université de Constantine 1, p : 81, 87, 88, 89.

Yousfi, M. (2008):Effet des extraits de quelque plantes médicinales, université amar teldji – laghouat, p :13, 14.

Zeghad, N. (2008): Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêts économique (*Thymus vulgagaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, mémoire de magister, université de Constantine 1, p : 2, 5, 41.

Ghedira, K. (2005) : Les flavonoïdes, structures, propretés biologique , rôle prophylactique et emplois en thérapeutiques, volume 3, issue 4, p162-169.

Bruneton, J.(2009) : *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4^e éd., revue et augmentée*, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, (wikipédia), 1288 p.

Mónica Galleano, Sandra V. Verstraeten, Patricia I. Oteiza, Cesar G. Fraga, (2010) : « *Antioxidant actions of flavonoids: Thermodynamic and kinetic analysis* », *Archives of Biochemistry and Biophysics*, (wikipédia),vol. 501.

Cesar G. Fraga, Monica Galleano, Sandra V. Verstraeten, Patricia I. Oteiza,(2010) : « *Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols* », *Molecular Aspects of Medicine*, (wikipédia).

Otuk, G. (1983) : Mycopathologia et dégradation d'un tanin condensé par plusieurs types de levures, livre (article), volume 83, issue 2, p (107-111).

Les sites internet

<http://en.wikipedia.org/wiki/Flavones>.

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Flavanone>.

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Flavonol>.

http://ekldata.com/7akHbt-L_fArivdxCrMUZDddbz0/CCM.pdfAP

http://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89vaporateur_rotatif.

<http://lycees.ac-rouen.fr/galilee/iesp27/chromato/chromatographie4.htm>.

Nom et Prénom

GUESSOUM DJABER

LECHEHEB HASSAN

Mémoire pour l'obtention du diplôme de : MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : biologie physiologie végétale

Option : Métabolisme secondaire et molécules bioactif

Thème :

**Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes
Chez *Urtica dioica* L. et évaluation de leur
Pouvoir antibactérien**

Résumé :

Ce travail comprend l'étude qualitative et quantitative de la nature chimique des composés du métabolisme secondaire particulièrement les flavonoïdes

Les Extraits de la plante *Urtica dioica*, qui pousse dans la région méditerranéenne, sont connus pour leur capacité thérapeutique comme plante médicinale.

Nous avons essayé de déterminer les espèces spécifiques de ces composés phénoliques en séparant par chromatographie sur couche mince (CCM) les extraits.

Ce travail a été complété par l'étude de l'efficacité de ces composés dans le pouvoir antibactérien sur deux types de bactéries. Les résultats sont positifs.

Mots clés :

Plante médicinale - *Urtica dioica* - métabolismes secondaire - les flavonoïdes - chromatographie sur couche mince (CCM) - bactéries - pouvoir antibactériennes.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme HAMOUDA DOUNIA (MCB - UFM Constantine).

Rapporteur : Mme BOUCHOUKH IMANE (MAA- UFM Constantine).

Examineurs : Mme KARA KARIMA (MAA - UFM Constantine).

Année universitaire : 2014/2015