

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
**Université A. MIRA – Bejaia**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-chimique  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : Biochimie Appliquée



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme  
**MASTER**

Thème

***Potentiel bioactif et activité anti-hémolytique d'*Urtica urens****

Présenté par :

**Mahdi Sabrina & Madi Melissa**

Soutenu le : **14 septembre 2022**

Devant le jury composé de :

Mme Boudjou .S	MCB	Présidente
Mr Tacherfiout .M	MCB	Encadreur
Mme Kadji-Djoudad .H	Professeur	Examinatrice

**Année universitaire : 2021/2022**

## **Remerciements**

*Nous tenons à remercier chaleureusement et très particulièrement notre promoteur M' TACHERFIOUT Mustapha, qui nous a encadré et dirigé avec ses précieux conseils ainsi que la confiance qu'il nous a accordée. On le remercie également pour sa disponibilité, sa patience qui nous ont permis d'avancer dans notre recherche.*

*Nos sincères remerciements s'adressent également aux membres de jury, d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire : M<sup>me</sup> BOUDJOU.S qui nous a fait l'honneur d'avoir accepté la présidence du jury de ce mémoire ainsi que, M<sup>me</sup> KADJI-DJOUAD.H d'avoir accepté d'examiner ce travail, qu'elles trouvent ici toute l'expression de notre profonde reconnaissance et notre respect.*

*Nous tenons aussi à remercier et exprimer notre reconnaissance à la technicienne de nous avoir accueillies dans le Laboratoire de Biologie Physico-Chimique avec beaucoup de gentillesse et de bienveillance.*

*Nous remercions aussi toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin pour achever ce travail, ainsi que l'ensemble de nos enseignants qui nous ont suivis tout au long de notre cursus.*

**Sabrina et Melissa**

## ***Dédicace***

*A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :*

- ❖ *A mon cher papa, mon précieux offre du dieu, pour son amour, son soutien, ses encouragements pour tout ce qu'il m'a apporté et les valeurs qu'il m'a enseignées, je vous serais toujours reconnaissante. Que dieu vous garde à mes côtés.*
- ❖ *A la prunelle de mes yeux, Maman, la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais cessée de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs. Que dieu vous procure bonheur, santé et longue vie. Que ce travail soit pour vous un motif de fierté.*
- ❖ *A ma grande sœur Hassina, ma binôme de vie, celle qui ne m'as jamais laissée tomber que dieu te réalise tous tes souhaits et te garde près de ton cher mari.*
- ❖ *A mon unique frère Bihmane, mon meilleur ami je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite, que dieu te préserve.*
- ❖ *A ma chère petite sœur Safia qui me remplit d'amour et de positivités, celle qu'illumine mes journées et me donne le sourire durant ce parcours.*
- ❖ *A la mémoire de ma grand-mère Mnana et mon grand-père Boualem qui auraient tant aimés assister à cet exploit. Que Dieu les accueille en son vaste paradis.*
- ❖ *A mon cher Khalil, ma force quotidienne celui qui m'encourage et arrive à me soulever quand je suis au plus bas, toujours présent dans les meilleurs et les pires moments.*
  - ❖ *A mes tantes, oncles, cousins et cousines et à toute la famille MAHDI et IKHLEF.*
- ❖ *A mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble. Et surtout à mon binôme et amie Melissa Madi avec laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler. Nous avons formé une belle équipe, je te remercie donc pour tout ce que tu m'as apporté au cours de cette année partagée.*
- ❖ *A toute la promotion Biochimie appliquée 2021/2022 et A tous le personnel de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et surtout à tous les enseignants qui ont participé à la réalisation de toutes mes études.*

***Sabrina***

## *Dédicace*

*Je commence ma dédicace au nom du Dieu qui nous tracé le chemin de nos vie, et le salut sur Mohamed le messager de Dieu. Je voudrais dédier ce modeste travail à :*

- ❖ *A toi ma **MÈRE**, l'être chère de ma vie, la lumière de mes yeux, toi qui est toujours là à me consoler, me soulager et m'encourager, toi qui a donné le précieux de toi pour me voir réussir de jour en jour, **MÈRE** tu es « La cause de ma réussite dans la vie ». J'espère que ce travail soit à tes yeux le fruit de tes efforts et un témoignage de ma profonde affection.*
- ❖ *A toi **PÈRE** qui a veillé toujours pour mon bien-être, « Toi **PÈRE** la lueur de mon chemin ». Merci pour toi mon **cher papa**, ta confiance a été toujours pour moi un encouragement vers un nouvel horizon. Merci pour m'avoir appris que le savoir est une richesse, que nul ne peut voler. Ce travail est le vôtre, Inshallah du trouveras ici toute mon affection et ma profonde gratitude pour toutes ces années de sacrifice pour moi.*
- ❖ *A mes **deux Frères**, secours de ma vie qui savent toujours comment procurer la joie et le bonheur pour moi.*
- ❖ *A la mémoire de mon oncle **Kamel** ainsi que mes deux grands-mères et mon grand-père **Houcine** qui auraient tant aimé assister à cet exploit. Que Dieu les accueille en son vaste paradis.*
- ❖ *A mon **Fiancé** et ma **Belle mère** qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mon mémoire. Que dieu les protège et leur offre la chance et le bonheur.*

*A mon cher **Grand-père**, qui je souhaite une bonne santé.*
- ❖ *A mes **oncles**, mes **tantes**, mes **cousins**, mes **cousines** et **mes amis**. Que dieu leur donne une longue et joyeuse vie.*
- ❖ *A toute ma famille « **Madi** » et « **Moussaoui** » et à tous ceux qui ont contribué un jour à mon éducation.*
- ❖ *Sans oublié **ma binôme** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce mémoire*
  - ❖ *A **mes enseignants** qui n'ont suivi tout au long de mon cursus universitaire et **mes collègues** de la promotion 2022 biochimies appliquées.*

*Melissa*

# *Table des matières*

## **Table des matières**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction..... 1**

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

I.1. Généralités.....	2
I.1.1. Les Urticacées .....	2
I.1.2. Description et classification botanique .....	2
I.1.3. Propriétés biologiques et utilisation thérapeutique.....	3
I. 2-Les globules rouges et le processus hémolytique .....	4
I.2.1. Caractéristiques des érythrocytes.....	4
I.2.2. Biosynthèse des globules rouges.....	4
I. 2. 3. Processus de l'hémolyse. ....	5
I.2.4. Physiopathologie d'hémolyse .....	5
I.2.4.1. Hémolyse physiologique.....	5
I .2.4.2. Hémolyse pathologique .....	5
I. .3. Stress oxydatif et antioxydants.....	6
I .3.1. Mécanisme d'oxydation des hématies par les EROs.....	6
I .3.2. Systèmes de défense contre le stress oxydatif.....	7
I .4. Les métabolites secondaires.....	9
I .4.1. Les Composés phénoliques .....	9
I .4.1.1. Les acides phénoliques.....	9
I .4.1.2. Les flavonoïdes .....	10
I .4. 1.3. Les tanins.....	10
I .4.2. Les alcaloïdes .....	11
I.4.3 Les terpènes.....	12

### **Chapitre II : Matériels et méthodes**

II.1. Appareillage et produits chimiques .....	13
II.2. Matière végétale .....	13

---

II.3. Préparation des extraits hydro-alcoolique .....	14
II. 4. Analyses phytochimiques .....	14
II .4.1. Dosage des polyphénols totaux .....	14
II .4.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	15
II .4.3. Dosage des flavones et flavonols .....	15
II .4.4. Dosage des tannins condensés.....	16
II.5. Activité anti-hémolytique .....	16
II .5.1. Préparation de la suspension érythrocytaire.....	16
II .5.2. Evaluation de la cyto toxicité des extraits sur les érythrocytes.....	17
II .5.3. Induction de l'hémolyse par le NaCl.....	17
II .5.4. Evaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits.....	17
II.6. Analyse statistique .....	18

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

III. 1 Résultats et interprétations.....	19
III.1.1. Taux d'extraction.....	19
III. 1.2. Dosage des métabolites secondaires .....	19
III. 1.2.1. Teneur en polyphénols totaux.....	19
III. 1.2.2 Teneur en flavonoïdes .....	20
III. 1.2.3 Teneur en flavones et flavonols .....	21
III. 1.2.4 Teneur en tanins condensés .....	21
III.1.3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique .....	22
III.1.3.1. Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur les érythrocytes.....	22
III.1.3.2 Evaluation de l'effet hémolytique induit par le NaCl sur les érythrocytes.....	24
III.1.3.3 Evaluation des effets anti- hémolytiques des extraits sur les érythrocytes...	25
III.2. Discussion .....	26
<b>Conclusion .....</b>	<b>30</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>31</b>

## Liste des abréviations

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium

**APGI** : Acides gras polyinsaturés

**CAT** : Catalyse

**CuZnSOD** : Ions de cuivre et de zinc, superoxyde dismutase

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**ERO**: Espèces réactives oxygénées

**GPX** : Glutathion peroxydase

**GSH** : Glutathion

**GSSG** ; Disulfure de glutathion

**H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : Acide phosphomolybdique

**IPP** : Isopentenyl pyrophosphate

**KCL** : Chlorure de potassium

**MDA** : Malonyldialdéhyde

## Liste des figures

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Squelette de base des flavonoïdes	<b>10</b>
<b>2</b>	La structure d'un Alcaloïde	<b>11</b>
<b>3</b>	(1) Les feuilles d' <i>Urtica urens</i> , (2) La poudre fine des feuilles d' <i>Urtica urens</i> (originale)	<b>14</b>
<b>4</b>	Teneurs en polyphénols totaux des extraits hydro-alcooliques des feuilles d' <i>Urtica urens</i>	<b>19</b>
<b>5</b>	Teneurs en flavonoïdes des extraits hydro-alcooliques des feuilles d' <i>Urticaurens</i>	<b>20</b>
<b>6</b>	Teneurs en flavones et flavonols des extraits hydro-alcooliques des feuilles d' <i>Urtica urens</i>	<b>21</b>
<b>7</b>	Teneurs en tanins condensés des extraits hydro-alcooliques des feuilles d' <i>Urtica urens</i>	<b>22</b>
<b>8</b>	Effet hémolytique des extrait hydro-alcooliques méthanolique et éthanolique des feuilles d' <i>Urtica urens</i>	<b>23</b>
<b>9</b>	Variation du pourcentage d'hémolyse induit par NaCl à différentes concentrations	<b>24</b>
<b>10</b>	Effet anti hémolytique des extraits hydro-alcooliques des feuilles d' <i>Urtica urens</i> à différentes concentrations contre l'hémolyse induite par le NaCl	<b>25</b>

**Liste des tableaux**

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	La classification taxonomique d' <i>Urtica urens</i>	<b>3</b>
<b>II</b>	les principaux constituants chimiques d' <i>Urtica urens</i>	<b>3</b>
<b>III</b>	Les systèmes de défense contre le stress oxydatif	<b>8</b>
<b>IV</b>	Structures des différents acides phénoliques accompagnées de quelques exemples	<b>9</b>
<b>V</b>	Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples	<b>10</b>
<b>VI</b>	Les classes des tanins	<b>11</b>
<b>VII</b>	Classification des terpénoïdes	<b>12</b>
<b>VIII</b>	Matériel et produits chimiques utilisés dans la présente étude	<b>13</b>
<b>IX</b>	Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par le NaCl après traitement des érythrocytes par différentes concentrations des extraits éthanolique et méthanolique d' <i>Urtica urens</i>	<b>26</b>

# *Introduction*

## Introduction

En dépit, de l'amélioration remarquable des conditions de vie durant ces dernières décennies, l'anémie persiste un facteur pathologique important qui affecte l'homme, ce qui nécessite des recherches spécialisées et plus appropriées afin de découvrir de nouveaux médicaments pour permettre la limitation de ce syndrome mondiale (**Agrawal et al., 1991**).

Cette pathologie se traduit par une baisse anormale du nombre de globules rouges ainsi que l'hémoglobine suite à une hémolyse accélérée souvent liée à un stress oxydatif, l'hémolyse peut se présentée sous forme acquise ou héréditaire (**Zinebi et al., 2017**).

La recherche scientifique actuelle s'oriente vers la phytothérapie pour contrecarrer les effets néfastes des anémies; en effet, les plantes médicinales possèdent des métabolites secondaires qui constituent un immense réservoir de composés d'une grande diversité chimique et sont doués de plusieurs activités biologiques, telles que les activités anti-oxydantes et anti-hémolytiques. Parmi ces plantes on retrouve *Urtica urens L* communément appelée l'ortie brulante, c'est une herbacée vivace de la famille des urticacées qui est connue pour ses propriétés médicinales (**Lefief-Delcourt, Alix, 2012**).

Le but du présent travail était d'évaluer la composition phytochimique des feuilles d'*Urtica urens* d'une part, et d'autre part, évalué l'effet des extraits dans un modèle d'hémolyse induite par le chlorure de sodium sur les érythrocytes humains.

Le premier chapitre de ce manuscrit a été consacré à une synthèse bibliographique sur des généralités sur la plante *Urtica urens*, les érythrocytes, le processus hémolytique ainsi que les métabolites secondaires. Le deuxième chapitre explique et détaille la méthodologie expérimentale suivi. Enfin, le dernier chapitre rapporte les résultats obtenus accompagné d'un essai de leurs interprétations.

*Synthèse  
Bibliographique*

## I-1- Généralité sur *Urtica urens*

### I-1-1- Les urticacées

La famille des urticacées rassemble environ 1000 espèces qui appartiennent à une cinquantaine de genres, dont le genre « *Urtica* ». Ce dernier regroupe plus de 80 espèces différentes (**Bertrand, 2010**). *Urtica dioica* L. (la grande ortie) et *Urtica urens* L. (la petite ortie) sont les espèces les plus utilisées pour leurs multiples propriétés, elles sont connues pour posséder des propriétés médicinales (**Lefief et Alex, 2012**).

*U.urens* est largement répartie dans la région méditerranéenne (**Afifi et Abu-Irmaileh, 2000**), l'extrait de cette espèce a été utilisé longtemps dans des nombreux pays à travers le monde comme un remède traditionnel pour le traitement de diverses maladies (**Kavalali et al., 2003**).

### I-1-2- Description et classification botanique

*Urtica urens* est une plante originaire des régions tropicales et subtropicales plus exactement « L'Eurasie ». Elle est répartie dans les zones tempérées, précisément les sols riches en azote. La floraison se produit de juin à septembre (**Wichtl et Anton, 2003**).

C'est une plante annuelle de 20-60 cm de long, avec des feuilles elliptiques ou ovales et assez petites de couleur vert clair et sont couvertes de poils urticants sur leurs deux faces ; ils sécrètent un liquide brûlant (**Feng et al., 2022**).

Cette herbacée vivace possède une tige érigée, dressée et hérissée de poils urticants, souvent rameuse dès la base (**Bussmann et al., 2016**). Elle porte des petites fleurs tétramères, staminées et pastillées, réunies en grappes allongées ; le fruit est sec avec une forme ovale, de type akène jusqu'à 1,5 mm de long.

*Urtica urens* appartient à l'ordre des urticales et à la famille des urticacées (Tableau I)

**Tableau I :** Classification taxonomique d'*Urtica urens* suivant l'Angiosperme Phylogénie Group (APGIII, 2009)

<b>Règne</b>	<b>Plantae</b>
<b>Embranchement</b>	Angiosperme
<b>Classe</b>	Dicotylédones
<b>Ordre</b>	Urticales
<b>Famille</b>	Urticacées
<b>Genre</b>	<i>Urtica</i>
<b>Espèce</b>	<i>Urtica urens</i> L

### I-1-3- Propriétés biologiques et utilisation thérapeutique

Les orties reconnaissent une importante richesse en sels minéraux : le calcium et le potassium. Ils contiennent également l'acide salicylique qui est bénéfique pour la peau, les ongles et les tissus conjonctifs, d'autre part de l'acide folique. Les racines sont riches en principes actifs tout comme les feuilles, ainsi que des vitamines qui renforcent les défenses immunitaires (Ghedira et al., 2009).

La composition de la petite ortie est intéressante, car les extraits de racines et de feuilles sont largement utilisés en médecine traditionnelle dans de nombreuses régions du monde (Ghedira et al., 2009).

**Tableau II :** les principaux constituants chimiques d'*Urtica urens*.

Groupes chimiques	Constituants
Acides phénols	Acides caféique et ces esters, Acide chlorogénique, Acides coumarique, Acide syringique, Acide gallique, et Acide férulique (Proestos et al., 2006)
Flavonoïdes	3-O glycosides et 3-O-rutinosides du Quercétol, du Kaempférol et de l'isorhamnétol (dans les fleurs), Quercétine et rutine (dans les feuilles) (Ji et al., 2007)
Autres constituants	Scopolétole, sitostérol, glycoprotéines, lipides, sucres, acides aminés libres, chlorophylle (Proestos et al., 2006)

L'ortie est toujours proposée par les phytothérapeutes comme remède traditionnel pour l'anémie, le manque d'énergie, la goutte, les rhumatismes, l'hypertension ou les problèmes cardiaques, les troubles biliaires et hépatiques (Valnet, 1983 ; Wichtl et Anton, 2003).

Cette plante fait partie de la liste des plantes médicinales réservées dans les pharmacopées du monde entier. Elle est utilisée dans une variété de médicaments allopathiques, et les recherches se poursuivent mais certaines utilisations empiriques sont actuellement confirmées (Yaner et al., 2009).

## I-2-Les globules rouges et le processus hémolytique

### I-2-1- Caractéristiques des érythrocytes

Les érythrocytes également appelés hématies ou globules rouges sont formés dans la moelle osseuse et représentent 35 à 45% du volume sanguin. Elles sont des petites cellules anucléées très simplifiée en forme de disque biconcave dont le constituant essentiel est l'hémoglobine (Sultan et al., 1987). Cette forme particulière lui permet d'avoir une grande surface qui favorise les échanges d'oxygène. Elles sont élastiques d'une large déformabilité qui leurs admis de franchir les capillaires (Mohandas et Gallagher, 2008). Ces cellules sont les plus abondantes dans le corps humain, possédant des caractéristiques physiologiques et morphologiques souhaitable (Kozlova et al., 2013).

### I-2-2- Biosynthèse des globules rouges

La biosynthèse des hématies se déroule dans la moelle osseuse qui reste leur seul site de production, à partir des cellules souches multipotentes pendant 5 à 6 jours par un processus complexe : L'hématopoïèse (Valensi, 2005). Sous l'action d'une hormone : l'hématopoïétine, les globules rouges se différencient et perdent leur noyau, ce qui induit à la formation des réticulocytes. Ces dernières pénètrent dans la circulation sanguine ou leur maturation s'achève en 24 à 48h (Courtois et al., 2007). Cette maturation peut ainsi se dérouler dans la rate par la synthèse d'hémoglobine puis la perte des mitochondries et des ribosomes. En dernier, les globules rouges migrent dans le sang ou leur durée de séjour est de 120 jours, après ce temps, il sera expulsé du corps humain (Courtois et al., 2007 ; Rother et al., 2005).

### I-2-3- Processus de l'hémolyse

L'hémolyse (hémo : sang ; lyse : perturbation) est un phénomène physiologique irréversible qui aboutit à la rupture de la membrane des hématies suite à une durée de vie moyenne de 120 jours, provoquant ainsi la libération des éléments intra-érythrocytaires dans le plasma notamment l'hémoglobine (Loustau *et al.*, 2011). Cet événement se manifeste par une augmentation des taux sériques en hémoglobine associée à une diminution du taux d'hémoglobine glyquée (Ali *et al.*, 2014)

### I-2-4- Physiopathologie de l'hémolyse

#### I-2-4-1- Hémolyse physiologique

Elle se caractérise par la destruction des globules rouges après une durée de vie de 120 jours par vieillissement, elle sera compensée immédiatement par la moelle osseuse, sans répercussions cliniques ni biologiques (Rother *et al.*, 2005).

- **Hémolyse extra-vasculaire** : elle désigne le processus par lequel les globules rouges âgés sont phagocytés par les macrophages du système de phagocytes qui a lieu dans la moelle osseuse, le foie et la rate, cette phagocytose se traduit par des modifications biochimiques, morphologiques et de la plasticité (Aguilar, 2007).
- **Hémolyse intra-vasculaire** : elle se déroule au sein de la circulation sanguine, dans ce cas l'hémoglobine est libérée dans le plasma où elle forme un complexe avec la protéine plasmatique haptoglobine, synthétisée dans le foie. Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est catabolisée (Loustau *et al.*, 2011).

#### I-2-4-2- Hémolyse pathologique

L'hémolyse pathologique se caractérise par une destruction précoce et exagérée des globules rouges qui peut être intrinsèque (hémolyse corpusculaire) ou extrinsèque (hémolyse extra-corpusculaire) (Fibash et Rachmilwitz, 2008).

- **Une hémolyse d'origine corpusculaire** : est due aux anomalies de globules rouges, c'est-à-dire la destruction des hématies, provenant de sa fragilité, déficit enzymatique par exemple si l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase fait défaut, les agents oxydants peuvent dénaturer l'hémoglobine et les lipides membranaires, favorisant ainsi la lyse des hématies (Aguilar, 2007).

- **Une hémolyse extra-corporelle** : c'est l'agression extrinsèque des hématies qui est caractérisée par une agression directe de l'hématie par des toxines et la rigidité anormale acquise de la membrane (**Laustau et al., 2011**).

### I-3- Stress oxydatif et antioxydants

L'équilibre biochimique oxydants/antioxydants est un élément capital qui conditionne notre état physiologique, c'est un système naturel de défense antioxydant, enzymatique et non enzymatique contre les oxygènes dits actifs tels que les radicaux libre (**Morelle-Lauzanne, 2006**).

Parfois les cellules ou tissus de l'organisme subissent un état anormal (**Favier, 2006**) qui se réfère par un déséquilibre de la balance entre la génération des espèces réactives oxygénées (ERO) et les systèmes de défense antioxydants (**Pincemail et al., 2009**) engendrant ainsi des dégâts tissulaires à travers les modifications oxydatives des biomolécules cellulaires (lipides, protéines, acides nucléiques) : C'est ce qu'on appelle un stress oxydatif (**Gammoudi et al., 2013**).

Ce phénomène peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnemental (**Ardaillou, 2004**).

#### I-3-1- Mécanisme d'oxydation des hématies par les EROs

Les hématies du fait de leurs composantes membranaires et la richesse d'hémoglobine en fer peuvent subir une attaque par les EROs tel que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, issues d'une altération des défenses antioxydants, entraînant ainsi l'oxydation de leurs chaînes lipidiques et protéiques ainsi qu'une auto oxydation d'hémoglobine (**Watanabe et al., 1990**). Cette oxydation spontanée d'oxyhémoglobine extracellulaire permet à l'eau ou à de petit anion de pénétrer, aboutissant à un transfert d'électron du fer ferreux à l'oxygène, ce qui aboutit à la formation de la méthémoglobine (fer ferrique) ainsi que l'anion superoxyde (**Guettiridge, 1983**). Par ailleurs, la dismutation spontanée du radical superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sous l'action du superoxyde dismutase constitue la principale source du peroxyde d'hydrogène dans les globules rouges (**Low et al., 2008**).

L'accumulation du peroxyde d'hydrogène en présence des métalloprotéines crée la possibilité de la génération du radical hydroxyle. Ce dernier réagit avec les acides gras

polyinsaturés (AGPI) qui sont des espèces très abondants et sensibles des lipides de la membrane érythrocytaire par l'arrachement de son atome d'hydrogène pour former le radical lipidique : Initiation de la lipoperoxydation (**Gardès, 2006**). Ce dernier se transforme en radical pyroxyde lipidique (LOO<sup>\*</sup>) suite à son interaction avec l'O<sub>2</sub>. Le radical peroxy lipidique peut facilement arracher un atome d'hydrogène d'une autre molécule d'acide gras afin d'aboutir à la formation du Peroxyde d'acides gras (LOOH) : l'étape de la propagation (**Durand et al., 2013**). Au final, la formation de composés aldéhydes toxiques tel que le malonyldialdéhyde (MDA), ayant une forte réactivité vis-à-vis des protéines. Ces enchainements provoque des lésions cellulaires et diminue la demi-vie des érythrocytes ce qui contribue à une hémolyse accélérée (**Flourie et al., 2006**).

### **I-3-2- Systèmes de défense contre le stress oxydatif**

Les dommages significatifs à l'oxydation des érythrocytes sont évités par des systèmes antioxydants qui peuvent être définis comme toutes substances qui exercent une inhibition de la production des EROs, et la peroxydation lipidique (**Fontaine et al., 2002**), il existe deux catégories (Tableau II)

Tableau III : Les systèmes de défense contre le stress oxydatif

<b>Système enzymatique</b>	
<b>Superoxyde dismutase</b>	<p>-Élimination de l'anion superoxyde par une réaction de dismutation.</p> <p>-La production de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène.</p> <p><b>(Defraigne et Pincemail, 2008)</b></p> <p>-Elle existe sous deux formes (<b>Bonnefont-Rousselot et al., 2002</b>):</p> <p>1/Cytoplasmique nécessite comme cofacteur les ions de cuivre et de zinc (CuZn SOD).</p> <p>2/ Mitochondriale utilise le manganèse comme cofacteur (Mn SOD)</p>
<b>Catalase</b>	<p>-Catalyse la détoxification de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit par la superoxyde dismutase, suivant la réaction suivante :</p> <p><math>2 \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{cat}} 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2</math> (<b>Bonnefont-Rousselot et al., 2002</b>).</p>
<b>Glutathion peroxydase (GPX)</b>	<p>-Elle assure la transformation des hydroperoxydes (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène, selon la réaction suivante :</p> <p><math>2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}</math> (<b>Rees et al., 2004</b>),</p>
<b>Système non enzymatique</b>	
<b><math>\alpha</math>-tocophérol (vitamine E)</b>	<p>-Elle a la capacité de capter les radicaux peroxydes lipidiques (RO<sub>2</sub>·) qui propagent les chaînes de peroxydation (<b>Rees et al., 2004</b>).</p>
<b>Acide ascorbique (vitamine C)</b>	<p>-Il est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés, puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles (OH·), mais aussi avec les radicaux superoxydes (O<sub>2</sub>·) (<b>Rees et al., 2004</b>)</p>
<b>Les caroténoïdes et les composés phénoliques</b>	<p>-Des bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes.</p> <p>-Sont des molécules très intéressantes puisqu'elles ont la capacité de prévenir les dommages induits par les EROs (<b>Esposito et al., 2002</b>)</p>

## I-4- Les métabolites secondaires

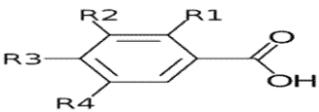
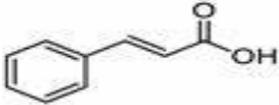
### I-4-1- Les Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des molécules qui possèdent un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle libre. La voie shikimate est l'origine de la formation la grande majorité de composés phénoliques à partir de l'acide cinnamique (Ferrazzano et al., 2011).

#### I-4-1-1 Les acides phénoliques

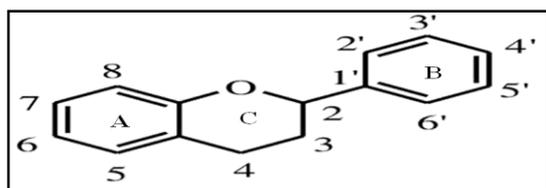
Ce sont des dérivés hydroxylés possédant des propriétés antioxydants et anti radicalaires (Hennebelle, 2006). Ils sont représentés par deux sous-classes, les acides hydroxy-benzoïques et les acides hydroxy-cinnamiques (Salhi, 2017).

**Tableau IV** : Structures des différents acides phénoliques accompagnées de quelques exemples.

Classe	Structure	Exemples
<b>Acides hydroxy-benzoïques (C6-C1) :</b> dérivent de l'acide benzoïque (Boubekri, 2014)	 (Therriault, 2004)	- Acide Vanillique - Acide gallique
<b>Acides hydroxy-cinnamiques (C6-C3) :</b> dérivent de l'acide cinnamique (Manach et al., 2005)	 (Ksouri et al., 2012)	- Acide p-coumarique - Acide férulique - Acide caféique

### IV.1.2 Les flavonoïdes

Ils partagent tous une même structure de base, formée par 15 atomes de carbones (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>C<sub>6</sub>) assemblés en 3 cycles : deux noyaux aromatiques et un hétérocycle oxygéné central (**Kim et al., 2004**). Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes : flavones, flavanol et flavanones (**Tableau V**) (**Tabart, 2011**).



**Figure 1** : Squelette de base des flavonoïdes (**Collin et Crouzet, 2011**).

**Tableau V** : Principales classes des flavonoïdes avec quelques exemples (**Nkhili, 2009**).

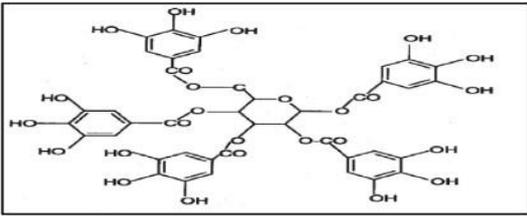
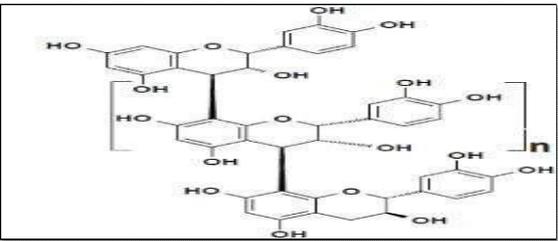
Classe :	Structures :	Exemples :
<b>Flavones</b>		Apigénine.
		Lutéoline.
		Diosmétine.
<b>Flavonols</b>		Kaempférol
		Quercétine.
		Myrecétine.
<b>Flavanones</b>		Naringénine.
		Eriodictyol

### IV.1.3 Les tanins

sont des substances poly phénoliques, le plus souvent hydrosolubles (**Frutos et al., 2004**). Ils dérivent de l'acide gallique et d'autres acides poly-phénoliques et ils résultent de l'estérification, par ces acides, des fonctions alcooliques du glucose (**Bruneton, 1999**).

- ✓ Selon la nature des assemblages moléculaires, les tanins sont classés en 2 groupes

Tableau VI : Les classes des tanins (Berreghioua, 2016)

<p><b>Tanins hydrolysables</b></p>	
<p><b>Tanins condensées</b></p>	

#### I-4- Les alcaloïdes

Ce sont des composés organiques d'origine végétale, azotés, plus ou moins basiques et possèdent des structures très variées le plus souvent hétérocycliques (Figure 2). A l'état naturel, les alcaloïdes existent sous forme de sels d'acides minéraux ou organiques (Bruneton, 1999). Ils sont issus du métabolisme des acides aminés et possèdent des propriétés pharmacologiques marquées, comme la morphine, qui est utilisé comme analgésique pour les douleurs sévères (Wink, 1998).

On distingue trois grandes classes selon la présence ou non d'un acide aminé comme précurseur direct, et qu'ils comportent ou non un atome d'azote dans un hétérocycle : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes ainsi que les pseudo-alcaloïdes (Bruneton, 1999).

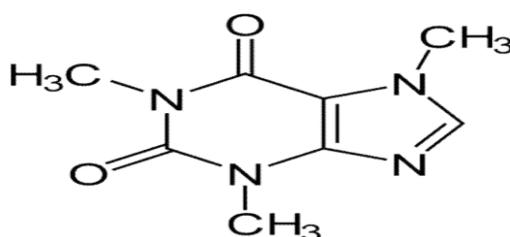
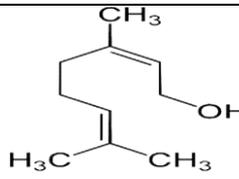
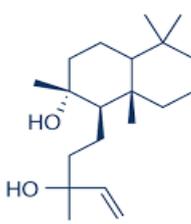
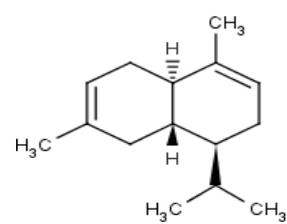


Figure 2 : La structure de base d'un alcaloïde (Cordell et al., 2001)

### I-4-3- Les Terpènes

Appelés aussi terpénoïdes ou isoprénoïdes, ces métabolites sont des hydrocarbures naturels qui constituent le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux (**Gershenzon et Croteau, 1991**). Les Terpènes peuvent présenter une structure acyclique ou bien cyclique (**Kesselmeier et Staudt, 1999**), ils sont produits à partir d'un isopentenyl pyrophosphate (IPP), une molécule de cinq atomes de carbone. Par des réactions de combinaisons et enchaînements sont formés : les monoterpènes, les sesquiterpènes et les diterpènes (**Morel, 2017**).

**Tableau VII** : Classification des terpénoïdes (**Belbache, 2003**)

Type de terpénoïdes :	Exemples :	Structure :
Monoterpène	Nérol	
Diterpène	Sclaréol	
Sesquiterpène	B-cadinène	

# *Matériel et méthodes*

## II- Matériel et méthodes

### II-1- Appareillage et produits chimiques

Le matériel et les produits chimiques utilisés pour la réalisation de ce travail sont résumés dans le tableau suivant.

**Tableau VIII** : Matériel et produits chimiques utilisés dans la présente étude.

Matériel	Produits chimiques
Agitateur (VELP)	Acétate de Sodium (CH <sub>3</sub> COONa)
Bain marie (Fisher Scientific)	Acétone
Balance (OHAUS)	Acide chlorhydrique (HCl)
Becher	Acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
Broyeur électrique	Carbonate de Sodium (NaCO <sub>3</sub> )
Centrifugeuse	Catéchine
Cristalliseur	Chlorure de potassium (KCl)
Erlenmeyer	Chlorure de sodium (NaCl)
Etuve (POL-EKO)	Diméthylsulfoxyde (DMSO)
Gants	Ethanol (96%)
Micropipettes	Folin-Ciocalteu
PH mètre (HANNA INSTRUMENTS)	Hydrogène phosphate dipotassium (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
Spectrophotomètre (RAYLEIGH)	Hydrogène-phosphate de sodium (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
Tamis INOX	Méthanol absolu
Tubes Eppendorff	Quercétine
Tubes à essais	Triochlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> )
Tubes à hémolyse	Vanilline(C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )
Tubes héparine	
Vortex (VELP)	

### II-2- Matière végétale

La plante d'*Urtica urens* a été récoltée au mois d'Avril 2022 dans la région Taourirt-larbaa Daïra d'Elkseur, Wilaya de Bejaïa. Les feuilles d'*Urtica urens* ont été séparées, lavés et bien nettoyés à l'eau du robinet pour éliminer les impuretés, puis séchées à une température ambiante à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 2 jours, puis mises à l'étuve à 40°C pendant 24h pour compléter le séchage. Cette partie de la plante (feuilles) a été broyée par un broyeur électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine, puis tamisée sur un tamis pour avoir une poudre homogène d'un diamètre de 125 µm. La poudre a été stockée à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des bocaux en verre bien fermés jusqu'à extraction.



**Figure 3 :** (1) Les feuilles d'*Urtica urens*, (2) La poudre fine des feuilles d'*Urtica urens* (originale)

### II.3. Préparation des extraits hydro-alcooliques

L'extraction de la poudre végétale a été réalisée par macération. Une prise de 25 g de la poudre a été macérée avec 250 ml de trois différents solvants : éthanol à 70%, méthanol à 70% et acétone à 70% (70% solvant et 30% eau distillé ; v/v). Les mélanges ont été laissés sous agitation magnétique pendant 24h à température ambiante, puis filtrés trois fois sur papier Whatman et les filtrats récupérés ont été mis dans un évaporateur rotatif pour évaporer les différents solvants. Ces mêmes filtrats ont été mis ensuite à l'étuve à 40°C pendant 48h pour évaporation complète, et jusqu'à ce que le poids des extraits reste constant. Les extraits secs obtenus ont été pesés afin de calculer le taux d'extraction selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = [(P1 - P0) / E] \times 100$$

P1 : Poids du cristalliseur contenant l'extrait (g)

P0 : Poids du cristalliseur vide (g)

E : Poids de la poudre végétale (g)

### II-4- Analyses phytochimiques

#### II-4-1- Dosage des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux des extraits a été déterminé selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif Folin-Ciocalteu. Ce réactif est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Il est

réduit lors de l'oxydation des phénols en oxyde bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur produite est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits (**Ghazi et Sahraoui, 2005**).

Un volume de 125 µl de chaque extrait a été introduit dans un tube à essai, auquel un volume de 625 µl du réactif de Folin (10%) a été ajouté. L'ensemble a été incubé pendant 5 min. Ensuite, un volume de 500 µl de carbonate de sodium (6%) est additionné. Le mélange réactionnel a été soigneusement agité puis incubé pendant 90 min à l'abri de la lumière et l'absorbance a été mesurée à 720 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (**Beretta et al., 2005**).

La concentration des polyphénols totaux est calculée, en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions utilisant l'acide gallique comme standard (0-35 µg /ml) (**Annexe I**). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait sec).

#### II-4-2- Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par colorimétrie basé sur la formation d'un complexe d'une coloration jaunâtre très stable entre l'ion de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) et les groupements hydroxydes OH en position 5 des flavonoïdes (**Maksimovic et al., 2005**).

Un volume de 0.5 ml de chaque extrait a été mélangé à un volume de 0.5 ml d'une solution de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) à 2%. Le mélange a été bien homogénéisé au vortex puis incubé pendant 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ainsi l'absorbance a été lue à 434 nm. Les concentrations des flavonoïdes ont été déduites à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (0-30 µg/ml) dans les mêmes conditions (**Annexe II**), et exprimée ensuite en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g extrait sec) (**Bahorun et al., 1996**).

#### II-4-3- Dosage des flavones et flavonols

La quantité des flavones et flavonols dans les extraits hydro-alcooliques a été évaluée suivant la méthode rapportée par **Kosalec et al. (2004)**. Un volume de 250 µl de chaque extrait est mélangé avec 1,4 ml d'eau distillée, 750 µl d'éthanol (95%), 50 µl d'AlCl<sub>3</sub> (10%) et 50 µl d'acétate de sodium 1M. Le mélange obtenu a été agité à l'aide d'un vortex puis incubé pendant 15 min à température ambiante et à l'abri de la lumière et l'absorbance a été

lue à 430 nm. Une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions en utilisant la quercétine (0-15 µg/ml) (**Annexe III**), et la teneur en flavones et flavonols est exprimé ensuite en milligramme équivalent de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g extrait sec).

#### II-4-4- Dosage des tanins condensés

Les teneurs en tanins dans les extraits ont été déterminées selon la méthode adaptée à la vanilline qui réagit avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe vert (**Price et al., 1978**). Un volume de 250 µl de chaque extrait a été additionné à 1250 µl de la solution méthanolique de la vanilline à 4%, puis homogénéisé par le vortex. Le mélange obtenu a été laissé réagir à température ambiante pendant 15 min. L'absorbance est mesurée à 500 nm (**Julkunen-Titto et al., 1985**).

Différentes concentration comprises entre 0 -200 µg/ml ont été préparées à partir d'une solution mère de la catéchine dans les mêmes conditions pour tracer la courbe d'étalonnage. La teneur en tanins condensés a été ensuite exprimée en milligramme équivalent de catéchine par gramme d'extrait sec (mg EC/g extrait sec).

#### II-5- Activité anti-hémolytique

Dans le but d'évaluer l'activité anti-hémolytique des extraits des feuilles *d'Urtica urens*. Les échantillons de sang utilisés dans la présente étude ont été fournis par des bénévoles sains n'ayant pas pris d'anti-inflammatoires non stéroïdiens dans les 48 heures précédentes.

##### II-5-1- Préparation de la suspension érythrocytaire

La suspension érythrocytaire a été préparée comme décrit par **Haddouchi et al. (2016)**. Du sang fraîchement prélevé a été mis dans des tubes héparines puis centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes pour séparer les globules rouges des autres éléments constitutifs du sang. Le culot globulaire contenant les hématies a été récupéré, puis a subi un lavage trois fois avec une solution saline de tampon phosphate à pH 7,4 (PBS). Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 3000 rpm pendant 10min. Après la dernière centrifugation, le culot a été resuspendu dans le même tampon pour obtenir un hématocrite de 10%, qui est utilisé immédiatement après préparation.

### II-5-2- Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur les érythrocytes

La cytotoxicité des extraits hydro-alcooliques des feuilles d'*Urtica urens* a été testée sur les érythrocytes. Les extraits ont été solubilisés dans le tampon phosphate salin, pH 7.4 contenant 5% du DMSO (diméthylsulfoxyde). Un volume de 500 µl de chaque extrait à des concentrations différentes (25, 50, 75, 100, 200, 500 µg/ml) a été ajouté à 250 µl de la suspension érythrocytaire (hématocrite à 10%). Le mélange obtenu a été laissé au bain-marie pour une incubation de 4 heures à 37°C, en agitant délicatement les tubes toutes les heures. Ensuite, un volume de 3.75 ml de la solution PBS a été ajouté pour chaque échantillon, puis centrifugé à 2000 rpm pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été lue à 540 nm et le pourcentage d'hémolyse a été calculé selon la formule suivante contre un control réalisé avec l'eau distillé et considéré comme étant l'hémolyse à 100%.

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \left[ \frac{\text{Abs en présence de l'extrait}}{\text{Abs de l'hémolyse totale (H}_2\text{O)}} \right] \times 100$$

### II-5-3- Induction de l'hémolyse par le NaCl

Le test d'effet hémolytique de NaCl a été réalisé selon un protocole effectué sur des suspensions érythrocytaires à hématocrite de 10%. Dans des tubes à hémolyse, 5 ml de NaCl (dans le PBS) à différentes concentrations (3.5 mg /ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml et 6 mg/ml,) ont été ajoutés à 100 µl de la suspension érythrocytaire puis incubés au bain marie à 37°C durant 30minutes. Le mélange obtenu a été centrifugé à 2000 rpm/10 minutes. Les absorbances des surnagants ont été enregistrées à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV- Visible contre un contrôle négatif contenant du NaCl isotonique. Un autre tube a été préparé dans les mêmes conditions où le NaCl a été remplacé par l'eau distillée afin d'induire une hémolyse maximale par osmose. Les taux d'hémolyse ont été calculé comme précédemment (Louerrad et al., 2016).

### II-5-4- Evaluation de l'activité anti-hémolytique des extraits

Le test de l'activité anti hémolytique a été réalisé selon le protocole suivant (Louerrad et al., 2016). Une suspension érythrocytaire à 10% a été préparée dans le PBS, 100 µl de cette dernière ont été ajoutés à 100 µl de chaque extrait déjà préparés dans le PBS à différente

concentration. Le mélange obtenu a été incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Un volume de 5 ml de NaCl (3.5 mg/ml) (préparés dans le PBS) a été ajouté. Le mélange obtenu a été incubé pendant 90 minutes dans un bain marin à 37°C. Ensuite, il a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. L'absorbance du surnageant a été lue à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Deux témoins négatif et positif contenant respectivement 5 ml de PBS et 5 ml d'eau distillé ont été réalisés dans les mêmes conditions,

- Le taux d'hémolyse induit par les différentes concentrations des deux extraits a été calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{[\text{Abs NaCl} - \text{Abs extrait}]}{\text{Abs NaCl}} \times 100$$

## II-6- Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (SD) pour des expériences réalisées en triplicata (n=3). Une étude statistique a été faite, à l'aide du logiciel GraphPadPrism 6, pour la mise en évidence des différences significatives par la méthode ANOVA One way, suivi par le test post-hoc de Tukey's. Les valeurs ont été considérées différentes quand  $p < 0,05$ .

# *Résultats et discussion*

### III-1- Résultats et interprétations

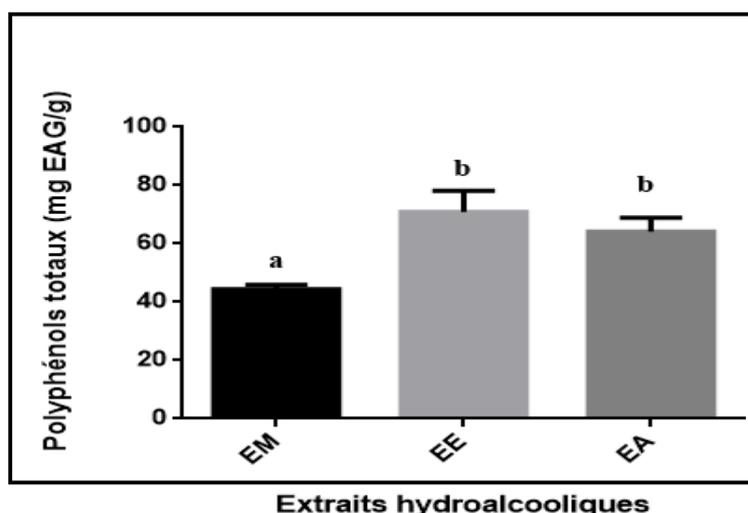
#### III-1-1- Taux d'extraction

Les taux d'extraction des feuilles d'*Urtica urens* en utilisant les trois solvants à 70%, méthanol, éthanol et acétone ont été calculés par rapport à la matière sèche initiale. Les résultats obtenus montrent des rendements d'extraction de l'ordre de 10.22% pour le méthanol 70% (EM), 10.52% pour l'éthanol 70% (EE) et 9.08% pour l'acétone 70% (EA).

#### III .1.2. Dosage des métabolites secondaires

##### III.1.2.1. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits hydro-alcooliques des feuilles d'*Urtica urens* est illustrée dans la (figure 4):



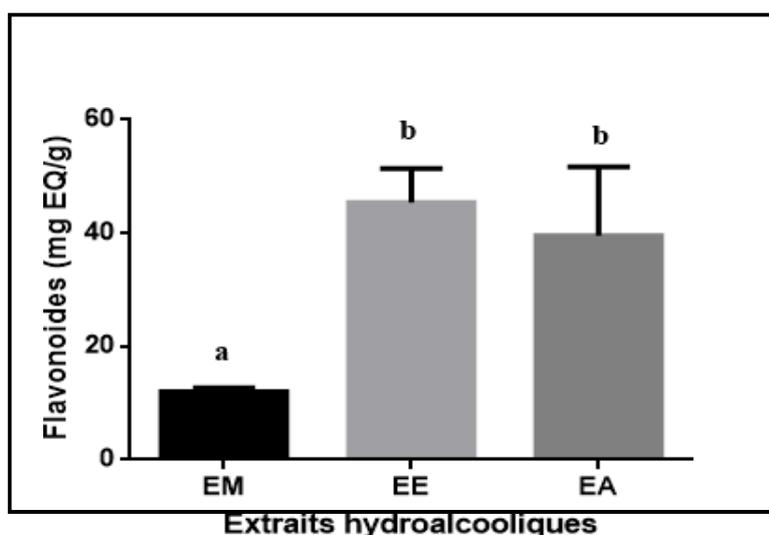
**Figure 4** : Teneurs en polyphénols totaux des extraits hydro-alcooliques des feuilles d'*Urtica urens* (EM : extrait méthanolique, EE : extrait éthanolique et EA ; extrait acétonique). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test ANOVA one way suivi du test de Tukey's a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ )

D'après les résultats, l'extrait éthanolique a enregistré la teneur la plus élevée avec un taux de  $70.99 \pm 7.10$  mg EAG/g d'extrait sec, suivi de l'extrait acétonique qui a donné une

teneur d'ordre  $64.21 \pm 4.69$  mg EAG/g d'extrait sec. Enfin, le taux le plus bas a été enregistré avec l'extrait méthanolique ( $44.47 \pm 1.40$  mg EAG/g d'extrait sec). Une différence significative des teneurs en polyphénols totaux a été observé entre l'extrait méthanolique et les extraits éthanolique et acétonique.

### III.1.2.2. Teneur en flavonoïdes

Les résultats du dosage des flavonoïdes totaux des différents extraits d'*Urtica urens* sont représentés dans la figure 5 :

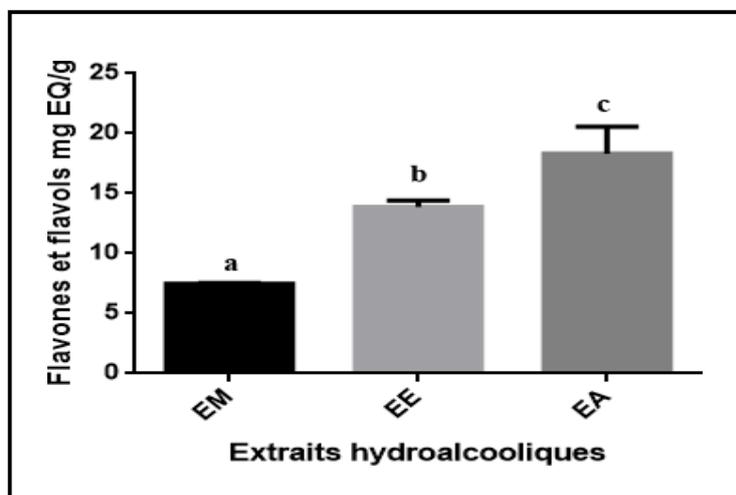


**Figure 5 :** Teneurs en flavonoïdes des extraits hydro-alcooliques des feuilles d'*Urtica urens* (EM : extrait méthanolique, EE : extrait éthanolique et EA ; extrait acétonique). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test ANOVA one way suivi du test de Tukey's a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

D'après ces résultats, on remarque qu'il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les teneurs en flavonoïdes des extraits hydro-alcooliques d'*Urtica urens*. La teneur la plus élevée a été enregistrée pour l'extrait éthanolique des feuilles qui est de  $45.41 \pm 6.005$  mg EQ/g d'extrait sec, ensuite celle de l'extrait acétonique de l'ordre de  $39.54 \pm 12.18$  mg EQ/g d'extrait sec, en dernier l'extrait méthanolique qui a enregistré la teneur la moins élevée avec  $12 \pm 0,69$  mg EQ/g d'extrait sec.

### III.1.2.3. Teneur en flavones et flavonols

La teneur en flavonols et en flavones des extraits hydro-alcooliques d'*Urtica urens* est déduite dans la figure 6 :



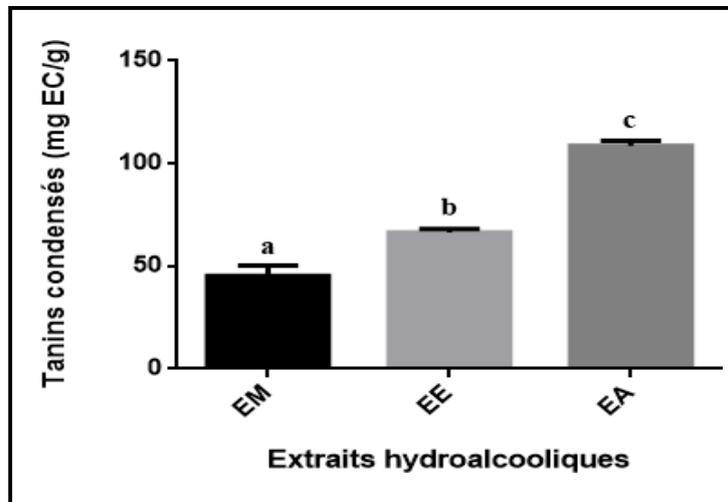
**Figure 6 :** Teneurs en flavones et flavonols des extraits hydro-alcooliques des feuilles d'*Urtica urens* (EM : extrait méthanolique, EE : extrait éthanolique et EA ; extrait acétonique). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test ANOVA one way suivi du test de Tukey's a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ )

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on constate que la teneur en flavonols et flavones dans l'extrait hydro-acétonique d'*Urtica urens* est considérable ( $18.33 \pm 2.25$  mg EQ/g d'extrait sec) par rapport à l'extrait éthanolique ( $13.89 \pm 0.53$  mg EQ/g d'extrait sec). D'autre part l'extrait méthanolique a enregistré une faible teneur par rapport aux autres extraits avec un taux de  $7.49 \pm 0.05$  mg EQ/g d'extrait sec. Les flavonols sont une classe importante de la famille des flavonoïdes, des molécules qui ont une activité biologique intéressante comme les effets antioxydants (piégeage des radicaux libres), antimicrobiens, anti-inflammatoires, et ils ont été considérés comme des agents anticancéreux potentiels (Company et al., 2013).

### III.1.2.4. Teneur en tanins condensés

Le dernier dosage qui a été effectué est celui des tanins condensés.

Les résultats obtenus indiquent une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les trois extraits, et sont illustrés dans la figure 7 :



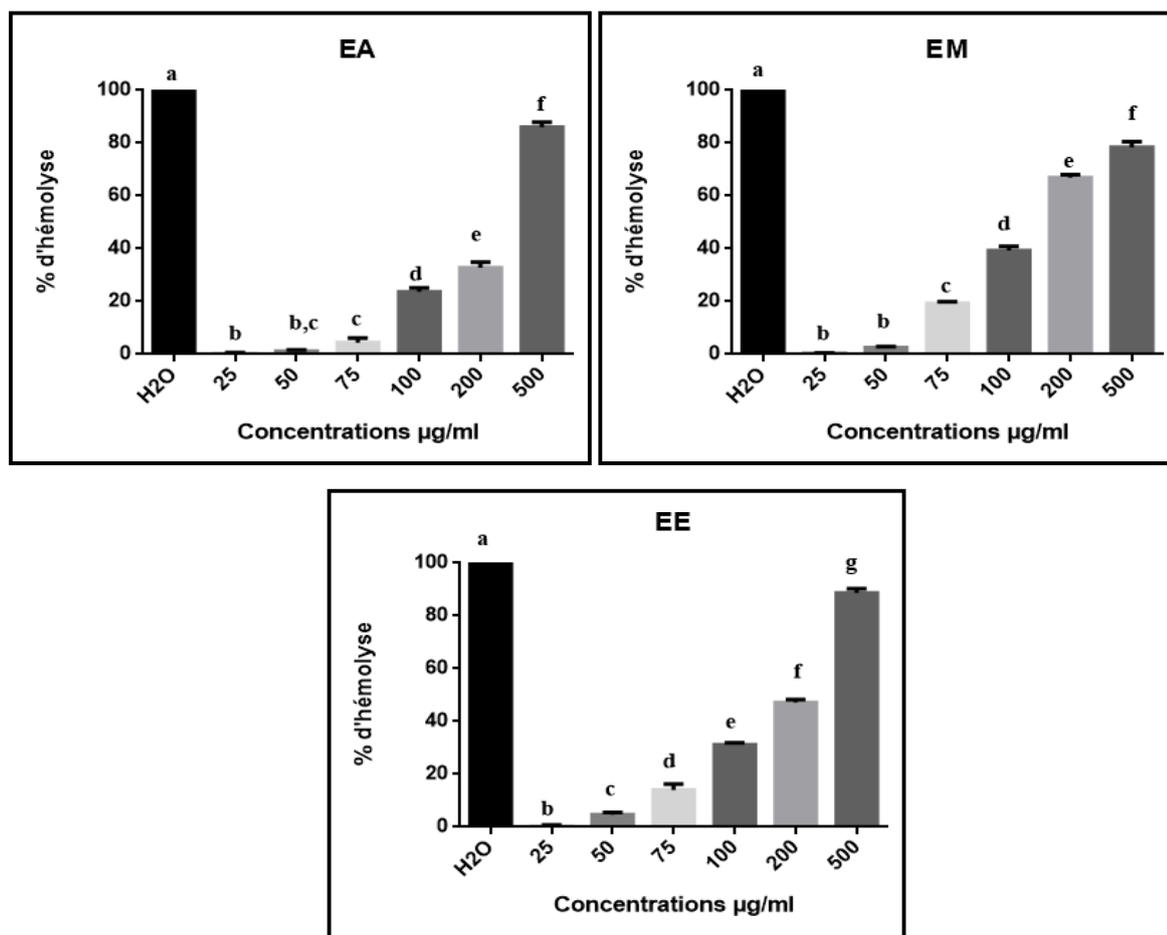
**Figure 7 :** Teneurs en tanins condensés des extraits hydro-alcooliques des feuilles d'*Urtica urens* (EM : extrait méthanolique, EE : extrait éthanolique et EA ; extrait acétonique). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type ( $n=3$ ). Le test ANOVA one way suivi du test de Tukey's a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

Les résultats montrent que les trois extraits hydro-alcooliques d'*Urtica urens* représentent une différence significative ( $P < 0,05$ ). Les teneurs en tannins condensés des deux extraits méthanolique ( $45.36 \pm 4.90$  mg EC/g d'extrait sec) et éthanolique ( $66.43 \pm 1.73$  mg EC/g d'extrait sec) sont relativement faibles par rapport à l'extrait acétonique ( $108.5 \pm 2.53$ ).

### III.1.3. Evaluation de l'activité anti-hémolytique

#### III.1.3.1. Evaluation de la cytotoxicité des extraits sur les érythrocytes

Pour évaluer l'effet des différents extraits d'*Urtica urens* sur les érythrocytes, plusieurs concentrations de ces derniers ont été testées pour induire à une éventuelle hémolyse. Les résultats sont représentés dans les histogrammes de la figure 8 :



**Figure 8 :** Effet hémolytique des extraits hydro-alcooliques des feuilles d'*Urtica urens* (EM : extrait méthanolique, EE : extrait éthanolique et EA ; extrait acétonique). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test ANOVA one way suivi du test de Tukey's a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

L'étude statistique a montré qu'il existe une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre le pourcentage d'hémolyse induit par les différents extraits (méthanolique, éthanolique et acétonique) d'*Urtica urens* comparé à l'hémolyse complète induite par H<sub>2</sub>O.

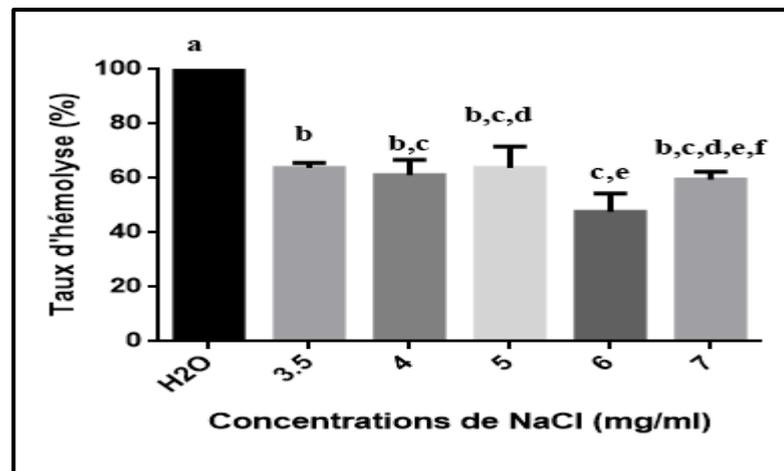
D'après les résultats, on remarque que le pourcentage de l'effet hémolytique de l'extrait méthanolique (EM) des feuilles d'*Urtica urens* à des concentrations 25 µg/ml ( $0,49 \pm 0,09$  %) et 50 µg/ml ( $2,57 \pm 0,30$ %) a enregistré une légère hémolyse comparé à l'hémolyse du témoin positif (H<sub>2</sub>O : hémolyse complète). On constate aussi que le pourcentage de l'hémolyse a augmenté en allant d'une concentration de 75 µg/ml ( $19,27 \pm 1,52$  %) jusqu'à 500 µg/ml, cette dernière a donné un pourcentage ( $78,48 \pm 2,09$  %) très élevé proche d'une hémolyse à 100% (H<sub>2</sub>O).

L'effet hémolytique de l'extrait éthanolique (EE) des feuilles d'*Urtica urens* à des concentrations allant de 25 µg/ml jusqu'à 50 µg/ml a enregistré des faibles pourcentages d'hémolyse ( $0,23 \pm 0,56$  % et  $4,74 \pm 0,77$  %, respectivement). Par contre, l'effet hémolytique a augmenté à des concentrations de 75µg/ml ( $14,07 \pm 2,21$ %) jusqu'au 200 µg/ml ( $47,10 \pm 0,77$ %). Enfin, une forte hémolyse ( $88,60 \pm 1,72$  %) a été enregistrée avec une concentration de 500 µg/ml.

D'autre part, une légère hémolyse a été enregistrée avec l'extrait acétonique (EA) à des concentrations de 25 µg/ml ( $0,23 \pm 0,45$  %) et 75µg/ml ( $4,48 \pm 1,67$ %). De la même façon que les extraits éthanolique et méthanolique, le pourcentage de l'hémolyse de l'extrait acétonique a augmenté considérablement à partir d'une concentration de 100µg/ml ( $23,61 \pm 1,52$  %) pour atteindre son maximum à 500µg/ml ( $86,01 \pm 1,97$  %).

### III.1.3.2. Evaluation de l'effet hémolytique induit par le NaCl sur les érythrocytes

Les résultats de l'hémolyse induite par le chlorure de sodium, agent oxydant qui possède la capacité de détruire la membrane suite à la peroxydation lipidique des acides gras insaturés présents dans la membrane érythrocytaire, sont représentés dans la figure 9 (Lourrard et al., 2016).

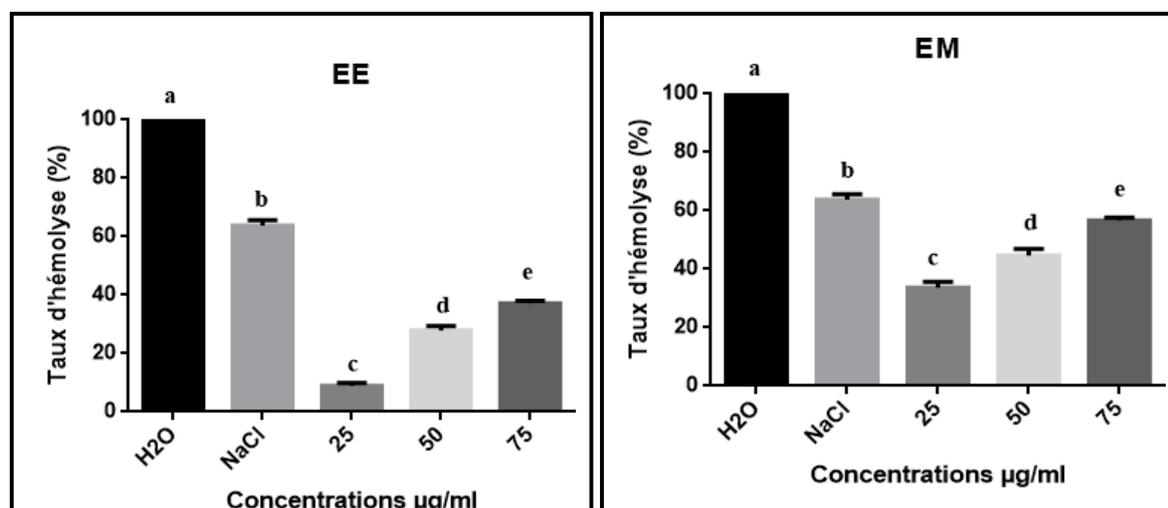


**Figure 9** : Variation du pourcentage d'hémolyse induit par le NaCl à différentes concentrations. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test ANOVA one way suivi du test de Tukey's a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

D'après les résultats obtenus (Figure 9), les différentes concentrations de NaCl testées ont induit un taux d'hémolyse considérable qui varie entre  $47.73 \pm 6.62$  % pour la concentration de 6  $\mu\text{g/ml}$  jusqu'à  $63.76 \pm 1.92$  % pour la concentration de 3.5 mg/ml.

### III.1.3.4. Evaluation des effets anti hémolytiques des extraits sur les érythrocytes

L'activité anti-hémolytique a été testée sur deux extraits méthanolique et éthanolique d'*Urtica urens* pour évaluer leur capacité à protéger les érythrocytes humains de la lyse cellulaire induite par le chlorure de sodium (3.5 mg/ml). Les résultats des taux d'hémolyse induite par le chlorure de sodium en présence des extraits sont rapportés dans la figure 10 :



**Figure 10 :** Effet anti-hémolytiques des extraits hydro-alcooliques des feuilles d'*Urtica urens* (EM : extrait méthanolique et EE : extrait éthanolique) à différentes concentrations contre l'hémolyse induite par le NaCl. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (n=3). Le test ANOVA one way suivi du test de Tukey's a été utilisé pour examiner la signification statistique des données. Les valeurs ne partageant pas une lettre commune sont statistiquement différentes ( $P < 0,05$ ).

D'après les résultats, on constate que les extraits sont beaucoup plus puissants aux concentrations de 25 et 50  $\mu\text{g/ml}$ , et c'est l'extrait éthanolique qui est le plus efficace. En effet, en présence de 25 et 50  $\mu\text{g/ml}$  de l'extrait éthanolique, les taux d'hémolyse des GR par le NaCl étaient respectivement de l'ordre de  $8.86 \pm 1.14\%$  et  $27.99 \pm 1.42\%$ . Par contre, aux mêmes concentrations de l'extrait méthanolique, les taux d'hémolyse sont respectivement de l'ordre de  $33.60 \pm 2.12\%$  et  $44.65 \pm 2.28\%$ . En présence d'une concentration de 75  $\mu\text{g/ml}$

des différents extraits d'*Urtica urens* (éthanolique et méthanolique) le taux d'hémolyse des hématies par NaCl était respectivement de l'ordre  $37,22 \pm 0,78$  % et de  $56,73 \pm 0,92$  %.

Les pourcentages d'inhibition augmentent de manière inversement proportionnel par rapport à la concentration (tableau IX). A une faible concentration de 25 µg/ml, l'extrait éthanolique a donné le plus grand pourcentage d'inhibition de l'hémolyse (86,1%) comparé à l'extrait méthanolique (47,30%).

**Tableau IX** : Taux d'inhibition de l'hémolyse induite par le NaCl après traitement des érythrocytes par différentes concentrations des extraits éthanolique et méthanolique d'*Urtica urens*.

Concentration d'extrait (µg/ml)	% d'inhibition de l'hémolyse par l'extrait éthanolique	% d'inhibition de l'hémolyse par l'extrait méthanolique
25	86.1	47.30
50	56.09	29.97
75	41.62	11.02

## Discussion

Les plantes possèdent des propriétés biologiques qui sont généralement attribuées à leurs teneurs en composés phénoliques, la détermination de ces derniers apparait comme un indicateur de leurs activités biologiques (Santos-Sanchez et al., 2014 ; Pavun et al., 2018). L'extraction est la principale étape de la récupération et de l'isolation des composés phytochimiques à partir de la matière végétale et son efficacité dépend de leurs nature chimique, la méthode d'extraction utilisée, la taille des particules dans l'échantillon, la présence de substances interférentes ainsi que les solvants utilisés (Do et al., 2014). Les solvants les plus appropriés sont les mélanges aqueux contenant de l'éthanol, l'acétone et méthanol (Dai et Mumper, 2010).

Dans la présente étude, trois extractions par macération des feuilles d'*Urtica urens* ont été réalisées. Différents rendements des extraits hydro-alcooliques ont été obtenus, le taux d'extraction éthanolique a été plus élevé par rapport aux deux autres extractions

méthanolique et acétonique. Cette différence pourrait être expliquée par la nature des composés actifs qui peuvent se solubiliser dans chaque mélange, car la granulométrie de la poudre végétale ainsi que les conditions d'extractions étaient les mêmes (**Bonnaillie et al., 2012**). De même, il a été prouvé que l'éthanol est le meilleur solvant pour sa capacité à extraire le maximum de composés phénoliques polaires mais aussi apolaires, il est aussi préféré en raison de son souci de respect de l'environnement car il est moins toxique (**Cowan, 1999 ; Bonnaillie et al., 2012**), contrairement au méthanol qui est un solvant toxique et permet l'extraction des composés phénoliques généralement polaires (**Benmeziane et al., 2014**).

Les résultats du dosage montrent que la teneur en polyphénols totaux est plus élevée dans l'extrait éthanolique, suivi par l'extrait acétonique puis en dernier l'extrait méthanolique. Les travaux conduits par **Mulinacci et al. (2004)** et **Katalinic et al. (2010)** confirment nos résultats en indiquant que l'éthanol en combinaison avec l'eau permet une meilleure extraction des polyphénols totaux. L'addition de l'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénols par modulation de la polarité du solvant organique. Cette augmentation est peut être due à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses, ainsi qu'à l'augmentation de la basicité et de l'ionisation des polyphénols dans de telles solutions (**Sripad et al., 1982**). La solubilité des polyphénols dépend principalement du nombre de groupements hydroxyles, de poids moléculaire et de la longueur de la chaîne carbonique de squelette de base (**Mohammedi et Atik, 2011**). Par conséquent, pour obtenir des fractions riches en polyphénols, il est préférable d'employer des mélanges du solvant organique approprié avec de l'eau. L'éthanol et l'eau sont préférables car ils ont l'avantage d'être non polluants, moins chers et non toxiques par rapport à d'autres solvants comme le méthanol (**Jokić et al., 2010**).

Les flavonoïdes ont une large répartition dans le monde végétal et sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures (**Benchaachoua et al., 2018**). Ils possèdent une structure particulière comme la position des groupements hydroxyles et carbonyles ainsi que la double liaison donnant ainsi des dérivés flavones et flavonols (**Jamiuddin et al., 2019**). D'une manière générale et indépendamment des solvants, La fraction flavonoïdique est inférieure par rapport à la teneur en polyphénols totaux. L'analyse statistique des résultats des teneurs en flavonoïdes obtenues montre que la concentration la plus élevée est obtenue aussi avec l'extrait éthanolique des feuilles d'*Urtica urens* avec une valeur de 45,41 (écart type) mg EQ/g. Par contre, les flavones et flavonols sont majoritairement plus élevées dans l'extrait

acétonique des feuilles de la petite ortie. L'extrait méthanolique était le moins riche en flavonoïdes et en flavones et flavonols. En effet, quel que soit le mode d'extraction, l'éthanol et l'acétone restent les meilleurs extracteurs des flavonoïdes comme il a été annoncé par **Mahmoudi et al., (2013)**.

L'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, du solvant utilisé, des conditions opératoires (**Chavan et al., 2001**). L'acétone a enregistré la teneur la plus élevée en tanins condensés, suivie par l'éthanol, cela peut être expliqué par la richesse de ces derniers en groupements hydroxyles OH (**Bravo, 1998**). En revanche, l'extrait méthanolique a enregistré un taux faible en tanins. En effet, **Collin et Crouzet (2011)** ont montré que l'acétone, et l'éthanol sont les solvants les plus recommandés pour récupérer sélectivement les acides tanniques de haut poids moléculaire tel que les pro-anthocyanidines, grâce à leur capacité de solubiliser ceux qui ne sont pas solubles dans le méthanol (**Kennedy, 2002**).

Le globule rouge, reste un modèle d'étude cellulaire intéressant car sa structure est simple et sa fonction de transport de l'oxygène et d'hémoglobine l'expose particulièrement aux attaques radicalaires (**Antonelou et al., 2010**). Il est ainsi vulnérable à l'oxydation à cause de son contenu riche en acides gras polyinsaturés (**Rocha et al., 2009**). Ce dernier est aussi choisi comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire pour l'étude de la cytotoxicité in vitro à cause de leur facilité d'isolement et leurs simplicité (**Wajeman et al., 1992**).

La membrane cellulaire constitue généralement une première ligne de protection de la cellule. Ce principe souligne les divers intérêts et méthodes pour évaluer les caractéristiques intrinsèques de la membrane: sa stabilité, fluidité, déformabilité et d'autres propriétés viscoélastiques. La fragilité osmotique des globules rouges, par exemple, dépend des changements structuraux spécifiques que leur membrane subit lorsque la cellule est soumise à un stress osmotique (**Mounnissamy et al., 2008**).

L'activité hémolytique induite par le chlorure de sodium a été observée à partir d'une concentration de 3.5 mg/ml, suite à un stress oxydatif ce qui est en accord avec les résultats rapportés par **Louerrad et ses collaborateurs (2016)**. L'effet hémolytique d'une solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule (**Habibur Rahman et al., 2015; Labu et al., 2015**). Les propriétés hémolytiques d'un agent hypotonique sont attribuées à son interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire ce qui induit à une augmentation de la perméabilité et la perte membranaire des globules rouges avec un mouvement des ions : entrée de  $\text{Na}^+$  et  $\text{H}_2\text{O}$ , sortie de  $\text{K}^+$ , la membrane éclate,

provoquant ainsi la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant (**Majester-Savornin, 1991**).

Il est admis que les activités biologiques sont dépendantes de la dose, ceci est de même pour la bio activité et la toxicité d'une substance. Dans cette étude les doses utilisées pour les activités anti-hémolytiques ont été déterminées après une étude de toxicité des extraits étudiés. L'intérêt de la plante exige qu'une approche de sa toxicité soit étudiée, ce qui nous a menés à évaluer l'effet hémolytique des extraits de la petite ortie sur les globules rouges humains.

D'après nos résultats, nous constatons que les 03 extraits (éthanolique, acétonique et méthanolique) présentent un effet toxique très faible aux concentrations de 25 et 50 µg/ml. Par contre, au delà de 75 µg/ml, les trois extraits deviennent toxiques vis-à-vis des globules rouges humains et provoquent de forte hémolyse qui dépassent les 80% aux concentrations de 500 µg/ml. Ceci est en concordance avec la notion que toute substance biologiquement active est susceptible de produire des effets indésirables, voire nocifs à de fortes doses.

Concernant l'étude de l'activité antihémolytique des extraits des feuilles d'*Urtica urens* à des concentrations allant de 25 µg/ml jusqu'à 75µg/ml révèle que le traitement des érythrocytes avec les extraits éthanolique et méthanolique des feuilles d'*Urtica urens* a augmenté leur résistance à l'effet néfaste du NaCl d'une manière inversement proportionnel à la dose. L'inhibition hémolytique a été observée en ajoutant les extraits d'ortie brûlante.

La présence d'une corrélation inverse entre l'hémolyse et les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes, cela est dû au rôle actif des polyphénols totaux surtout des flavonoïdes qui possèdent l'effet anti hémolytique et protège les hématies contre l'oxydation. (**Valente et al., 2011 ; Cherrak, 2017**). il a été rapporté que les substances de la famille des flavonoïdes sont responsables de l'activité antihémolytique et plus exactement la classe des flavonols qui réagiraient avec les radicaux pyroxyles propageant la chaîne pour arrêter la peroxydation, inhibant ainsi l'hémolyse et ceci est probablement due à leur structure phénolique, en particulier au phénomène de résonance électronique stabilisant exercé par les noyaux aromatiques (**Dai et al., 2006**).

# *Conclusion*

## **Conclusion**

Le travail que nous avons mené s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'une plante médicinale qui est *Urtica urens*. De ce fait, nous avons mis en évidence sa composition phytochimique en utilisant des différents solvants (éthanol, méthanol et acétone), ainsi que ses propriétés antihémolytiques par un modèle expérimental de globule rouge.

Les résultats obtenus suite aux dosages quantitatifs des métabolites secondaires nous ont permis de mettre en évidence la richesse d'extrait éthanolique des feuilles d'*Urtica urens* en polyphénols totaux, tanins condensés ainsi qu'en flavonoïdes par comparaison aux extraits méthanolique et acétonique, ce qui a révélé que le choix du solvant utilisé varie les teneurs.

L'étude de la cytotoxicité des extraits d'*Urtica urens* sur les érythrocytes humains a montré qu'ils sont toxiques à des doses supérieures à 75 µg/ml, avec des taux d'hémolyses qui dépassent les 80% lorsque les concentrations testées étaient de 500 µg/ml.

Le modèle hémolytique utilisé dans cette étude, à savoir le chlorure de sodium s'est montré très efficace, suite à sa capacité de provoquer des dommages au niveau de la membrane plasmique des globules rouges et induire à un taux d'hémolyse de 63%.

Pour l'étude de l'activité anti-hémolytique, les extraits éthanolique et méthanolique exercent un effet antihémolytique très important (86,1% et 47,30%, respectivement) à une très faible dose de 25 µg/ml. Cet effet antihémolytique diminue au fur et à mesure que la concentration des deux extraits augmente.

Ces résultats restent initiaux et partiels, et d'autres travaux s'imposent tant au niveau chimique que pharmacologique. Il serait donc judicieux à l'avenir d'approfondir l'étude phytochimique sur cette plante en essayant d'identifier et de purifier ses composés phénoliques et de tester leurs effets sur l'hémolyse et la peroxydation lipidique des globules rouges.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

- **Affi, F. U., & Abu-Irmaileh, B. (2000).** Herbal medicine in Jordan with special emphasis on less commonly used medicinal herbs. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 101-110.
- **Agarwal, K. N., Agarwal, D. K., & Mishra, K. P. (1991).** Impact of anaemia prophylaxis in pregnancy on maternal haemoglobin, serum ferritin & birth weight. *The Indian journal of medical research*, 94, 277-280.
- **Aguilar-Martinez, P. (2007).** H2-Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2-Faculté de Médecine Montpellier Nimes. <https://www.yumpu.com/fr/document/view/16839227/erythrocytes-facultede-medecin-de-montpellier/2>
- **Ali, D., Sacchetto, É., Dumontet, E., Le Carrer, D., Orsonneau, J. L., Delaroche, O., & Bigot-Corbel, E. (2014).** Interférence de l'hémolyse sur le dosage de vingt-deux paramètres biochimiques. In *Annales de biologie clinique*, 72(3), 297-311.
- **Antonelou, M. H., Kriebardis, A. G., & Papassideri, I. S. (2010).** Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice. *Blood Transfusion*, 8(Suppl 3), s39.
- **Apg, I. I. I. (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc*, 161, 105-121.
- **Ardailou, R. (2004).** Stress oxydatif et prédiction des accidents cardiovasculaires. *médecine/sciences*, 20(3), 264-264.
- **Atik, F. A. W. Z. I. A., & Mohammedi, Z. O. H. R. A. (2011).** Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) Karst. *Int J Pharma Bio Sci*, 2(1), 609-15.
- **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., ... & Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-forschung*, 46(11), 1086-1089.
- **Belbache, H. (2003).** Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora* Desf, mémoire de magister en chimie organique, université Mentouri Constantine. *Université Mentouri Costantine*.
- **Benchaachoua, A., Bessam, H. M., Saidi, I., & Bel-abbes, S. (2018).** Effects of different extraction methods and solvents on the phenolic composition and antioxidant activity of *Silybum marianum* leaves extracts. *Int. J. Med. Sci. Clin. Invent*, 5(3), 3641-3647.

- **Berreguioua, A. (2016).** *Investigation phytochimique des extraits bioactifs de deux Brassicaceae médicinales du sud Algérien: Moricandia arvensis et Zilla macroptera* (Doctoral dissertation, Université de Tlemcen-Abou Bekr Belkaid).
- **Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005).** Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 185-191.
- **Bertrand, B. (2010).** " Les secrets de l'ortie ". *De Terran*, (1), 181.
- **Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., & Saykova, I. (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, 7, 35-45.
- **Bonnefont-Rousselot, D., Peynet, J., Beaudeau, J. L., Théron, P., Legrand, A., & Delattre, J. (2002).** Stress oxydant, fonctions vasculaires et athérosclérose. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 260-267.
- **Boubekri, C. (2014).** *Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de Solanum melongena par des techniques électrochimiques* (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider Biskra).
- **Bravo, L. (1998).** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. *Lavoisier, Paris, 1120*.
- **Bussmann, R. W., Zambrana, N. Y. P., Huanca, L. A. M., & Hart, R. (2016).** Changing markets—medicinal plants in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology*, 193, 76-95.
- **Chavan, U. D., Shahidi, F., & Naczk, M. (2001).** Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food chemistry*, 75(4), 509-512.
- **Collin, S., & Crouzet, J. (2011).** *Polyphénols et procédés: transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Lavoisier.
- **Company, A., Lloret-Fillol, J., & Costas, M. (2013).** Small molecule models for nonporphyrinic iron and manganese oxygenases.
- **Cordell A.G, Quinn-Bettie L.M, Farnsworth N.R (2001).** The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother.R.* (15), p: 183-205.

- **Courtois, G., Vandekerckhove, J., Dussiot, M., Kersual, J., Coulon, S., Belaid, Z., ... & Hermine, O. (2007).** L'érythropoïèse tardive: une mort avortée?. *Hématologie*, 13(6), 400-408.
- **Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- **Dai, Fang et al. (2006).** Protective Effects of Flavonols and Their Glycosides against Free Radical-Induced Oxidative Hemolysis of Red Blood Cells. *Life Sciences*, 78(21), 2488-93.
- **Dai, J., & Mumper, R. J. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- **Defraigne, J. O., & Pincemail, J. (2008).** Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, 63.
- **Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*, 22(3), 296-302.
- **Durand, D., Damon, M and Gobert, M. (2013).** Le stress oxydant chez les animaux de rente: Principes généraux. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 48 : 218-224.
- **Esposito, E., Rotilio, D., Di Matteo, V., Di Giulio, C., Cacchio, M., & Algeri, S. (2002).** A review of specific dietary antioxidants and the effects on biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of aging*, 23(5), 719-735.
- **Favier, A. (2006).** Stress oxydant et pathologies humaines. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 64, No. 6, pp. 390-396). Elsevier Masson.
- **Feng, X., Ju, P., Chen, Y., Li, X., & Wang, M. (2022).** Analgesic alkaloids from *Urticae Fissae Herba*. *Chinese Herbal Medicines*, 14(1), 125-129.
- **Ferrazzano, G. F., Amato, I., Ingenito, A., Zarrelli, A., Pinto, G., & Pollio, A. (2011).** Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*, 16(2), 1486-1507.
- **Fibach, E., & Rachmilewitz, E. (2008).** The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current molecular medicine*, 8(7), 609-619.
- **Flourie, F., Arab, K., Rossary, A., & Steghens, J. P. (2006).** Effets de différents antioxydants sur la lipoperoxydation in vitro initiée par le radical<sup>o</sup> OH. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 21(4), 229-233.

- **Fontaine, E., Barnoud, D., Schwebel, C., & Leverve, X. (2002).** Place des anti-oxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11(6), 411-420.
- **Gammoudi, I., Dandana, A., Chahed, H., Ferchichi, S., Ernez, S., & Miled, A. (2013).** Évaluation des paramètres du stress oxydant chez des patients coronariens. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 28(1), 39-42.
- **Gardès-Albert, M. (2006).** Aspects physico-chimiques des espèces réactives de l'oxygène. In *Annales pharmaceutiques françaises*, 64(6), 365-372.
- **Gershenson, J. Croteau, r. (1991).** Terpenoids. Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites (rosenthal. GA & berenbaum, Mr eds), 1:165-219.
- **Ghazi F., & Sahraoui S. (2005).** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de datte communes Tantboucht et Hamraia, Mémoire d'ingénieur en agronomie, ElHarrach. *Food Chem.* 51(17): 4903-4908.
- **Ghedira, K., Goetz, P., & Le Jeune, R. (2009).** *Urtica dioica* L., *Urtica urens* et/ou hybrides (Urticaceae). *Phytothérapie*, 7(5), 279-285.
- **Gutteridge, J. M. (1983).** Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron-and copper-dependent oxygen radical formation. *FEBS letters*, 157(1), 37-40.
- **Habibur Rahman, M., Eswaraiah, C. et Dutta, A.M. (2015).** In - vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa*. Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam), *American-Eurasian J. Agric. & Environ*, 15 (1): 115-121.
- **Haddouchi, F., Chaouche, T. M., & Halla, N. (2016).** Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 1-9.
- **Hartmann, M. (2007).** *Eliten und Macht in Europa: ein internationaler Vergleich*. Campus Verlag.
- **Hennebelle, T. (2006).** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Mémoire de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille*.
- **Ji, T.F., Liu, C.H., et Wang. (2007).** Studies on the chemical constituents of *Urtica dioica* L. grown in Tibet autonomous region. *Zhong Yao Cai*, 30(6), 662-664.
- **Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bučić-koJić, A., PIANiNić, M., & ToMAS, S. (2010).** Modelling of solid-liquid extraction process of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(3), 206-212.

- **Julkunen-Tiitto, R. (1985).** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, 33(2), 213-217.
- **Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramović, H., Miloš, M., ... & Boban, M. (2010).** Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food chemistry*, 119(2), 715-723.
- **Kavalali, G., Tuncel, H., Göksel, S., & Hatemi, H. H. (2003).** Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2-3), 241-245.
- **Kennedy, J. A. (2002).** Proanthocyanidins: Extraction, purification, and determination of subunit composition by HPLC. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6(1), 11-4.
- **Kesselmeier, J., and Staudt, M., (1999).** Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry* 33:23-88.
- **Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H. W and Kong, S. S. (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanism. *Journal of Pharmacology . Science*, 96, 229-254.
- **Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepeljnjak, S., & Vladimir-Knezevic, S. A. N. D. A. (2004).** Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta pharmaceutica*, 54(1), 65-72.
- **Kozlova, E. K., Chernysh, A. M., Moroz, V. V., & Kuzovlev, A. N. (2013).** Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*, 44, 218-227.
- **Ksouri, R., Ksouri, W. M., Jallali, I., Debez, A., Magné, C., Hiroko, I., & Abdelly, C. (2012).** Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications. *Critical reviews in biotechnology*, 32(4), 289-326.
- **Lefief-Delcourt, Alix., Leduc. S. (2012).** "L'ortie c'est malin: santé, beauté,jardin, maison...toutes les vertus et les conseils pratiques de cette plante magique",160.
- **Louerrad, Y., Haddi, R., & Kaid, H. M. (2016).** Etude de la peroxydation lipidique chez une plante médicinale *Haloxylon scoparium* Pomel. *J. Biores. Val*, 1, 28-33.
- **Loustau, V., Guillaud, C., Garcon, L., Godeau, B., & Michel, M. (2011).** Anémie hémolytique chez l'adulte: principales causes et démarche diagnostique. *La Presse Médicale*, 40(5), 470-485.
- **Low, F. M., Hampton, M. B., & Winterbourn, C. C. (2008).** Peroxiredoxin 2 and peroxide

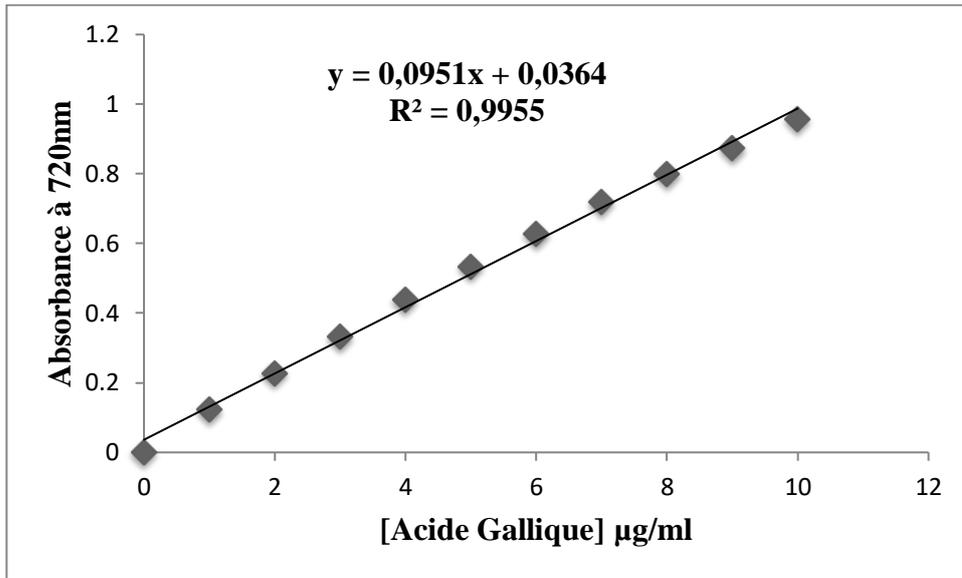
- metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants & redox signaling*, 10(9), 1621-1630.
- **Mohandas, N., & Gallagher, P. G. (2008)**. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 112(10), 3939-3948.
  - **Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013)**. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, (9), 35.
  - **Majester-Savornin, B., Elias, R., Diaz-Lanza, A. M., Balansard, G., Gasquet, M., & Delmas, F. (1991)**. Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity. *Planta medica*, 57(03), 260-262.
  - **Maksimović, Z., Malenčić, Đ., & Kovačević, N. (2005)**. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource technology*, 96(8), 873-877.
  - **Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005)**. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 230-242.
  - **Morel Jean-Michel (2017)**. Traité pratique de phytothérapie. *Éditions Grancher*, 623p.
  - **Morelle-Lauzanne, E. (2006)**. L'alimentation, le stress oxydatif: Sources de lipoperoxydation, comment s'en protéger. *Phytothérapie*, 4(5), 234-240.
  - **Mounnissamy, V. M., Kavimani, S., Balu, V., & Quine, S. D. (2007)**. Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of ethanol extract of *Cassia sophera* L. (Fabaceae). *IJPT*, 6(2), 235-237.
  - **Mulinacci, N., Prucher, D., Peruzzi, M., Romani, A., Pinelli, P., Giaccherini, C., & Vincieri, F. F. (2004)**. Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(2), 349-357.
  - **Nkhili, E. Z. (2009)**. Polyphénols de l'alimentation: extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Avignon.
  - **Newman, M. E. (2012)**. Communities, modules and large-scale structure in networks. *Nature physics*, 8(1), 25-31
  - **Pincemail, J., Le Goff, C., Charlier, C., Gillion, P., Cheramy-Bien, J. P., Van Honacker, E., ... & Defraigne, J. O. (2009)**. Evaluation biologique du stress oxydant: application en routine clinique. *Nutr. Endocrinol*, 16-31.

- **Price, M. L., Van Scoyoc, S., & Butler, L. G. (1978).** A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 26(5), 1214-1218.
- **Proestos, C., Boziaris, I.S., Nycha, G.J.E. and Kamaitis M. (2006).** Analysis of flavonoids and phenolic acids in greek aromatic plants: investigation of their antioxydant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95 (4), 664-671.
- **Rees, J.-F., Zal, F., Thomé, J.-P. (2004).** Enfer et Paradis: la toxicité de l'oxygène chez les organismes abyssaux. *Océanis*, 30(3):277-291.
- **Rocha, S., Costa, E., Coimbra, S., Nascimento, H., Catarino, C., Rocha-Pereira, P., ... & Santos-Silva, A. (2009).** Linkage of cytosolic peroxiredoxin 2 to erythrocyte membrane imposed by hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 43(1), 68-73.
- **Rother, R. P., Bell, L., Hillmen, P., & Gladwin, M. T. (2005).** Consequences cliniques de l'hémolyse intravasculaire et de la présence d'hémoglobine extracellulaire dans le plasma: Un nouveau mécanisme en pathologie humaine. *JAMA-français*, 293(4), 237.
- **Sahli, R. (2017).** *Etude phytochimique de quelques plantes extrêmophiles tunisiennes et exploration de leurs activités biologiques* (Doctoral dissertation, Université du Droit et de la Santé-Lille II; Université de Carthage (Tunisie)).
- **Santos-Sánchez, N. F., Flores-Parra, A., Valadez-Blanco, R., Fernández-Rojas, B., Martínez-Vásquez, J. B., & Salas-Coronado, R. (2014).** Polyphenolic content, free radical-scavenging activity and isolation of tiliroside from *Heliocarpus terebinthinaceus* (Tiliaceae) seeds. *Journal of Biological Sciences*, 14(5), 376-380.
- **Sripad, G., Prakash, V., & Rao, M. S. (1982).** Extractability of polyphenols of sunflower seed in various solvents. *Journal of Biosciences*, 4(2), 145-152.
- **Sultan, C., Gouault-Heilmann, M., & Imbert, M. (1987).** *Aide-mémoire d'hématologie*. Flammarion médecine-sciences.
- **Tabart, J. (2011).** Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire.
- **Thériault, M. (2004).** *Étude des propriétés antioxydantes et antimutagènes de composés phénoliques issus de l'érable* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).

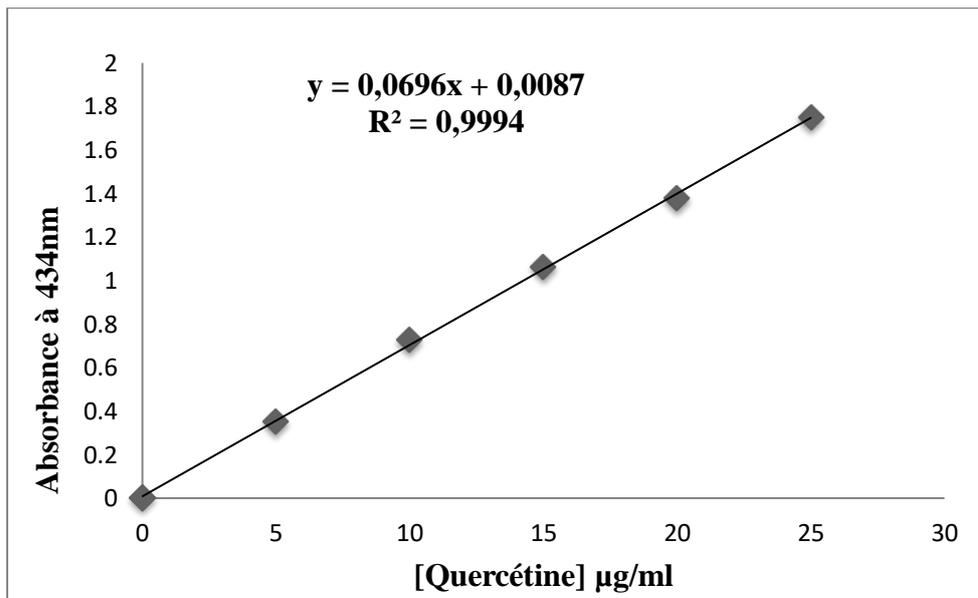
- **Valensi, F. (2005).** Morphologie des cellules sanguines normales. *EMC-Hématologie*, 2(1), 1-13.
- **Valente, M. J., Baltazar, A. F., Henrique, R., Estevinho, L., & Carvalho, M. (2011).** Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 86-92.
- **Valnet, J. (1983).** *Phytothérapie: se soigner par les plantes*. Librairie générale française.
- **Wajeman h., Lantz B., Girot R. (1992).** - les maladies du globule rouge.- 2e edition ; Paris : Inserm.
- **Watanabe, H., Kobayashi, A., Yamamoto, T., Suzuki, S., Hayashi, H., & Yamazaki, N. (1990).** Alterations of human erythrocyte membrane fluidity by oxygen-derived free radicals and calcium. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(6), 507-514.
- **Wichtl, M., & Anton, R. (2003).** Plantes thérapeutiques, tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2 e éd. EMInter /Tec & Doc éditions, Paris, 382-386.
- **Wink, M. (1998).** A Short History of Alkaloids, In: Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications, M.F. Roberts & M. Wink, pp. 11-44, Plenum Press, ISBN 0-306-45465-3, New York
- **Yener, Z., Celik, I., Ilhan, F., & Bal, R. (2009).** Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), 418-424.
- **Zinebi, A., Eddou, H., Moudden, K. M., & Elbaaj, M. (2017).** Profil étiologique des anémies dans un service de médecine interne. *Pan African Medical Journal*, 26(1), 1-8.

# *Annexes*

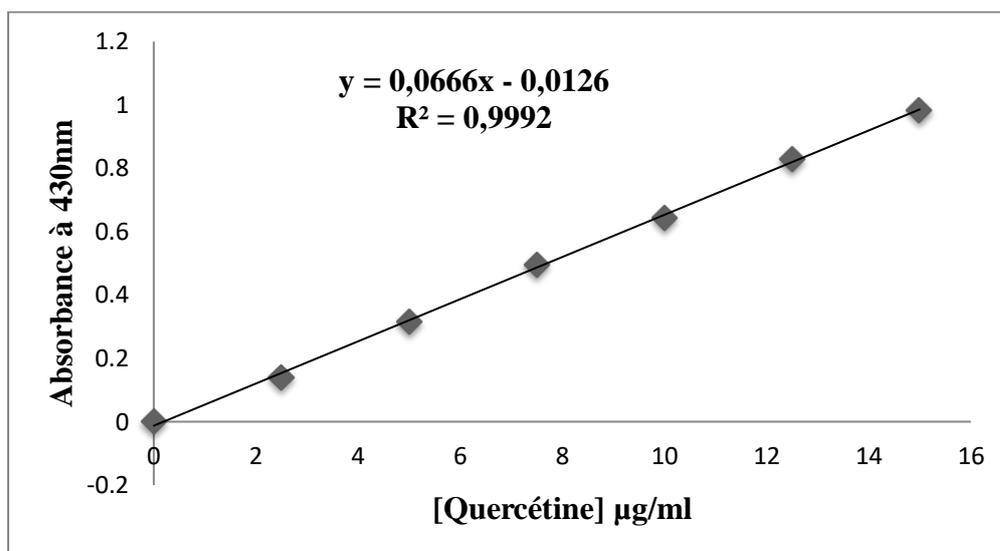
**Annexe I : Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux**



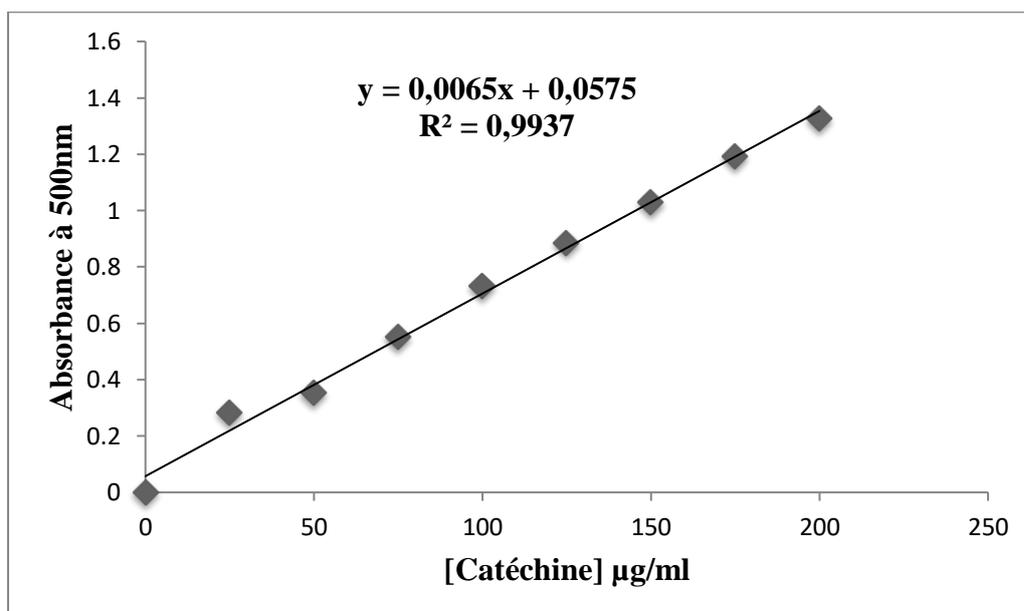
**Annexe II : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes**



**Annexe III : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavones et flavonols**



**Annexe IV : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins condensés**



## Résumé

L'ortie (*Urtica urens*) est une plante médicinale de la famille des urticacées, très répandue dans le bassin méditerranéen et largement connue en médecine traditionnelle comme antioxydant et antihémolytique. L'objectif de ce travail est d'évaluer in vitro l'effet anti-hémolytique des feuilles d'*Urtica urens*, contre l'hémolyse induite par le NaCl sur les érythrocytes humains. L'étude du contenu des extraits: méthanolique, éthanolique et acétonique en composés phénoliques ont été estimés par des dosages colorimétriques. Les résultats ont prouvés la richesse de ces derniers en polyphénols, flavonoïdes ainsi qu'en flavonols et flavonones. Une teneur plus élevée en tanins condensés a été enregistrée par l'extrait acétonique. La cytotoxicité de ces extraits a également été évaluée. L'ensemble des extraits ont exhibés un effet toxique qui dépasse les 80% à une forte concentration (500µg/ml), par contre, à des concentrations allant de 25µg/ml à 75µg/ml les extraits ont exercés un effet protecteur. Pour le test de l'activité anti-hémolytique, l'extrait éthanolique a donné le plus grand pourcentage d'inhibition de l'hémolyse (86,1%) comparé à l'extrait méthanolique (47,30%) à une faible concentration de 25µg/ml. Les résultats obtenus prouvent le potentiel bénéfique des feuilles d'*Urtica urens* dans la prévention des pathologies hémolytiques.

**Mots clés :** *Urtica urens*, érythrocytes, l'activité antihémolytique, NaCl.

## Abstract

Nettle (*Urtica urens*) is a medicinal plant of the Urticaceae family, widespread in the Mediterranean basin and widely known in traditional medicine as an antioxidant and antihemolytic. The objective of this work is to evaluate in vitro the anti-hemolytic effect of *Urtica urens* leaves, against NaCl-induced hemolysis on human erythrocytes. The study of the content of the extracts: methanolic, ethanolic and acetonic in phenolic compounds were estimated by colorimetric assays. The results proved the richness of the latter in polyphenols, flavonoids as well as flavonols and flavonones. A higher content of condensed tannins was recorded by the acetone extract. The cytotoxicity of these extracts was also evaluated. All the extracts showed a toxic effect exceeding 80% at a high concentration (500µg/ml), on the other hand, at concentrations ranging from 25µg/ml to 75µg/ml the extracts exerted a protective effect. For the anti-hemolytic activity test, the ethanolic extract gave the highest percentage of inhibition of hemolysis (86.1%) compared to the methanolic extract (47.30%) at a low concentration of 25µg/ml. The results obtained prove the beneficial potential of *Urtica urens* leaves in the prevention of hemolytic pathologies.

**Key words :** *Urtica urens*, erythrocyte, antihemolytic activity, NaCl.

## الملخص

نبات القراص (*Urtica urens*) هو نبات طبي من عائلة الشرى ، منتشر جدًا فيحوض البحر الأبيض المتوسط ومعروف على نطاق واسع في الطب التقليدي كمضاد للأكسدة ومضاد للدم. الهدف من هذا العمل هو تقييم التأثير المضاد للانحلال لأوراق *Urtica* ضد انحلال الدم الناتج عن NaCl على كريات الدم الحمراء البشرية. دراسة محتوى المستخلصات: الميثانولي ، الإيثانولي والاسيتوني في المركبات الفينولية تم

تقديرها بواسطة المقاييس اللونية. وقد أثبتت النتائج ثراء هذه العناصر في البوليفينول والفلافونويد وكذلك الفلافونول والفلافونون. تم تسجيل محتوى أعلى من العفص المكثف بواسطة مستخلص الأسيتون. كما تم تقييم السمية الخلوية لهذه المقتطفات. أظهرت جميع المستخلصات تأثيرا ساما يتجاوز 80% بتركيز عال (500 ميكروغرام / مل)، من ناحية أخرى ، بتركيزات تتراوح من 25 ميكروغرام / مل إلى 75 ميكروغرام / ملتمارس تأثير وقائي. لاختبار الفعالية المضادة للانحلال ، أعطى المستخلص الإيثانولي أعظمية تثبيط انحلال الدم (86.1%) مقارنة بالمستخلص الميثانولي (47.30%) بتركيز منخفض 25 ميكروغرام / مل. تثبتت النتائج التي تم الحصول عليها الإمكانيات المفيدة لأوراق أورتيكا في الوقاية من أمراض الانحلال.

**الكلمات المفتاحية:** *Urtica urens*، كريات الدم الحمراء، نشاط مضاد للانحلال، كلوريد الصوديوم.