



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES



THÈSE

DOCTORAT EN SCIENCES

Domaine : Sciences de la Nature & de la Vie

Filière : Sciences agronomiques

Spécialité : Nutrition et santé

Composition chimique et propriétés biologiques des polyphénols de l'ortie (*Urtica dioica* L.)

Présentée

Par

Mme Belabbas Meryem

Soutenue le 29 Décembre 2020 devant le jury d'examen composé de :

Présidente :	Dr. Keddari soumia (MCA)	Univ. Mostaganem
Directeur de thèse :	Pr. Riazi ali	Univ. Mostaganem
Examineurs :	Pr. Boualga Ahmed	Univ. Es-sénia Oran
	Pr. Toumi fawzia	Univ. Sidi Bel Abbès
	Pr. Merzouk Hafida	Univ. Tlemcen
	Dr. Chaalel Abdelmalek (MCA)	Univ. Mostaganem

Année universitaire : 2019 - 2020

Dédicaces

A ma chère mère qui a toujours été présente, elle a tant œuvré pour m'apporter son aide et son soutien.

A la mémoire de mon cher père qui aurait tant aimé me voir en ce jour.

A mes deux enfants, Ali et Mohammed Achraf, pour tout le bonheur et la joie qu'ils m'apportent.

A mon mari, mes sœurs, mon frère, ma belle sœur et mes beaux frères pour leur soutien.

A mes très chers neveux.

Belabbas Meryem

Avant propos

Les travaux de la présente thèse ont été réalisés majoritairement au Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem dirigé par le Pr Riazi Ali. Certaines manipulations spécifiques comme celles de la neurotoxicité ont été réalisées au laboratoire de pharmacologie de l'université de Durham en Angleterre dirigé par le professeur Chazot P.L. L'identification des polyphénols par la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) a été réalisée au laboratoire de pharmacologie de l'université de Pavia en Italie dirigé par professeur Daglia M.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à mon directeur de thèse, Mr Riazi Ali, professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, pour l'encadrement, le soutien et la confiance qu'il m'a accordé. Merci de m'avoir permis de réaliser ce travail en m'accordant toute votre disponibilité et vos conseils. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance pour votre soutien moral et votre confiance.

Mes chaleureux remerciements sont adressés à Mme Keddari Soumia, Maitre de conférences de classe A, à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, qui a bien voulu présider le jury de ma thèse.

Je suis honoré par la participation de Mr Boualga Ahmed, Professeur à l'université Ahmed Ben Bella Oran 1, à l'examen de cette thèse. Je vous exprime tout mon respect et ma reconnaissance.

J'adresse ma gratitude à Mme Merzouk Hafida, Professeur à l'université Abou Baker Belkaid Tlemcen, qui a accepté d'apporter sa contribution à la valorisation de ce travail.

Je remercie vivement Mme Toumi Fawzia, Professeur à l'université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès, qui a aimablement accepté d'examiner ce travail de thèse. Je vous exprime toute ma reconnaissance.

Je remercie également Mr Chaalel Abdelmalek, Maitre de conférences classe A, à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour avoir accepté de prendre part au jury d'examen de ma thèse.

Mes remerciements sont adressés à mes collègues et amis pour leurs encouragements, et leur soutien moral : Menouer Asma sara, Yehyaoui Hassiba, Belahcen Nadia, Hedidi Djahida, Amokrane Dalila, Mokhtar Meriem, Merzoug Mohamed, Bouchikh amina et Mehboubi Salima.

Je remercie Mr Nadji Omar, enseignant à l'université Hassiba Ben Bouali chlef, ainsi que mes étudiants qui m'ont accompagné et beaucoup aidé dans les expérimentations in vivo.

Je salue et remercie mes collègues de l'université Djillali Liabès Sidi Bel Abbès, où j'exerce présentement, pour leurs encouragements et leur soutien moral.

Enfin, ce travail est le fruit de longues années d'études auxquelles l'amour et le soutien inconditionnel de ma famille ont largement contribué.

Mostaganem, octobre 2020

Meryem Belabbas

Résumé

L'objectif de cette étude est la détermination de la composition en polyphénols et des propriétés biologiques in vitro et in vivo de la grande ortie (*Urtica dioica* L.). Deux méthodes ont été employées pour l'extraction de polyphénols à partir de feuilles et inflorescences fraîches et sèches d'*Urtica dioica*. Des dosages colorimétriques ont permis de déterminer l'extrait le plus riche en polyphénols. L'identification et quantification des polyphénols ont été effectuées par la HPLC-PDA-ESI-MS. L'activité antioxydante a été déterminée par quatre tests in vitro : FRAP, DPPH, TEAC, inhibition de blanchiment du β -carotène. L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé ; ce qui a permis la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par dilution en milieu liquide. En outre, la neurotoxicité a été déterminée par le test de viabilité cellulaire (MTT). L'évaluation des activités biologiques in vivo ont été précédés par la détermination de la toxicité aiguë (DL_{50}) suivi des tests d'activité analgésique et antipyrétique ainsi que l'activité anti-inflammatoire par le test d'induction d'œdème par injection de carragénine.

Neuf flavonoïdes et sept acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés ont été identifiés, la rutine et l'acide ferrulique étaient les plus abondants avec 2005 et 215 $\mu\text{g} / \text{g}$ d'ortie fraîche, respectivement. L'extrait phénolique d'ortie a exercé une activité anti-radicalaire et antioxydante significative et dose dépendante. Une sensibilité souche-dépendante à été observée vis-à-vis des polyphénols d'ortie. Les souches les plus sensibles sont *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* avec des CMI de 0.039 et 0.156mg/ mL. La DL_{50} est supérieur à 2000 mg/Kg poids corporel. En revanche, l'extrait phénolique d'ortie utilisé à une concentration de 1mg/mL n'a pas manifesté d'effet neurotoxique vis-à-vis des cellules neuronales cancéreuses CAD. L'extrait étudié a un montré un effet analgésique périphérique avec un pourcentage de protection contre la douleur de 81% à 400mg/kg poids corporel dans le test writhing et de 60.39% dans le test de la formoline. Dans l'activité antipyrétique, l'extrait a réduit la température corporelle d'une façon significative et d'une manière dose-dépendante. Concernant l'activité anti-inflammatoire, l'extrait d'*U. dioica* a induit une inhibition de la dénaturation de l'albumine de 72.38 % et de la lyse membranaire HRBC de 60.44 % à la concentration de 1 mg/mL. L'inflammation provoquée par la carragénine a été réduite de 95% à une concentration de 200mg/kg poids corporel. Les résultats obtenus ont clairement montré tous les bénéfices santé que l'on peut tirer des feuilles et inflorescences de l'ortie qui mérite plus d'intérêt de la part des secteurs du pharmaceutique et du parapharmaceutique, ainsi que celui de l'agroalimentaire.

Mots clés : *Urtica dioica* L., composition chimique, activités biologiques, polyphénols.

Abstract

The objective of this study is the determination of the polyphenol composition and the biological properties in vitro and in vivo of stinging nettle (*Urtica dioica* L.). Two methods were used for the extraction of polyphenols from the fresh and dry leaves and inflorescences of *Urtica dioica*. Colorimetric assays made it possible to determine the extract richest in polyphenols. The identification and quantification of polyphenols was determined by HPLC-PDA-ESI-MS. Antioxidant activity was determined by four in vitro tests: FRAP, DPPH, TEAC, β -carotene bleach inhibition. For the determination of the antimicrobial activity, the disk diffusion method in agar medium was used followed by the determination of the minimum inhibitory concentrations by dilutions in liquid medium. In addition, anti-inflammatory activity was determined by two in vitro tests and neurotoxicity by the cell viability test (MTT). The evaluation of the biological activities in vivo were preceded by the determination of the acute toxicity (LD₅₀) followed by the tests of analgesic and antipyretic activities as well as the anti-inflammatory activity by the test of induction of edema by carrageenan. . Nine flavonoids and seven hydroxycinnamic acids and their derivatives were identified, rutin and ferrulic acid were the most abundant with 2005 and 215 $\mu\text{g} / \text{g}$ of fresh nettle.

The extract showed significant anti-radical and antioxidant activity correlated with its polyphenol content. For antimicrobial tests evaluated against Gram-positive and Gram-negative bacteria, the polyphenols of *U. dioica* had an effect on most of the strains tested, the most sensitive of which were *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* with MICs of 0.039 and 0.156 mg / mL . The LD₅₀ is greater than 2000 mg / Kg bw. However, in neurotoxicity at a concentration of 1 mg / mL , the extract had no effect on cell viability. The extract studied showed a peripheral analgesic effect with a percentage of pain protection of 81% at 400 mg / kg in the writhing test and 60.39% in the formalin test. In antipyretic activity, the extract reduced body temperature significantly and in a dose dependent manner. Regarding anti-inflammatory activity, extract of *U. dioica* induced an inhibition of albumin denaturation of 72.38% and HRBC membrane lysis of 60.44% at a concentration of 1 mg / mL . The inflammation caused by carrageenan was reduced by 95% at a concentration of 200 mg / kg . The results obtained clearly showed all the health benefits that can be derived from the leaves and inflorescences of nettle, which deserves more interest from the pharmaceutical and parapharmaceutical sectors, as well as the agrifood sector.

Key words: *Urtica dioica* L., chemical composition, biological activities, polyphenol.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد تركيبة البوليفينول والخصائص البيولوجية في المختبر وفي الجسم الحي لنبات القراص اللادع (*Urtica dioica L.*). تم استخدام طريقتين لاستخراج مادة البوليفينول من الأوراق الطازجة والجافة ونورات *Urtica dioica*. جعلت فحوصات قياس الألوان من الممكن تحديد المستخلص الأكثر ثراءً في مادة البوليفينول. تم تحديد تحديد وتقدير البوليفينول بواسطة HPLC-PDA-ESI-MS. تم تحديد نشاط مضادات الأكسدة من خلال أربعة اختبارات في المختبر: FRAP، DPPH، TEAC، تثبيط التبييض كاروتين. لتحديد نشاط مضادات الميكروبات، تم استخدام طريقة نشر القرص في وسط أجار متبوعاً بتحديد الحد الأدنى من التركيزات المثبطة عن طريق التخفيفات في الوسط السائل. بالإضافة إلى ذلك، تم تحديد النشاط المضاد للالتهابات من خلال اختبارين في المختبر والسمية العصبية عن طريق اختبار قابلية الخلية للبقاء (MTT). وقد سبق تقييم الأنشطة البيولوجية في الجسم الحي تحديد السمية الحادة (LD₅₀) متبوعاً باختبارات النشاطات المسكنة وخافضة للحرارة وكذلك النشاط المضاد للالتهابات باختبار تحريض الوذمة بواسطة الكاراجينان. تم تحديد تسعة مركبات فلافونويد وسبعة أحماض هيدروكسي سيناميك ومشتقاتها، وكان الروتين وحمض الفيروليك أكثر وفرة في عام 2005 و 215 ميكروغرام / جرام من نبات القراص الطازج.

أظهر المستخلص نشاطاً كبيراً مضاداً للجذور ومضاداً للأكسدة مرتبطاً بمحتواه من البوليفينول. بالنسبة لاختبارات مضادات الميكروبات التي تم تقييمها ضد البكتيريا موجبة الجرام وسالبة الجرام، فإن البوليفينول في U. كان للديويكا تأثير على معظم السلالات المختبرة، وأكثرها حساسية كانت *Staphylococcus aureus* و *Candida albicans* مع MICs 0.039 و 0.156 مجم / مل. الجرعة المميتة، 50 أكبر من 2000 ملجم / كجم من وزن الجسم، ومع ذلك، في السمية العصبية بتركيز 1 ملجم / مل، لم يكن للمستخلص أي تأثير على حيوية الخلية. أظهر المستخلص المدروس تأثير مسكن طرفي بنسبة حماية للألم بلغت 81% عند 400 ملجم / كجم في اختبار اللف و 60.39% في اختبار الفورمالين. في نشاط خافض للحرارة، يقلل المستخلص من درجة حرارة الجسم بشكل كبير وبطريقة تعتمد على الجرعة. فيما يتعلق بالنشاط المضاد للالتهابات، مستخلص من *U. dioica* في تثبيط تمسخ الألبومين بنسبة 72.38% وتحلل غشاء HRBC بنسبة 60.44% بتركيز 1 مجم / مل. تم تقليل الالتهاب الناتج عن الكاراجينان بنسبة 95% بتركيز 200 مجم / كجم. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بوضوح جميع الفوائد الصحية التي يمكن الحصول عليها من أوراق نبات القراص ونوراته، والتي تستحق اهتماماً أكبر من قطاعي الأدوية والمواد الصيدلانية، وكذلك الصناعات الغذائية.

الكلمات المفتاحية: *Urtica dioica L.*، التركيب الكيميائي، الأنشطة البيولوجية، البوليفينول.

Liste des abréviations

- **ABTS** : Acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
- **AINS** : Anti-inflammatoire non stéroïdien
- **BSA** : Albumine sérique bovine
- **CAD** : Cellules catécholaminergique du système nerveux central
- **CMI** : Concentration minimale inhibitrice.
- **CMB** : Concetation minimale bactéricide.
- **CRP** : C-Protéine Réactive
- **DL₅₀** : Dose létale qui causerait la mort de 50% de rats.
- **DMSO** : Diméthyl sulfoxyde
- **D.O** : Densité optique
- **DPPH** : 1,1-diphényl- 2-pycril-hydrazyl.
- **EM**: Extrait méthanolique
- **EMAE** : Eau/ méthanol/ acétate d'éthyle
- **EPFIO** : Extrait phénolique des feuilles et inflorescences d'ortie
- **ESI** : Source d'ionisation par electrospray
- **FNS** : Formulation et numérotation sanguine
- **FRAP**: Ferric Reducing Antioxidant Power.
- **HPLC** : Chromatographie en phase liquide
- **HRBC** : globules rouges humaines (Human red blood cell)
- **IbBC**: Inhibition du blanchiment du β -carotène
- **IC₅₀** : La concentration qui correspond à 50% d'inhibition
- **mg E AG/g** : milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme.
- **mg E CA/g** : milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme.
- **mg E Q/g** : milligrammes d'équivalent de quercétine par gramme.
- **mM ET/g** : millimoles d'équivalent de trolox par gramme
- **mM Fe²⁺/g** : millimoles d'équivalent d'ion ferrique par gramme
- **MF** : Matière fraîche
- **MS** : Matière sèche
- **MTT**: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide
- **MV** : Matériel végétal
- **p.c.** : Poids corporel

- **PDA** :Détecteur à réseau de photodiodes
- **P/V** : Poids/volume
- **TPT** : Teneur en polyphénols totaux
- **TFT** : Teneur flavonoïdes totaux
- **TAHCT** : Teneur en acides hydroxycinnamiques totaux
- **TEAC** : Trolox equivalent antioxydant capacity
- **TPTZ** : Tripyridyltriazine.
- **UFC/mL** : Unité formant colonie par millilitre
- ***U. dioica***: *Urtica dioica L.*
- **v/v** : Volume sur Volume.

Liste des tableaux

Tableau 1: Teneur en éléments minéraux et oligo-éléments en mg/100g feuilles sèches.....	8
Tableau 2: Les principaux acides phénoliques identifiés chez <i>U. dioica</i>	10
Tableau 3 : Les principales utilisations de l'ortie dioïque (<i>Urtica dioica</i> L.).....	13
Tableau 4: Rendements d'extraction des polyphénols de feuilles/inflorescences d' <i>U. dioica</i>	42
Tableau 5: Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO).....	45
Tableau 6: Teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de feuilles et d'inflorescences d' <i>Urtica dioica</i>	47
Tableau 7 : Dosages des acides hydroxycinnamiques totaux des différents extraits de feuilles et d'inflorescences d' <i>U. dioica</i>	49
Tableau 8: Identification des polyphénols d' <i>Urtica dioica</i> L. par HPLC-PDA-ESI/MS.....	53
Tableau 9: Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance de bactéries par l'EPFIO, la vancomycine et la gentamicine; ainsi que celle d'une levure par l'EPFIO et le miconazole.....	58
Tableau 10: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et effet bactérien de l'extrait phénolique de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO).....	60
Tableau 11 : Activité antioxydante <i>in vitro</i> de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) déterminée selon quatre méthodes différentes	68
Tableau 12: Corrélations de Pearson entre les paramètres d'activité antioxydante et les teneurs phénoliques (TPT), flavonoïdes totaux (TFT) et en hydroxycinnamiques totaux (TAHCT).....	70
Tableau 13 : Effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur l'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine	72
Tableau 14 : Effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur la stabilisation membranaire des globules rouges vis_à-vis de l'hémolyse HRBC	73
Tableau 15: Effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur la pyrexie induite par la levure de bière.....	82

Tableau 16 : Effet des différentes concentrations de l'extrait de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur les concentrations de la protéine C-réactive (CRP)et l'albumine chez les rats Wistar87

Tableau 17 : Effet de l'extrait phénolique des feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur le taux de leucocytes et de plaquettes des rats Wistar.....90

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes parties d' <i>Urtica dioica</i> . (a) fleur femelle, (b) fleur mâle, (c) poils urticants sur la tige, (d) fruit, (e) les feuilles, (f) partie souterraine.....	7
Figure 2 : Les rats Wistar en élevage.....	33
Figure 3 : Injection par voie intra-péritonéale (ip) des traitements	37
Figure 4 : Mesure de l'œdème à l'aide d'un vernier caliper	38
Figure 5 : Effet du solvant d'extraction et du prétraitement du matériel végétal sur le rendement d'extraction des différents extraits d' <i>Urtica dioica</i>	42
Figure 6 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	43
Figure 7 : Effet de la méthode d'extraction et du prétraitement du matériel végétal sur les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits d' <i>Urtica dioica</i>	45
Figure 8 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	47
Figure 9 : Effet du solvant d'extraction et du prétraitement du matériel végétal sur les teneurs en flavonoïdes des différents extraits d' <i>Urtica dioica</i>	48
Figure 10 : courbe d'étalonnage de l'acide caféique.....	48
Figure 11 : Effet du solvant d'extraction et du prétraitement du matériel végétal sur les teneurs en acides hydroxycinnamiques totaux des différents extraits d' <i>U. dioica</i> L.....	49
Figure 12 : La Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les rendements d'extraction des différents extraits d' <i>U. dioica</i>	51
Figure 13 : Profil HPLC-PDA de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) enregistré à 280 nm	52
Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS• en fonction des différentes concentrations de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO), de l'acide ascorbique et de la quercétine(P<0.01).....	62
Figure 15 : courbe d'étalonnage de trolox à 734 nm.....	63
Figure 16 : Activité antiradicalaire en mM d'Equivalents Trolox de l'EPFIO comparée à celles de l'acide ascorbique et de la quercétine	63
Figure 17 : Concentrations inhibitrices de 50% des radicaux libres DPPH (IC ₅₀ en µg/mL) de l'extrait phénolique des feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO), de l'acide ascorbique et de la quercétine).....	65

Figure 18: courbe d'étalonnage du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 593nm.....	66
Figure 19 : Pouvoir réducteur du fer ferrique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO), de la quercétine et de l'acide ascorbique (Test Tukey, $P < 0.05$).....	66
Figure 20 : Concentrations d'EPFIO, d'acide ascorbique et de quercétine inhibitrices de 50% (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$) du blanchiment du β -carotène	67
Figure 21 : Effet du traitement des cultures de cellules CAD avec l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) pendant 24 heures sur la viabilité cellulaire $P < 0,01$	75
Figure 22: Effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur les pourcentages de protection contre la douleur induite par l'injection de l'acide acétique ($P < 0.05$).....	78
Figure 23 : Effet analgésique l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) et de l'indométacine sur la première phase de douleur (première 5min) (ANOVA, $P < 0.001$).....	80
Figure 24 : Effet analgésique l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) et de l'indométacine sur la deuxième phase de douleur (entre 15 et 30min) (ANOVA, $P < 0.01$).....	81
Figure 25 : Évolution de la taille de l'œdème en (mm) pendant les 6 heures qui ont suivi l'injection de carragénine chez les rats traités par différentes concentrations d'EPFIO en comparaison avec le standard, le diclofenac	84
Figure 26 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème 1 heure après l'injection de la carragénine 1% (ANOVA $P < 0.01$, test Tukey).....	85
Figure 27 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème 3 heures après l'injection de la carragénine 1% (ANOVA $P < 0.001$, test Tukey).....	85
Figure 28 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème 6 heures après l'injection de la carragénine 1% (ANOVA $P < 0.01$, test Tukey).....	85
Figure 29 : Examen histologiques des pattes de rats des différents lots expérimentaux. (a) Lot de référence (b) Témoin positif (c) EPFIO 50mg/kg (d) EPFIO 100mg/kg (e) EPFIO 150mg/kg (f) EPFIO 200mg/kg (g) EPFIO 250mg/kg (h) Témoin négatif –diclofenac-	92

Tables des matières

Dédicaces	
Avant propos	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction	1
Chapitre I: L'ortie <i>Urtica dioica</i> L. : une plante sous-estimée du grand public algérien	3
I.1. Généralités sur la plante <i>Urtica dioica</i> L	3
I.1.1. Historique	3
I.1.2. Répartition géographique	4
I.1.3. Données botaniques sur l'ortie	4
I.1.3.1. La famille des Urticacées	4
I.1.3.2. Classification	4
I.1.3.3. Description de l'ortie dioïque	5
I.1.3.3.1. Appareil végétatif	5
I.1.3.3.2. Appareil reproducteur	6
I.1.3.3.3. Ecosystème	6
I.1.4. Composition chimique de l'ortie	7
I.1.4.1. Composition des feuilles	7
I.1.4.2. Composition des tiges	9
I.1.4.3. Composition des poils urticants	9
I.1.4.4. composition des fleurs	9
I.1.4.5. Composition du fruit	9
I.1.4.6. Composition de la racine	9
I.2. Les métabolites secondaires présents chez l'ortie et pharmacologie	10
I.2.1. Les composés phénoliques de l'ortie	10
I.2.1.1. Les acides phénoliques	10
I.2.1.2. Les flavonoïdes	11
I.2.1.3. Les coumarines	11
I.2.1.4. Les lignanes	11

I.2.2. Les caroténoïdes de l'ortie	11
I.2.3. Les huiles essentielles de l'ortie	12
I.3. Différents usages connus de l'ortie	12
I.3.1. Usage thérapeutique	12
I.3.1.1. Activité antioxydante	13
I.3.1.2. Action sur le système nerveux central	14
I.3.1.3. Action sur le système cardiovasculaire	14
I.3.1.4. Action anti-inflammatoire de l'ortie	15
I.3.1.5. Action antifongique	15
I.3.1.6. Action antimicrobienne et antivirale	16
I.3.1.7. Action sur la glycémie	16
I.3.1.8. Activité immunomodulatrice d' <i>U. dioica</i>	17
I.3.1.9. Action analgésique et anesthésique locale	17
I.3.1.10. Action d'ortie sur l'appareil reproducteur masculin : l'hyperplasie bénigne de la prostate	17
I.3.1.11. Action sur le Cancer	18
I.3.2. Usage agricole	18
I.3.3. Usage alimentaire	19
I.3.4. Usage textile	20
Chapitre II : Matériels et méthodes	21
II.1. Extraction des polyphénols	21
II.1.1. Zone de récolte du matériel végétal	21
II.1.2. Prétraitement du matériel végétal	21
II.1. 3. Les solvants d'extraction	21
II.1.4. Calcul du rendement d'extraction des polyphénols	22
II.1.5. Dosage colorimétrique des composés phénoliques	22
II.1.5.1. Dosage des composés phénoliques totaux(TPT)	22
II.1.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux (TFT)	23
II.1.5.3. Dosage des acides hydroxycinnamiques totaux(TAHCT)	23
II.1.6. Analyse chromatographique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO)	24

II.1.6.1. Identification des polyphénols de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) par HPLC-PDA-ESI-MS	24
II.1.6.2. Quantification des différents composés phénoliques de l'EPFIO	25
II.2. Méthodes d'étude des activités biologiques de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO)	25
II.2.1. Les expériences <i>in vitro</i>	25
II.2.1.1. Mise en évidence et évaluation de l'activité antimicrobienne de l'EPFIO.	25
II.2.1.1.1. Nature et origine des microorganismes utilisés	25
II.2.1.1.2. Conditions de culture des souches	26
II.2.1.1.3. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien de l'EPFIO par la méthode de diffusion sur gélose (AWDT : Agar Well Diffusion Test)	26
II.2.1.1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'EPFIO	27
II.2.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante d'extraits phénoliques de feuilles et d'inflorescence d'ortie (EPFIO)	27
II.2.1.2.1. Détermination de la capacité antioxydante de l'EPFIO en équivalents Trolox (TEAC : Trolox Equivalent Antioxydant Capacity)	27
II.2.1.2.2. Mesure du pouvoir réducteur du fer ferrique ou « Ferric Reducing Antioxydant Power ou FRAP»	28
II.2.1.2.3. Méthode de piégeage du radical libre, le 2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH°)	28
II.2.1.2.4. Détermination du niveau d'inhibition du blanchiment du β -carotène	29
II.2.1.3. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'EPFIO	30
II.2.1.3.1. Test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine	30
II.2.1.3.2. Test de stabilité de la membrane des globules rouges humains vis-à-vis de l'hémolyse	30
II.2.1.4. Méthode d'évaluation de la neurotoxicité d'extraits phénoliques d'ortie	31
II.2.1.4.1. Nature, origine et culture de la lignée cellulaire neuronale tumorale utilisée	31
II.2.1.4.2. Procédure opératoire	32
II.2.2. Les expériences <i>in vivo</i>	33
II.2.2.1. Les animaux d'expérience et conditions d'élevage	33
II.2.2.2. Détermination de la toxicité aiguë d'extraits phénoliques de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar	34
II.2.2.2.1. Mode opératoire	34

II.2.2.2.2. Détermination de la dose létale 50 (DL ₅₀)	34
II.2.2.3. Détermination de l'activité analgésique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar	34
II.2.2.3.1. Test du writhing : constriction abdominale	34
II.2.2.3.1.1.. Procédure d'induction de la douleur	34
II.2.2.3.1.2. Procédure de suivi et d'évaluation de l'activité analgésique	35
II.2.2.3.2. Test à la formaline	35
II.2.2.3.2.1. Procédure d'induction de la douleur	35
II.2.2.3.2.2. Procédure de suivi et d'estimation de l'activité analgésique	35
II.2.2.3.2.2.1. Estimation du temps de lèchement de la patte	35
II.2.2.3.2.2.2. Pourcentage de protection	35
II.2.2.4. Détermination de l'activité antipyrétique de l'EPFIO chez le rat Wistar	36
II.2.2.5. Méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'EPFIO chez le rat Wistar	37
II.2.2.5.1. Procédure d'induction de l'inflammation (œdème) par la carragénine	37
II.2.2.5.2. procédure de suivi de l'évolution de l'œdème	38
II.2.2.5.3. Prélèvement sanguin et dosage des marqueurs de l'inflammation	39
II.2.2.5.3.1. Dosage de la C-Protéine Réactive (CRP) et de l'albumine	39
II.2.2.5.3.2. Formulation et Numération Sanguine (FNS)	39
II.2.2.5.4. Examen histologique des pattes de rats traités	39
III.3. Analyse statistique	39
Chapitre III : Résultats et discussion	41
III.1. Extraction des polyphénols	41
III.1.1. Rendement de l'extraction	41
III.1.2.-Teneurs en polyphénols totaux des feuilles et inflorescences d'ortie	43
III.1.3 Dosage des flavonoïdes	46
III.1.4. Teneurs en acides hydroxycinnamiques totaux	48
III.1.5. Corrélation entre le rendement d'extraction et le dosage des polyphénols totaux	50
III.1.6. Analyse chromatographique des polyphénols	52
III.1.6.1. Identification des polyphénols de l'extrait phénolique de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO-EMAE) par HPLC-PDA-ESI-MS	52
III.1.6.2. Quantification des différents composés phénoliques	53

III.2. Méthodes d'étude des activités biologiques de l'EPFIO (Extrait Phénolique de Feuilles et d'Inflorescences d'Ortie)	56
III.2.1. Les expériences <i>in vitro</i>	56
III.2.1.1. Mise en évidence et évaluation de l'activité antimicrobienne de l'EPFIO	56
III.2.1.1.1. Pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur gélose (AWDT : Agar Well Diffusion Test)	56
III.2.1.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	59
III.2.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante d'EPFIO (Extrait Phénolique de Feuilles et d'Inflorescences d'Ortie)	61
III.2.1.2.1. Détermination de la capacité antioxydante en équivalents Trolox (TEAC)	61
III.2.1.2.2. Activité du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH)	64
III.2.1.2.3. Mesure du pouvoir réducteur du fer ferrique (Test FRAP)	65
III.2.1.2.4. Détermination du niveau d'inhibition du blanchiment du β -carotène	67
III.2.1.2.5. Corrélations entre les paramètres d'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et acides hydroxycinnamiques	68
III.2.1.3. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO)	71
III.2.1.3.1. Test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine	71
III.2.1.3.2. Test de stabilité de la membrane des globules rouges humains vis-à-vis de l'hémolyse	73
III.2.1.4. Méthode d'évaluation de la neurotoxicité de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO)	74
III.2.2. Les expériences <i>in vivo</i>	76
III.2.2.1. Détermination de la toxicité aigüe de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) d'ortie chez le rat Wistar	76
III.2.2.2. Détermination de l'activité analgésique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar	76
III.2.2.2.1. Test du writhing : constriction abdominale	76

III.2.2.2.2. Test à la formaline	79
III.2.2.3. Détermination de l'activité antipyrétique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar	81
III.2.2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar : test d'œdème induit par la carragénine	83
III.2.2.4.1. effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur l'évolution de l'œdème de la patte de rat	83
III.2.2.4.2. Effet de l'extrait phénolique de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur les marqueurs de l'inflammation	86
III.2.2.4.2.1. Effet de l'extrait phénolique de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur C-Protéine Réactive (CRP) et de l'albumine	86
III.2.2.4.2.2. Effet de l'extrait phénolique de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur la Formulation et Numération Sanguine (FNS)	88
III.2.2.4.2.3. Examen histologique de la patte de rat	92
Conclusion et perspectives	93
Références bibliographiques	96+
Communications et Publication	123

Introduction

En ce vingt et unième siècle, la tendance au recours aux produits naturels plutôt qu'aux substances de synthèse devient de plus en plus fréquente chez les populations du globe qui s'intéressent de nouveau aux éléments issus directement de notre environnement et notamment des plantes pour résoudre de nombreux soucis de santé.

Selon l'OMS, plus de 80% de la population mondiale dépend de la médecine traditionnelle pour ses besoins de soins de santé primaires (**Ammon et al., 1993**). On estime qu'aujourd'hui, de nombreuses matières végétales sont présentes ou ont fourni des modèles pour 50% des médicaments fabriqués en Occident (**Baker et al., 1995**). En raison de leur efficacité perçue et de leur effets secondaires minimes dans l'expérience clinique, des médicaments à base de plantes relativement peu coûteux sont largement prescrits, même lorsque leurs composés biologiquement actifs sont inconnus (**Valiathan, 1998**).

Les plantes ont été et sont toujours la source généreuse pour fournir à l'homme des substances bioactives précieuses dont les composés phénoliques qui sont les métabolites secondaires les plus abondants des plantes (**Manach et al., 2004**).

Au cours de ces dernières années, les polyphénols ont été étudiés pour leur implication potentielle dans la prévention de maladies chroniques telles que les maladies inflammatoires, infectueuses, cardiovasculaires, le cancer, l'ostéoporose, le diabète et les maladies neurodégénératives. Leur activité protectrice a été attribuée initialement à leur propriété antioxydante (**Tayel et El-Tras, 2012**).

Le rythme des découvertes de nouvelles molécules pour faire face à l'antibiorésistance qui est un défi majeur pour l'humanité demeure très insuffisant. Il n'existe pas encore de solution durable à ce défi posé par les microorganismes. Il n'y a pas de doute qu'aujourd'hui, l'industrie pharmaceutique met à disposition un nombre incalculable de médicaments pour faire face à la plupart de ces maladies ; néanmoins le problème de leurs effets indésirables plus ou moins importants demeure bien présents dans l'esprit de certains segments de la population qui y sont réfractaires (**Pathak et al., 2005**).

Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long cours tels que les maladies

gastrointestinales, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et la toxicité hépatique et urinaire (**Gaziano et Gibson, 2006 ; Batlouni, 2010**).

Parmi les plantes réputées mondialement pour leurs bienfaits, il y a *Urtica dioica L.*, communément appelée l'ortie dioïque. C'est une plante à fleurs de la famille des Urticacées, elle est vivace, herbacée et ubiquiste (**Zhang et al., 2014**). L'ortie est peu exigeante pour se développer et elle fait l'objet d'un regain d'intérêt sur le plan de la recherche en raison de son contenu en substances bioactives (**DiVirgilio et al., 2015 ; Vajić et al., 2018**) ; c'est ce qui fait qu'elle est pratiquement la seule espèce du genre *Urtica* à être cultivée et commercialisée à des fins pharmaceutiques (**Nahata et Dixit, 2012**).

Toutes les parties de cette plante ont une longue histoire d'utilisation en médecine traditionnelle et moderne; comme purificateur de sang, hypotensive, diurétique, anti-diarrhéique, antihémorragique, antidiabétique, antirhumatismal, ainsi que dans le traitement de l'eczéma, de l'arthrite et des infections urinaires (**Upton, 2013; Tahri et al., 2000 ; Vajić et al., 2018 ; chrubasik et Eisenberg, 1999**).

Toutes ces vertus ancestrales attribuées à l'ortie ont suscité notre intérêt d'identifier et de quantifier la fraction phénolique des feuilles et des inflorescences, et d'explorer les propriétés biologiques de ces composés et en l'occurrence leurs activités antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique. Des expérimentations in vivo et in vitro ont été entreprises. La mise en évidence expérimentale de ces propriétés serait un argument supplémentaire pour plus de regain d'intérêt agronomique et pharmacologique vis-à-vis de l'ortie pour que cette plante ne soit plus regardée sous le seul angle de mauvaise herbe en Algérie

Ce manuscrit est structuré en trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique sur l'ortie dioïque et présente les aspects botaniques, la composition phytochimique et les domaines d'utilisation.
- Le second chapitre décrit la méthodologie utilisée pour l'extraction des polyphénols, les dosages colorimétriques, le fractionnement des polyphénols par chromatographie liquide haute performance, les tests d'activité antioxydante, antimicrobienne, neurotoxique, anti-inflammatoire in vivo et in vitro; analgésique et antipyrétique.
- Le troisième chapitre est consacré à la présentation et à la discussion des résultats.

Chapitre I

L'Ortie *Urtica dioica* L.:

**Une plante sous estimée par
le grand public algérien**

Chapitre I: L'ortie *Urtica dioica* L.: une plante sous-estimée par le grand public algérien

I.1. Généralités sur la plante *Urtica dioica* L.

De nombreuses études ont été consacrées au screening de nouvelles phyto-biomolécules actives d'intérêt pharmaceutique, nutraceutique ou encore cosmétique à partir de plantes du terroir dont certaines font partie de la pharmacopée de nombreux pays. L'ortie (*Urtica dioica* L.) fait partie de ces plantes dont les bienfaits ne sont pas toujours connus et vulgarisés auprès du grand public algérien et dont le seul regard que lui portent les agriculteurs du pays est celui de mauvaise herbe envahissante qu'il faudrait, bien évidemment, éliminer.

I.1.1. Historique

Le mot «ortie» est un dérivé du latin *urtica* venant du verbe *urere*, qui signifie « brûler », en référence au caractère urticant de cette plante.

Depuis des millénaires, l'ortie est utilisée de diverses manières, notamment dans la production de fibres pour les tissus, les fils et le papier ; ou encore comme fourrage pour les animaux, colorant pour les tissus et présure végétarienne dans la fabrication du fromage.

Par ailleurs, l'ortie n'a cessé d'accompagner l'homme en lui procurant des bienfaits à ses maux quotidiens. Les premiers médecins de l'antiquité comme Hippocrate (460-370 avant J.-C.), Dioscoride (1^{er} siècle), Pline l'Ancien (23-79 après J.-C.) ou encore Galien (II^{ème} siècle après J.-C.) ont tous énumérés plusieurs remèdes à base d'ortie dans leur ouvrages : aussi bien pour soulager la douleur, chasser les vers intestinaux, soigner la calvitie, la goutte, les douleurs articulaires, les morsures rabiques en cataplasme, les plaies gangréneuses, les ulcères, l'aménorrhée, le saignement du nez, la toux, les engelures, l'asthme, la pneumonie, la pleurésie et les troubles de la rate. Pour finir, elle était aussi conseillée en cure à la fin de l'hiver afin de purifier et revitaliser l'organisme après la mauvaise saison; et ses graines étaient considérées comme aphrodisiaques et expectorantes (**Bertrand, 2010; Moro Buronzo, 2011; Tissier, 2011; Delvaille, 2013; Schulze-Tanzil et al., 2002**).

L'utilisation de l'ortie pour soigner les cas de diabète, a été mentionné pour la première fois par « le prince des médecins » Avicenne (980-1037) (**Delvaille, 2013**).

Urtica dioica fut inscrite au Codex de la pharmacopée en 1818. Dans cette période, l'ortie a connue un oubli jusqu'à ce que deux médecins français Ginestet (1845) et Joseph Cazin (1846) redécouvrent ses propriétés antihémorragiques (**Tissier, 2011**).

Dobreff (en 1924), découvre chez l'ortie une « sécrétine » analogue à celle contenue dans l'épinard. Dix ans après, Cremer présente ses propriétés antianémiques reconstituantes en mettant en évidence la prolifération des globules sanguine induite par cette dernière (Swerdlow, 2000).

I.1.2. Répartition géographique

La Grande ortie est d'origine eurasiatique, mais aujourd'hui présente dans le monde entier et dans toutes les régions montagneuses jusqu'à 2400m d'altitude (Bertrand, 2002). On la rencontre plus en Europe du Nord qu'en Europe du Sud, en Afrique du nord, en Asie et en Amérique du Nord et du Sud où elle est largement distribuée (Ait Haj said et al., 2016).

En Algérie, la Grande ortie est commune dans tout le nord et surtout dans le Tel algérien d'Est en Ouest (Beloued, 1998).

Les plantes du genre *Urtica* sont nitrophiles, elles poussent sur des sols riches en azote. Ainsi, l'ortie aime les sols ayant subi des actions anthropiques qui ont permis l'accumulation de déchets organiques, tout comme les sols d'alluvions, régulièrement enrichis par de nouveaux dépôts de matières en décomposition Elle est rencontrée près des habitations, fermes, jardins, ruines, décombres, haies, fossés ou encore à la lisière des bois. On la rencontre aussi sur des terrains incultes, les terrains vagues, les grandes étendues et les remblais (Bertrand, 2010).

I.1.3. Données botaniques sur l'ortie

I.1.3.1. La famille des Urticacées

La famille *Urticaceae* regroupe 48 genres, pour environ 1000 espèces dont la plupart sont herbacées (vivaces ou annuelles), avec également des arbustes, des lianes et même des arbres. La principale caractéristique des *Urticaceae* est la présence de poils qui recouvrent la plante, certains à cystolithes allongés, d'autres urticants (Bezanger-Beauquesne et al., 1975).

Les principales espèces du genre *Urtica* sont: *Urtica dioica* L. (la grande ortie), *Urtica urens* L. (Ortie brûlante ou « petite Ortie»), *Urtica pilulifera* L. (Ortie romaine ou « ortie à pilules»), *Urtica cannabina* L., *Urtica atrovirens* Req., *Urtica membranacea* Poiret. Ce sont les espèces *U. dioica* et *U. urens* qui sont connues pour posséder des propriétés médicinales (Bezanger-Beauquesne, 1980).

I.1.3.2. Classification

Selon la publication apparue en Novembre 2009 “ A phylogenetic classification of the of the land plants to accompany APG III” qui est complémentaire à la classification botanique

des angiospermes établie par « Angiosperms Phylogeny Group » en 1998 (APGIII, 2009), la classification de l'ortie dioïque est la suivante :

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta* (plantes vasculaires)

Embranchement : *Magnoliophyta* (phanérogames).

Sous-embranchement : *Magnoliophytina* (angiospermes)

Classe : *Eudicots*

S/classe : *Rosidées*

Super ordre : *Eurosidées I*

Ordre : *Rosales*

Famille : *Urticaceae*

Genre : *Urtica*

Espèce: *Urtica dioica*

I.1.3.3. Description de l'ortie dioïque

Elle a été décrite pour la première fois en 1753 par le naturaliste suédois Carl Von Linné. La plante d'ortie dioïque est couverte de poils urticants, c'est une herbacée vivace grâce à un rhizome jaune rampant, elle peut atteindre 1.50 mètre de haut. C'est une plante ayant des fleurs mâles et femelles portées par deux plants différents (Chavoutier et al., 2000). La figure 1, présente les différentes parties de l'ortie dioïque.

I.1.3.3.1. Appareil végétatif

Les feuilles d'*U. dioica* sont simples, opposées deux par deux, charnues, tombantes, à bord irrégulièrement dentelés. Elles ont une forme ovale à lancéolée et se terminent en pointe. De couleur vert foncé, leur face supérieure est recouverte de poils urticants blancs.

Les tiges sont dressées, robustes, non ramifiées, et à section quadrangulaires et recouverte de poils urticants. Elles sont d'une couleur verte lorsque la plante est jeune, et rouge violet lorsqu'elle est plus âgée (Bertrand, 2010).

L'ortie présente de longs rhizomes qui lui permettent de former des colonies, d'où son pouvoir envahissant. Les rhizomes rampants mesurent de 1 à 5 mm d'épaisseur et sont pourvus d'un chevelu de fines racines adventives. Le rhizome traçant est cylindrique, de 3 à 10 mm d'épaisseur et abondamment ramifié. La fixation de l'azote par le rhizome se fait par une symbiose avec un microorganisme tellurique *Rhizobium frankia* (Chavoutier et al., 2000).

I.1.3.3.2. Appareil reproducteur

La grande ortie est dioïque, mais il peut arriver que l'on retrouve au sein d'une population une faible proportion de pieds monoïques (portant à la fois les fleurs mâles et femelles) et de pieds ne présentant aucune fleur (**Bertrand, 2010**).

Les fleurs femelles sont de petites tailles, de couleur verdâtre et forment des grappes tombantes. Quant aux fleurs mâles, elles sont de couleur jaunâtre et forment des grappes dressées très ramifiées.

La floraison se déclenche en fonction de la luminosité et de la richesse du sol. Généralement, les fleurs apparaissent à la fin du printemps et en été (juin à septembre). Au moment des fortes chaleurs, les grains de pollen sont libérés par les pieds mâles sous forme d'un nuage laiteux et visible à l'œil nu (**Schaffner, 1992; Moustie, 2008; Bertrand, 2010**).

Le fruit d'*Urtica dioica* est constitué d'un akène ovale de couleur jaune-brun. Il est entouré d'un calice persistant et de 4 petites feuilles. Il contient une graine unique, albuminée, à embryon droit. L'ortie peut se multiplier par les deux méthodes de reproduction sexuée et asexuée (**Fleurentin et Hayon, 2008**).

I.1.3.3.3. Ecosystème

Les massifs d'ortie représentent de petits écosystèmes. Ils sont l'habitat d'une trentaine d'espèces d'insectes qui lui sont directement inféodées. Ils disparaîtraient immédiatement si l'ortie venait à être éradiquée : ce sont des insectes dont le nom d'espèce est *urticae*. Parmi ces espèces, ceux qui se nourrissent de la sève de l'ortie comme des citadelles dont *Eupteryx urticae*, le phyllobius de l'ortie (*Phyllobius urticae*), la petite punaise des orties (*Heterogaster urticae*), des psylles comme *Trioza urticae* (**Moustie, 2008; Bertrand, 2010**).

L'apparition d'insectes indifférents aux poils urticants, s'échelonne dans le temps et l'espace. Certains passent leur vie de larve dans les racines ou à l'intérieur de la tige, d'autres rongent les feuilles pour vivre. Des centaines d'autres êtres vivants profitent occasionnellement, directement ou indirectement, de la présence de l'ortie; elle leur sert de refuge ou de source de nourriture (**Schaffner, 1992 ; Wichtl et Anton, 2003 ; Notten et al., 2005**).

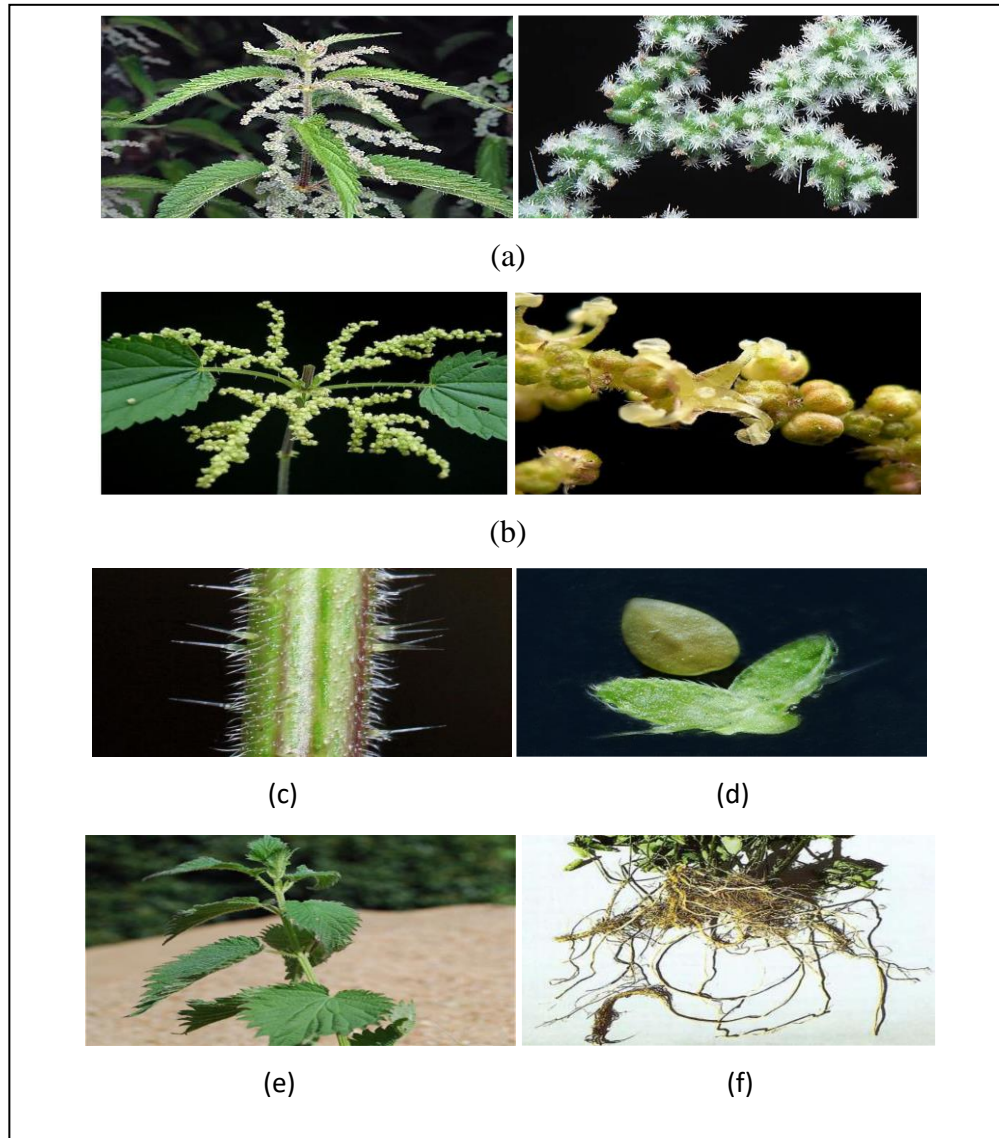


Figure 1 : Les différentes parties d'*Urtica dioica*. (a) fleur femelle, (b) fleur mâle, (c) poils urticants sur la tige, (d) fruit, (e) les feuilles, (f) partie souterraine (Chavoutier et al., 2000 ; Wichtl et Anton,2003 ; Bertrand, 2010).

I.1.4. Composition chimique de l'ortie

La composition de l'ortie varie selon la nature du sol, la variété et l'origine, l'exposition de la plante et les conditions climatiques. Elle varie évidemment en fonction de l'organe de la plante et de la période de récolte. Pour cela, les valeurs fournies par la littérature sont différentes.

I.1.4.1. Composition des feuilles

La composition minérale des feuilles d'ortie est reportée au tableau 1. Elles comportent 3 fois plus d'éléments minéraux que les feuilles d'épinard ou de persil. Elles sont riches en

calcium, magnésium et potassium (**Pradhan et al., 2015; Kavalali, 2003**). On y trouve aussi 3 à 5% (P/P) d'azote (**Wichtl et Anton, 2003**).

Tableau 1: Teneur en éléments minéraux et oligo-éléments en mg/100g feuilles sèches
(**Pradhan et al., 2015; Kavalali, 2003**).

Teneur en minéraux en mg/100 g		Minimum	Maximum
Macroéléments	Calcium	113.2	5090
	Magnésium	0.22	3560
	Phosphate	29	75
	Potassium	532	9172
	Sodium	5.5	16
Oligoéléments	Cobalt	0.0084	0.018
	Cuivre	0.52	1.747
	Fer	3.4	30.30
	Manganèse	0.768	5.784
	Molybdène	0.4265	-
	Nickel	0.0732	-
	Sélénium	0.0027	0.0074
	zinc	0.9	3.033

Les feuilles renferment 18 acides aminés dont les 8 essentiels ; ainsi que des acides gras saturés (palmitique, stéarique, myristique et en faible quantité l'acide nanodécanoïque), monoinsaturés (palmitoléique et en moindre quantité l'oléique) et polyinsaturés (les acides : linoléique: 11.6%, l' α -linoléique : 40.7% dans les feuilles matures) (**Guil-Guerrero et al., 2003**).

Les feuilles contiennent également moins de 1% de polyphénols (**Orčić et al., 2014**), des pigments (caroténoïdes), chlorophylle a et b (**Rombi et Robert, 2006; Ghedira et al., 2009; Tissier, 2011**), des vitamines (thiamine, riboflavine, acide folique, acide ascorbique, α tocophérol, vit. K) (**Couplan, 2013**). D'autres composés sont présents dans les feuilles d'ortie : des glycoprotéines, des lipides, des sucres (fructose, saccharose, glucose, arabinose, rhamnose...), des traces de nicotine. Ainsi que de la sécrétine, de l'acide silicique et d'huile essentielle (**Toldy et al., 2005; Fleurentin et Hayon, 2008**).

I.1.4.2. Composition des tiges

Peu de travaux se sont intéressés à la composition des tiges de l'ortie. Généralement, se sont les feuilles, les fruits et les racines qui sont étudiés.

Néanmoins, il a été mentionné que les tiges contiennent des acides gras comme ceux présents dans les feuilles. Elles contiennent aussi des composés phénoliques: les lignines, flavonoïdes, anthocyanes, acides phénoliques (**Orčić et al., 2014**).

I.1.4.3. Composition des poils urticants

Le liquide contenu à l'intérieur des poils urticants, est responsable de la sensation de brûlure suite au contact de l'ortie. Les composés du liquide seraient présents en faible quantité dans la plante, mais extrêmement concentrés au niveau des poils urticants (**Van Damme et al., 1988**).

Les poils urticants contiennent entre autre de l'histamine, de la sérotonine (5-hydroxytryptamine) (**Oliver et al., 1991**), de l'acétylcholine mais également de la choline, de la bétaine, de l'acide formique, de l'acide butyrique et des leucotriènes C4 (**Upton, 2013; Tissier, 2011**).

I.1.4.4 composition des fleurs

Les fleurs d'*U. dioica* contiennent le sitostérol, sitostérol glucoside et la scopolétine (**Orčić et al., 2014**). Des glycosides de flavonols ont été aussi identifiés dans des extraits méthanoliques des fleurs. Les fleurs femelles contiennent de l'acide chlorogénique et de l'acide caféyl-malique (**Akbay et al., 2003**).

I.1.4.5. Composition du fruit

Les fruits mûrs d'*Urtica dioica* renferment des vitamines (C, E, B1, B2, B3 et B6), des minéraux (fer, zinc, cuivre, calcium, phosphore, magnésium, manganèse, sodium, potassium, et sélénium), des mucilages formés de différents polysaccharides ainsi que de caroténoïdes et de l'huile (environ 30% du poids sec).

La fraction lipidique des graines d'*U. dioica* renferme une forte proportion d'acide palmitique et une faible quantité d'oméga-3 (**Akbay et al., 2003; Tissier, 2011; Yenes et al., 2009; Wichtl et Anton, 2003**).

I.1.4.6. Composition de la racine

La racine de l'ortie contient des polysaccharides (**Wichtl et Anton, 2003**), des acides gras comme les acides palmitoléique, oléique, gadoléique, linoléique, α -linoléique, 9Z,11E-13-hydroxy-9,11-octadecadiénoïque, 10E, 12Z-9-hydroxy-10,12-octadecadiénoïque (**Wagner et al., 1994; Ganssen et Spiteller, 1995; Wichtl et Anton, 2003; Guil-Guerrero et al.,**

2003), des céramides, des lignanes, des stérols et des tanins. La racine contient de la lectine, une agglutinine d'intérêt pharmacologique (Ganzera et al., 2003).

I.2. Les métabolites secondaires présents chez l'ortie

L'ortie dioïque est connue pour son large spectre d'activités biologiques (Bisht et al., 2012; Stanojević et al., 2009). Ces activités sont liées aux composés biologiquement actifs représentés par les métabolites secondaires. La richesse d'*U. dioica* en ces composés a fait l'objet de plusieurs travaux dont les résultats confirment la présence de composés phénoliques, de stérols, d'alcaloïdes et de terpénoïdes dans cette plante (Durović et al., 2017; Guil-Guerrero et al., 2003; Gül et al., 2012; Gülçin et al., 2004; Kukrić et al., 2012; Orčić et al., 2014; Otle et Yalcin, 2012; Pinelli et al., 2008).

I.2.1. Les composés phénoliques de l'ortie

I.2.1.1. Les acides phénoliques

Les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques sont les principaux acides phénoliques présents dans la partie aérienne de la grande ortie (tableau 2).

Tableau 2: Les principaux acides phénoliques identifiés chez *U. dioica*.

Type d'acide phénolique	nomenclature	Références
Acides hydroxybenzoïques	Acide p-hydroxybenzoïque	Johnson et al., 2013; Zekovic et al., 2017
	Diocanol	Ullah et al., 2013
	Acide gentisique	Orčić et al., 2014
	Acide vanillique	
	Acide protocatéchique	Zekovic et al., 2017 ; Pinelli et al., 2008 ; Orčić et al., 2014
	Acide gallique	
	Acide syringique	
Acides hydroxycinnamiques	Acide chlorogénique	Pinelli et al., 2008
	Acide 2-O-caféoyl-malique	
	Acide férulique	Lapinskaya et al., 2009; Orčić et al., 2014 ; Zekovic et al., 2017
	Acide 2-O- caféylmalique	
	Acide cinnamique	
	Acide sinapique	
	Acide p-coumarique	
Acide caféique		

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque dont la diversité structurale est due aux hydroxylations et/ou méthoxylations du noyau aromatique en diverses positions (2, 3 et 4) (Tomas-Barberan et al., 2000).

Les acides hydroxycinnamiques sont très répandus dans le règne végétal et leur diversité est également due à la variabilité des hydroxylations du noyau aromatique (Clifford et al., 2017). Ils sont rarement présents sous forme libre car ils sont retrouvés essentiellement sous forme conjuguée. Il s'agit de dérivés glycosylés ou d'esters d'acides quinique, tartrique ou shikimique (Manach et al., 2004; Macheix et al., 2006).

I.2.1.2. Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes identifiés chez *U. dioica* sont l'apigénine, lutéoline, chrysoeriol, kaempférol, quercétine, isorhamnétine, myricétine, genistéine, naringénine, catéchine et leurs glycosides comme Kampférol-3-O-glycoside, lutéoline-7-O-glycoside, quercetina-3-o-rhamnoside et la rutine (quercétine-3-O-rutinoside) (Ji et al., 2007; Bucar et al., 2006). Des anthocyanes sont aussi présents dans l'ortie (Zekovic et al., 2017).

I.2.1.3. Les coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Prés de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes.

L'ortie dioïque contient de la scopolétine en faible quantité (Anton et al., 2003) ainsi que de l'esculétine et l'ombelliférone (Zekovic et al., 2017).

I.2.1.4. Les lignanes

Ces composés de haut poids moléculaire contribuent à former, avec la cellulose et les dérivés hémicellulosiques, la paroi des cellules végétales. Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation (co-polymérisation) de trois alcools phénylpropéniques (Nkhili et al., 2009) et qui sont présents dans les racines de l'ortie sous forme de lignanes diaryl-furaniques et diaryl-butaniques (Schöttner et al., 1997; Gansser et Spitteller, 1995).

I.2.2. Les caroténoïdes de l'ortie

L'ortie dioïque contient de la lutéine et ses isomères (13-cis-lutéine, 13'-cis-lutéine, 9-cis-lutéine, 9'-cis-lutéine) qui sont les caroténoïdes prédominants dans les feuilles d'ortie (60% des caroténoïdes totaux). Elle contient également du β -carotène et ses isomères, ainsi que du lycopène.

Selon l'âge de la feuille, il y a présence également de néoxanthine, de violaxanthine et de traces de β -cryptoxanthine et de zéaxanthine. La quantité de caroténoïdes varie selon la maturité de la feuille (**Guil-Guerrero et al., 2003; Kavtaradze et Alaniya, 2003**).

I.2.3. Les huiles essentielles de l'ortie

Gül et al. (2012) ont rapporté les principaux composants de l'huile essentielle d'*U. dioica* comme suit:

- Le carvacrol-ou cymophénol (38.2%) est un phénol -monoterpénoïde. Il possède des effets antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires remarquables.
- La carvone (9%) est le constituant majeur des huiles essentielles des plantes couramment utilisées comme condiments.
- Le naphthalène (8.9%).
- (E) -anéthol (4.7%).
- L'hexahydrofarnésyl acétone (3%).
- (E) -géranyl acétone (2.9%).
- (E) - β -ionone (2.8%).
- Le phytol (2.7%).

I.3. Différents usages connus de l'ortie

L'ortie est une plante qui suscite l'intérêt à la fois scientifique et commercial, car elle est à l'origine de nombreux produits naturels à valeur ajoutée en exploitant toutes les parties de la plante (tige, feuilles, racines et graines). Le tableau 3 résume les principales utilisations des différentes parties de l'ortie (**Di virgilio, 2014**).

I.3.1. Usage thérapeutique

Les feuilles d'*U. dioica* sont inscrites dans la 11^{ème} édition de la pharmacopée européenne et à l'agence européenne du médicament (EMA). Elles sont également inscrites, avec les racines, d'une part sur la liste A de la 11^{ème} édition de la pharmacopée française qui répertorie les plantes médicinales utilisées traditionnellement, et d'autre part sur l'annexe I des plantes dont l'emploi est autorisé dans les compléments alimentaires depuis le 17 juillet 2014, du Journal Officiel (**Journal Officiel, 2014**).

La feuille d'ortie fait partie de la liste des « mélanges pour tisanes pour préparation officinales » de la Pharmacopée Française.

En Allemagne, l'ortie possède une monographie établie par la commission E du BfArM (l'Institut Fédéral des Médicaments et Dispositifs Médicaux).

Tableau 3 : Les principales utilisations de l'ortie dioïque (*Urtica dioica* L.) (Di Virgilio et al., 2015)

Champ d'application	Utilisations	Parties de la plante
Textile/ fibre	Cordes et filets de pêche, tissus et papiers, tissus soyeux, colorant naturel, biocomposites,	Tissus fibreux des tiges. Extraits de racines et de feuilles pour les colorants
Médecine	Anémie, rhumatisme, goutte, eczéma, diurétique, hypoglycémie, hypotension, hyperplasie bénigne de la prostate, problèmes cardiovasculaires, arthrite, rhinite allergique, antioxydant, antimicrobien, antifongique, antiviral, antiulcéreux	Feuilles, graines, racines, extraits aqueux et alcooliques
Cosmétique	Savons, shampoings, lotions pour la peau	Extrait de la plante
Alimentation	Salades, tartes, soupes, thé	Feuilles et jeunes pousses
Culture fourragère	Volaille, bovins, chevaux et oiseaux	Toute la plante
Locaux d'animaux	litière	Tige, anas comme sous-produit de la fibre

I.3.1.1. Activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'ortie a fait l'objet de plusieurs travaux. Il a été montré que l'extrait aqueux d'ortie présentait un pourcentage d'inhibition de la génération de superoxyde plus élevé que celui de l'hydroxyanisole butylé (BHA), de l'hydroxytoluène butylé (BHT) ou du α -tocophérol (vitamine E) (Gülcin et al., 2004). L'extrait hydro-alcoolique d'*Urtica dioica* a exercé une activité antioxydante plus élevée que celles des deux espèces *Urtica urens* et *Urtica membranacea* (Carvalho et al., 2017).

Des infusions d'ortie ont considérablement réduit la quantité de blessures aux tissus, et une diminution de l'augmentation des transaminases sériques ALT, de la catalase hépatique et de la superoxyde dismutase cérébrale chez des rats traités au TCA (acide trichloroacétique cancérigène) (Celik et Tuluçe, 2007).

L'huile des graines d'ortie, administrée à raison de 2mL/Kg poids corporel à des rats stressés au tétrachlorure de carbone, réduit les dommages oxydatifs et augmente le pouvoir antioxydant (**Kanter et al., 2003**).

I.3.1.2. Action sur le système nerveux central

La grande ortie est une plante adaptogène, elle augmente la capacité du corps à s'adapter au stress en rééquilibrant l'interactivité des trois systèmes : nerveux, endocrinien et immunitaire. Ainsi, **Patel et al. (2016)** ont montré que l'extrait d'*U. dioica* pouvait être efficace pour les troubles neurologiques liés au stress. Cet extrait détoxifie, améliore et stimule le métabolisme. Il a été démontré que l'ortie réduit l'activité spontanée chez le rat et la souris, inhibe les crises provoquées par les médicaments et diminue la température corporelle chez le rat (**Chahardehi et al., 2012**).

Les résultats des travaux de **Radak (2005)** suggèrent que l'ortie peut influencer les fonctions physiologiques du cerveau. Un apport fréquent en ortie réduit la concentration de radicaux libres et augmente la liaison dans le cerveau. Elle améliore donc, la résistance physique, ce qui présente un intérêt pour les sportifs, les travailleurs manuels et les personnes âgées.

I. 3.1.3. Action sur le système cardiovasculaire

Dans les travaux de **Testai et al. (2002)** sur les effets cardiovasculaires d'extraits aqueux et méthanolique d'ortie, il a été démontré que l'ortie a des propriétés hypotensives grâce à ses effets vasodilatateurs, par la libération d'oxyde d'azote endothélial, par une action inotrope négative et par l'ouverture des canaux potassiques. **El Haouari et al. (2006)** ont mis en évidence l'action antiplaquettaire des flavonoïdes d'*U. dioica*.

Tahri et al. (2000) avaient observé l'effet hypotenseur d'extrait de feuilles d'*U. dioica* chez des rats. En revanche, l'extrait d'ortie n'a eu aucun effet sur la pression artérielle chez la souris, alors qu'il a induit un effet hypotenseur marqué et une bradycardie chez le chat (**Broncano et al., 1983; Lasheas, 1986**). Les résultats de **Qayyum et al. (2016)** indiquent que l'extrait méthanolique brut de l'*U. dioica* et ses fractions ont un effet hypotenseur expliqué par une vasorelaxation et un blocage des canaux calciques. Cet effet représente une base pharmacologique potentielle pour son utilisation médicinale dans la gestion de l'hypertension (**El Haouari et Rosado, 2019**).

I.3.1.4. Action anti-inflammatoire de l'ortie

Plusieurs essais d'études cliniques de l'effet anti-inflammatoire d'*U. dioica* ont été menés, mais, jusqu'à aujourd'hui, il n'existe aucune étude clinique prouvant formellement l'efficacité d'une préparation d'*U. dioica* comme anti-inflammatoire. La preuve de l'efficacité supposée repose uniquement sur une tendance à l'amélioration de l'état des patients, en particulier en complément du traitement par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme le Diclofenac (**Hansen et al., 1996; Wolf, 1998 ; Hubbe, 2002 ; Wolf et al., 2001**).

Wagner et al. (1994) ont démontré qu'une fraction polysaccharidique d'un extrait aqueux de racine d'ortie, contenant 4 polysaccharides différents inhibait le développement d'un œdème de patte de rat induit à un même degré que l'Indométacine. Cette activité anti-inflammatoire est probablement due à l'inhibition de la production de cyclooxygénase, lipoxygénase et de cytokine (**Capasso, 2003**).

Selon **Dhouibi et al. (2020)**, l'effet antiphlogistique d'*U. dioica* peut être dû à différentes actions :

- Action sur le métabolisme de l'acide arachidonique (**Obertreis et al., 1996; Barnes et al., 2002; ESCOP, 2003; Kavalali, 2003; Wichtl et Anton, 2003**)
- Action sur les cytokines pro-inflammatoires et PAF (Facteur d'activation des plaquettes) (**Obertreis et al., 1996; Barnes et al., 2002; ESCOP, 2003**).
- Action sur le facteur TNF kappa β (**Riehemann et al., 1999; Barnes et al., 2002; Ganber et Spiteller, 1995**)
- Action sur l'interleukine-2 et l'interféron- γ (**Barnes et al., 2002; ESCOP, 2003**).

I.3.1.5. Action antifongique

Il a été démontré que l'extrait de racines d'ortie avait une activité antifongique et antimicrobienne et qu'il agissait en synergie avec la chitinase en inhibant la croissance fongique. In vitro, l'extrait de racines d'ortie a inhibé la croissance de plusieurs champignons pathogènes et saprophytes contenant de la chitine (**Hadizadeh et al., 2009; Mikaeili et al., 2013**).

I. 3.1.6. Action antimicrobienne et antivirale

L'extrait de racines d'*U. dioica*, dans des études *in vitro*, s'est révélé être un inhibiteur puissant et sélectif de la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH (VIH-1 et VIH-2) du cytomégalovirus (CMV) et du virus respiratoire syncytial (RSV), (Gordts et al., 2015; Flores-Ocelotl et al., 2018). Kumaki et al. (2011) ont montré que l'efficacité de l'UDA (Urtica dioica Agglutinine) sur l'inhibition de la réplication de différentes souches de SRAS-CoV dans des cellules Vero 76 était de 90% à une concentration de $1.1 \pm 0.4 \mu\text{g/mL}$.

Diverses recherches ont montré que l'ortie provoque une activité antimicrobienne sélective. L'activité antimicrobienne d'un extrait d'acétate d'éthyle de feuilles d'ortie a été mise en évidence pour *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* (Brantner et Grein, 1994; Kelles et al., 2001).

Un extrait aqueux de feuilles d'ortie a provoqué une zone d'inhibition de 8 mm de diamètre ou plus contre *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri*, *S.aureus* et *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus*, *E. coli* et *Candida albicans*. Avec les mêmes préparations, aucune activité n'a été observée contre *Pseudomonas aeruginosa* (Gülcin et al., 2004) ou encore contre *Klebsiella pneumoniae* (Dostbil et al., 2005).

Dans les travaux de Turker et Usta (2008), l'extrait aqueux de feuilles d'*U. dioica*, a montré montré une activité inhibitrice significative ($P < 0,05$) contre *S. pyogenes*, *S. aureus* et *S. epidermidis*

I. 3.1.7. Action sur la glycémie

L'effet sur le niveau de glycémie de l'ortie a été rapporté dans des manuscrits datant de l'époque d'Avicenne. De nos jours, l'effet hypoglycémiant d'extraits d'ortie a été rapporté par plusieurs études parmi lesquelles, celle de Bnoulam et al. (2003) qui a attribué cet effet à une réduction de l'absorption intestinale du glucose ; ou encore celle de Patel et Udayabanu (2013) qui réparent l'hyperglycémie accompagnée de comportement dépressif et de dysfonctionnement cognitif induits par la dexaméthasone.

Par ailleurs, Golalipour et al. (2011) ont conclu que l'extrait hydroalcoolique des feuilles d'*U. dioica* administrées avant l'induction du diabète a un effet protecteur possible contre la détérioration des tubules séminifères histomorphométriques des rats rendus

diabétiques par la streptozotocine. **Qujeq et al. (2013)** indiquent que le pancréas de rats diabétiques présente des lésions du tissu pancréatique tandis que le pancréas de rats diabétiques traités avec des extraits alcooliques et aqueux de feuilles séchées d'*U. dioica* présente un réarrangement léger à modéré de ces cellules.

Selon les travaux de **Gohari et al. (2018)**, le traitement des rats diabétiques par *U. dioica* corrige l'hyperglycémie en rétablissant partiellement les taux d'insuline plasmatique. Les données trouvées suggèrent que l'*U. dioica* inhibe l'atrophie des îlots pancréatiques et / ou régénère les cellules β .

I.3.1.8. Activité immunomodulatrice d'*U. dioica*

L'activité immunostimulante de trois flavonoïdes glycosidiques (le quercétol-3-O-rutinoside, le kaempférol-3-O-rutinoside et l'isorhamnetol-3-O-glucoside) contenus dans les parties aériennes de l'ortie sur les neutrophiles a été mise en évidence par **Akbay et al. (2003)**. Ces flavonoïdes majeurs de l'ortie peuvent ainsi être utiles pour traiter des patients souffrant d'un déficit de la fonction neutrophile et de granulocytose chronique (**Akbay et al., 2003**).

I.3.1.9. Action analgésique et anesthésique locale

Dans une étude menée par **Tita et al. (1993)**, des souris recevant par voie orale des extraits d'ortie, à une dose de 1200 mg/kg résistent plus à la stimulation thermique dans le test «plaque chauffante» à 55 °C, mettant 190% de temps de plus à réagir par rapport aux rats témoins. Cet auteur suggère l'existence d'une activité analgésique périphérique des extraits d'ortie ; ce qui pourrait être une autre alternative thérapeutique pour soulager la douleur et minimiser l'utilisation de médicaments qui ont des effets secondaires à long terme selon **Dhouibi et al. (2017)**.

I.3.1.10. Action d'ortie sur l'appareil reproducteur masculin : l'hyperplasie bénigne de la prostate

L'efficacité des extraits de racines d'ortie dans le traitement des symptômes des voies urinaires dus à l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) n'a pas été pleinement démontrée. Les parties aériennes n'ont aucun effet sur la prostate mais ont une action diurétique (**Bruneton, 1999**). **Le Moal et Truffa-Bachi (1988)** ont montré que l'extrait d'ortie était capable de stimuler spécifiquement la prolifération des thymocytes et des lymphocytes T ; tandis que **Hryb et al. (1995)** ont confirmé l'effet d'extrait aqueux de racines d'ortie sur

l'inhibition de la liaison de la SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) avec son récepteur de la membrane prostatique humaine.

En 1995, **Ganber et Spiteller** ont mis en évidence les effets inhibiteurs de l'enzyme aromatasase (responsable de la biosynthèse des œstrogènes) pour plusieurs composés contenus dans des extraits méthanoliques de racines d'ortie ; alors que **Jalili et al. (2014)** ont soutenu la thèse selon laquelle l'extrait de racines d'*U. dioica* peut améliorer considérablement la spermatogenèse chez le rat. D'autre part, **Nahata et Dixit (2011)** ont conclu que l'extrait de racines d'*U. dioica* peut être utilisé comme candidat potentiel pour le traitement de l'HBP.

Par ailleurs, des effets natriurétiques et diurétiques ont également été constatés sous l'effet d'extrait de racines d'ortie ; ce qui implique une action sur la fonction rénale. Les résultats de **Sayhan et al. (2012)** suggèrent que l'administration d'extrait de racines d'*U. dioica* atténue les lésions rénales. Selon **Moradi et al. (2015)**, la racine d'ortie peut empêcher certains des effets de l'hyperplasie prostatique, de sorte que le pourcentage de cellules repliées dans le lobe ventral diminue de manière insignifiante.

I.3.1.11. Action sur le Cancer

Durak et al. (2004) ont testé les effets possibles de l'extrait aqueux de racines d'ortie sur l'activité de l'adénosine désaminase dans le tissu prostatique chez des patients atteints d'un cancer de la prostate et ont montré que cela entraînait une inhibition significative de l'adénosine désaminase (ADA) ; ce qui laissa ces auteurs penser que cet extrait de racines d'ortie renferme des composés à propriétés anti-cancer prostatique.

Celik et Tuluce (2007) ont montré que l'extrait aqueux de racines d'ortie possède un effet chimio-protecteur vis-à-vis des substances cancérigènes chez le rat. Les feuilles fraîches ont également montré une activité anti-tumorale *in vivo* et une forte activité antimutagène dans le test d'Ames (**Karakaya, 2000**). Les résultats de **Fattahi et al. (2018)** démontrent que les extraits de racines et de feuilles d'ortie induisent l'apoptose des cellules cancéreuses du sein.

I.3.2. Usage agricole

L'ortie est très utilisée en milieu agricole, elle est cultivée pour l'alimentation humaine et animale. Dans les jardins, sa présence stimule la croissance des végétaux voisins. On l'ajoute au composte pour activer la transformation de la matière organique (**Bertrand, 2010**).

L'incontournable purin d'ortie, employé depuis très longtemps, doit son appellation à l'odeur de putride qu'il dégage. Le purin est facile à préparer, il suffit de mélanger l'ortie et l'eau dans un rapport de 1:9 (P/V) et de laisser macérer de 5 à 30 jours selon la température. Après cette première étape de fermentation, la putréfaction commence. Après cela, le matériel végétal est séparé du liquide qui est stocké dans des récipients hermétiques. Le purin peut être conservé jusqu'à une année.

Le purin d'ortie est utilisé pour :

- stimuler la croissance des plantes;
- renforcer les plantes face aux maladies et aux invasions de parasites;
- lutter contre la chlorose des feuilles et les carences minérales;
- son action répulsive pour certains pucerons, acariens, carpocapses et limaces;
- ses propriétés insecticides et fongicides;
- la fertilisation: le purin dilué à 10% pour des plantes en végétation mais peut atteindre 20 % en épandage comme fumure de fond. Une concentration plus élevée aura une action désherbante (**Bertrand, 2010**).

Verdinelli et al. (2013) ont confirmé les effets répulsifs d'extraits aqueux de feuilles d'ortie sur les pucerons, en particulier de ceux obtenus à partir de feuilles car ils renferment des composés dérivés de l'acide caféique et de céramides.

I. 3.3. Usage alimentaire

L'ortie est utilisée depuis des siècles comme légume à feuilles pour les salades, les tartes, les soupes et le thé décocté (**Bisht et al., 2012; Guil-Guerrero et al., 2003; Orcic et al., 2014**). En plus de sa valeur nutritive élevée, elle contient des acides gras essentiels qui sont une importante source d'énergie.

Selon **Guil-Guerrero et al. (2003)**, les jeunes feuilles ont une valeur nutritionnelle plus élevée que les graines contenant des quantités plus élevées d'acides gras et de caroténoïdes.

Étant donné que l'ortie pousse à l'état sauvage et est appétissante pour les animaux, elle pourrait faire partie de leur alimentation. En période de pénurie de fourrage, par exemple pendant les deux guerres mondiales, l'ortie a été utilisée fraîche, séchée, moulue ou comme ensilage pour nourrir la volaille, le bétail, les chevaux et les porcs (**Vogl et Hartl, 2003**).

L'utilisation de la grande ortie comme fourrage a été étudiée avec des résultats prometteurs. Selon **Bisht et al. (2012)**, il est possible d'augmenter l'apport en vitamines de 60

à 70% et l'apport en protéines de 15 à 20% en ajoutant de l'ortie dans l'alimentation des volailles ; tandis que les besoins en aliments verts peuvent être réduits de 30%. Lorsque l'ortie remplace l'ensilage de ray-grass dans l'alimentation des vaches laitières, la santé du rumen est favorisée (**Humphries et Reynolds, 2010; Szewczuk et Mazur, 2004**).

I. 3.4. Usage textile

La grande ortie a longtemps été, et continue toujours d'être, utilisée pour la fabrication textile (**Delvaille, 2013**). Elle produit 6 à 8% de fibres, ce qui est moins que le chanvre ou la ramie (ortie de Chine). Il lui est attribué le surnom de « soie végétale ». La fibre d'ortie obtenue mesure entre 10 et 20 mm, et parfois jusqu'à 26mm (**Bertrand, 2010**) et renferme environ 86% de cellulose (**Bisht et al., 2012**).

Les fibres d'ortie sont situées entre l'épiderme et le noyau ligneux central, disposées en faisceaux maintenus ensemble avec des pectines. La fibre d'ortie est large et creuse et a un bon pouvoir d'absorption, des propriétés antistatiques, thermorégulatrices et de transpiration, une paroi cellulaire non lignifiée, des fibres douces et résistantes à faible poids spécifique (**Guo et al., 2005**).

Selon la façon dont elle est travaillée, différentes sortes de tissus sont obtenus à partir de la fibre d'ortie :

- un tissu aéré et léger : lorsque la fibre est tordue sur elle-même et l'air est expulsé du creux, elle s'apparente au coton ;
- un tissu proche de la laine : la fibre n'est pas tordue sur elle-même et l'air reste emprisonné dans son creux et sert d'isolant thermique. Ses capacités d'isolation sont mêmes supérieures aux tissus synthétiques (**Kremer, 2001**).

Pour certaines applications, telles que le remplacement des fibres de verre ou de carbone, en tant que composite dans l'industrie automobile, ou dans le remplacement des fibres d'amiante, les fibres d'ortie sont plus résistantes que la fibre de lin (**Guo et al., 2005**).

Chapitre II

Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Extraction des polyphénols

II.1.1. Zone de récolte du matériel végétal

Des plants frais entiers d'*U. dioica* en stade début de floraison ont été échantillonnés en Avril 2014 dans la localité de Mazagran, wilaya de Mostaganem (Latitude 35° 53' 44" Nord ; Longitude 0° 4' 17" Est et altitude 129m). L'identification botanique de la plante a été réalisée au sein du laboratoire d'écologie à l'université Ahmed Ben Bela Oran 1, Algérie ; un échantillon y est conservé (**spécimen voucher : O. 699 "Hariq"**).

II.1.2. Prétraitement du matériel végétal

Après la récolte, les parties aériennes (feuilles et inflorescences) sont soigneusement lavées à l'eau distillée afin d'éliminer tout corps étranger et ensuite essorées.

Trois prétraitements différents ont été testés dans le but de préserver et conserver les échantillons avant leur utilisation:

- Congélation à -4°C sous vide après broyage.
- Séchage à l'ombre pendant 7 jours, à l'abri de l'humidité et à une température ambiante puis conservés dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière et de l'humidité.
- Séchage à l'étuve à une température de 60°C pendant au moins 24h puis stockés dans des bocaux en verre à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité.

II.1.3. Solvants et protocole d'extraction

L'extraction a été réalisée selon deux méthodes utilisant deux solvants différents: le méthanol et le mélange eau/méthanol/acétate d'éthyle (10V/45V/45V) légèrement acidifié.

- **Extraction au méthanol pur**

L'extraction a été réalisée selon la méthode **Sujith et al. (2011)**. Un échantillon de 10 g de matériel végétal broyé est mélangé à 100 mL de méthanol. Le mélange a été maintenu sous agitation à l'obscurité dans un bain marie de 60 °C pendant 20 min avant d'être filtré. Trois répétitions sont ainsi réalisées. Les trois filtrats ont été combinés et le solvant a été éliminé à l'aide d'un rotavapor à 40 ° C. Cette opération a été répétée cinq fois.

- **Extraction eau/méthanol/acétate d'éthyle (10V/45V/45V) (EMAE)**

L'extraction a été réalisée selon la méthode **Mokhtar et al. (2014)**, avec quelques modifications. Deux macérations successives de 30 min à température ambiante sous agitation et à l'obscurité, ont été effectuées avec un rapport échantillon/ solvant (g/mL) égal à 10. Dans la première macération le solvant contient un mélange de méthanol et 0.05%(v/v) de HCl aqueux avec un rapport de 90/10 (v/v). L'extrait est ensuite filtré avec du papier Watman N° Z146374-100EA. Dans la deuxième macération, le méthanol est remplacé par l'acétate d'éthyle.

Les deux extraits obtenus sont combinés pour être évaporés à sec avec un évaporateur rotatif à une température réduite de 45°C.

II.1.4. Calcul du rendement de l'extraction des polyphénols

Le rendement de l'extraction est déterminé par le rapport entre la masse de l'extrait phénolique obtenu et la masse de la matière première végétale traitée. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = (M_1 / M_0) \times 100$$

R : rendement de l'extraction en %.

M₁ : masse en gramme de l'extrait phénolique obtenu.

M₀ : masse en gramme de la matière végétale initiale

II.1.5. Dosage colorimétrique des composés phénoliques

II.1.5.1. Dosage des composés phénoliques totaux (TPT)

Le contenu en polyphénols totaux à été déterminé pour les différents extraits :

- Extrait méthanolique des feuilles et inflorescences fraîches.
- Extrait méthanolique des feuilles et inflorescences sèches à température ambiante.
- Extrait méthanolique des feuilles et inflorescences séchées à l'étuve.
- Extrait EMAE des feuilles et inflorescences fraîches.
- Extrait EMAE des feuilles et inflorescences séchées à température ambiante.
- Extrait EMAE des feuilles et inflorescences sèches à l'étuve.

Le dosage colorimétrique a été réalisé selon la méthode décrite par **Singleton et al. (1999)** dans laquelle le réactif de Folin-Ciocalteu (qui est un acide de couleur jaune fait de mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique) est réduit en un mélange

d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène lors de l'oxydation des phénols. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité de phénols entrée en réaction.

Un volume de 0.1mL de chaque extrait est additionné à 4.9 mL d'eau distillée, ensuite 0.5mL du réactif Folin-Ciocalteu est ajouté. Après 3 min, 1mL de solution de carbonate de sodium à 20% (P/V) y est additionné avant de compléter le mélange à 10 mL avec de l'eau distillée. Le mélange est agité et incubé 30min à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 725 nm. Les teneurs en phénols totaux des extraits sont exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière végétale (mg EAG/g MV) ; par extrapolation sur une courbe d'étalonnage d'acide gallique.

II.1.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux (TFT)

Le dosage a été réalisé selon la méthode colorimétrique de Dowd adaptée par **Arvouet-Grand et al. (1994)**. 500 μ L de chaque extrait est mélangé avec 500 μ L de solution de chlorure d'aluminium $AlCl_3$ à 2% (P/V). Ce mélange est agité et incubé 10 min à température ambiante en obscurité. L'absorbance est mesurée à 415 nm. Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits sont déterminées par extrapolation sur une droite d'étalonnage de quercétine et exprimés en termes d'équivalent de quercétine par g de matière végétale (mg EQ/g MV).

II.1.5.3 Dosages des acides hydroxycinnamiques totaux (TAHCT)

Les acides hydroxycinnamiques (AHCT) ont été évalués selon la méthode de **Lamaison et al. (1990)**. L'extrait de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) a été solubilisé avec du méthanol aqueux à 50% (v/v). Un échantillon de 1mL a été ajouté à 1mL d'HCl 0.5N à 1mL de réactif d'Arnou (10g de nitrite de sodium + 10g de molybdate de sodium pour 100 mL d'eau) et 1mL de NaOH 1N, puis le tout complété à 10mL avec de l'eau distillée. Ce mélange réactionnel est agité pendant 1min et l'absorbance lue à 505 nm. Chaque solution a été comparée à un blanc. L'acide caféique a été utilisé pour préparer une courbe d'étalonnage et les résultats ont été exprimés en mg équivalents d'acide caféique par g de matière végétale (mg ECA/g MV).

II.1.6. Analyse chromatographique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO)

II.1.6.1. Identification des polyphénols de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) par HPLC-PDA-ESI-MS

L'identification des polyphénols d'EPFIO a été réalisée par HPLC-PDA-ESI-MS pour l'extrait qui a le taux le plus élevé en polyphénols, flavonoïdes et en acides hydroxycinnamiques.

Le principe de fractionnement des composés repose sur l'équilibre des concentrations des composés à séparer entre deux phases en contact : la phase stationnaire (colonne chromatographique composée de grains solides très fins) et la phase mobile (éluant liquide) qui se déplace. La séparation est basée sur la rétention différente des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps variables et liés à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure etc.) et à leur affinité respective pour la phase stationnaire et pour la phase mobile. A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur (ultra-violet ou infra rouge) mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

- L'appareillage HPLC utilisé:

Il s'agit d'un appareil HPLC ThermoFinnigan Surveyor équipé d'un auto-échantillonneur Finnigan (Surveyor autosampler Plus) et d'une pompe quaternaire Finnigan (Surveyor LC pump Plus), d'un détecteur à réseau de photodiodes UV-Vis Surveyor (PDA) et d'un spectromètre de masse à piège à ions LCQ Advantage Max (tous de Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), couplé à une source d'ionisation par électrospray (ESI). Les polyphénols ont été identifiés selon le temps de rétention, le système de détection PDA, la spectrométrie de masse et la littérature.

- La phase stationnaire

Les performances de la séparation chromatographique sont reliées à la nature de sa phase stationnaire, à sa longueur, à son diamètre et à la taille de ses particules.

Dans la présente étude, la séparation a été effectuée sur un Gemini C18 110 Å (150x2 mm, 5 µm) équipé d'une colonne ultra cartridge C18 peptide security Guard (Torrance, CA, USA).

- La phase mobile

La phase mobile joue un rôle important sur la séparation et affecte l'ionisation des molécules et de ce fait la sensibilité du détecteur. La phase mobile utilisée est constituée d'eau (A) et de méthanol (B); acidifiés séparément avec 0.075% (V/V) d'acide formique.

- Les conditions chromatographiques

La composition de la phase mobile varie au cours du temps selon le gradient d'éluion suivant: 2% du solvant B pendant les 5 premières minutes, puis gradient linéaire du solvant B de 2 à 100% durant les 115 minutes suivantes.

Le débit est de 1mL /min et le volume d'injection était de 5µL. Le chromatogramme a été enregistré à $\lambda = 280$ nm et les données spectrales ont été recueillies dans la plage de 200 à 800 nm pour tous les pics.

Les données HPLC-ESI-MS / MS ont été acquises en modes d'ionisation positive et négative, à l'aide du système de traitement Xcalibur (2.0 SR₂, thermo fisher, scientific, wathman, MA, USA).

II.1.6.2. Quantification des différents composés phénoliques de l'EPFIO

La quantification de chaque composé phénolique présent dans l'EPFIO a été effectuée à l'aide des équations de régression des courbes d'étalonnages des standards (acide gallique, acide chlorogénique, acide cinnamique, acide férulique, acide caféique, daphnétine, apigénine, lutéoline, quercétine, kaempférol, Naringine, rutine, coumarine, vanilline et catéchine) élués dans les mêmes conditions chromatographiques préalablement décrites pour les échantillons.

II.2. Méthodes d'étude des activités biologiques de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO)

II.2.1. Les expériences *in vitro*

II.2.1.1. Mise en évidence et évaluation de l'activité antimicrobienne de l'EPFIO.

II.2.1.1.1. Nature et origine des microorganismes utilisés

- les souches bénéfiques

Deux souches bénéfiques ont été utilisées, il s'agit de:

Bifidobacterium animalis subsp *lactis* Bb12 provient d'un laboratoire partenaire français : UR 910 écologie et physiologie des systèmes digestif INRA 78352 Jouy-en-Josas, France.

Lactobacillus rhamnosus LbRE-LSAS, une souche expérimentale isolée dans le laboratoire LMBAFS (Laboratoire de Microorganismes Bénéfiques, Aliments Fonctionnels et de la Santé) à partir de selles de nourrissons allaités exclusivement au sein et ne recevant aucune antibiothérapie, cette souche a été identifiée génétiquement.

- Les souches pathogènes

Les souches appartiennent toutes à la collection américaine ATCC (American Type Culture Collection) et il s'agit de :

Staphylococcus aureus (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Salmonella typhimurium* (ATCC 13311), *Bacillus cerus* (ATCC 10876), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus hirae* (ATCC 10541), *Proteus mirabilis* (ATCC 13315), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883). Une levure pathogène *Candida albicans* (ATCC 10231) a aussi été utilisée.

II.2.1.1.2. Conditions de culture des souches

La mise en culture des bactéries pathogènes nécessite un milieu liquide « Bouillon cœur cervelle » BHI, utilisé comme milieu d'enrichissement. Le test du pouvoir antimicrobien est réalisé sur le milieu solide Mueller Hinton. La détermination de la concentration minimale inhibitrice est réalisée avec le milieu liquide Mueller Hinton. Leur incubation se fait à 37°C en aérobiose sur milieu solide ou liquide.

Pour les souches bénéfiques LbRE-LSAS et Bb12, le milieu MRS à pH 6.5 a été utilisé sous forme de bouillon pour leur culture et sous forme gélosé pour le test de l'activité antimicrobienne.

Etant donné que les bifidobactéries ne tolèrent pas l'oxygène, leur culture nécessite l'addition de cystéine chlorhydrique Cys-Hcl à 0.05% au milieu (Scardovi, 1986). Les conditions d'anaérobiose sont assurées par l'utilisation de jarres d'anaérobiose. La souche LbRE-LSAS est une bactérie anaérobie facultative, elle est incubée à 37°C en aérobiose sur milieu solide ou liquide. Le milieu Sabouraud Dextrose Agar a été utilisé pour la levure *Candida albicans*.

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 min.

II.2.1.1.3. Mise en évidence du pouvoir antimicrobien de l'EPFIO par la méthode de diffusion sur gélose

L'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) à une concentration de 200 mg/mL de DMSO (diméthylsulfoxyde) à 10% a été utilisé pour la détermination de l'activité antimicrobienne, en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé décrite par l'Institute of Clinical Laboratory Standards (2008).

La pré-culture des souches utilisées a été préparée 16h à l'avance et les cultures bactériennes ont été ajustées à une concentration de 10^8 UFC / mL etensemencées dans 20mL

de milieu de culture. Après 15 min de repos, les disques stériles imprégnés de 10 μ L d'EPFIO ont été déposés sur le milieu.

Des antibiotiques ont été utilisés comme contrôle positif, la vancomycine (VA-oxoid CT0058B, US) et la gentamicine (CN-oxoid CT0072B, US) (30 μ g / mL) ainsi qu'un agent antifongique, le miconazole (40 μ g/mL). Le contrôle négatif était un disque imbibé de DMSO. Les boîtes ont été incubées après 30 min à 37 ° C pendant 24 h, et les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

II.2.1.1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'EPFIO

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des échantillons d'EPFIO testés a été déterminée par la méthode de microdilution en bouillon (CLSI, 2009) à l'aide d'une microplaque à 96 puits. Chaque puits reçoit 100 μ L de suspension bactérienne (10⁵ CFU / mL) et 100 μ L d'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) à différentes dilutions (de 0.009 à 20 mg / mL). La CMI a été définie comme la concentration la plus faible à laquelle aucune croissance bactérienne n'a été observée après incubation à 37 ° C pendant 24 heures. Après chaque détermination de CMI, le contenu du puits de CMI est ensemencés sur milieu solide Mueller Hinton et incubé à 37 ° C pendant 16h pour évaluer l'effet bactérien de l'EPFIO: bactéricide lorsqu'aucune croissance visible n'est observée et bactériostatique lorsqu'il y a formation de colonies.

II.2.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante d'extraits phénoliques de feuilles et d'inflorescence d'ortie (EPFIO)

II.2.1.2.1. Détermination de la capacité antioxydante de l'EPFIO en équivalents Trolox (TEAC : Trolox Equivalent Antioxydant Capacity)

Dans ce test développé par Rice-Evans et Miller (1994) et modifiée par Re et al. (1999), l'activité antioxydante est estimée par la capacité d'un composé à piéger le radical ABTS^{o+} obtenu à partir de l'ABTS [sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis- (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)] par rapport à l'activité d'un standard qui est le Trolox (acide 6- hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E.

Le cation radicalaire ABTS^{o+} est généré en mélangeant une solution d'ABTS à 7 mM/L avec une solution de persulfate de potassium à 2.4 mM /L dans un rapport 5v/1v et laissé à l'obscurité pendant 12 à 16h à température ambiante. Ensuite, ce mélange est dilué avec du méthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0.70 \pm 0.02 à 734 nm.

Un volume de 20 μL d'EPFIO testé ou de l'étalon à différentes concentrations a été ajouté à 2 mL de solution ABTS^{o+} et l'absorbance a été mesurée à 734 nm après 6 min contre un blanc. L'acide ascorbique et la quercétine ont été utilisés comme témoins positifs.

Une courbe d'étalonnage de trolox est réalisée. Pour cela une gamme de concentrations entre 0 et 250 μM /L de trolox est préparée. Les résultats sont exprimés en mM d'équivalent Trolox par gramme d'échantillon.

II.2.1.2.2. Mesure du pouvoir réducteur du fer ferrique ou « Ferric Reducing Antioxydant Power ou FRAP»

Le pouvoir réducteur de l'EPFIO a été déterminé par la méthode FRAP qui consiste à mesurer la capacité d'un échantillon à réduire le complexe ferrique tripyridyltriazine (TPTZ) en tripyridyltriazine ferreux à un faible pH. Ce complexe de tripyridyltriazine ferreux a une couleur bleue dont l'intensité est mesurée à 593nm (**Benzie et Strain, 1996**).

Le réactif FRAP utilisé a été préparé en mélangeant 25 mL de tampon acétate de sodium à 300 mM (pH 3.6), 2.5 mL de TPTZ à 10 mM (2,4,6-tri (2-pyridyl) -s-triazine) dissous dans du HCl 40 mM, et 2.5 mL de chlorure ferrique (FeCl_3) à 20 mM dans un rapport 10V/1V/1V.

Un volume de 1.5 mL du réactif FRAP a ensuite été mélangé avec 70 μL d'EPFIO et incubé à 25°C pendant 5 min. L'absorbance a été mesurée à 593 nm contre le blanc (le réactif FRAP). La quercétine et l'acide ascorbique ont été utilisés comme témoins positifs.

Les résultats ont été obtenus par extrapolation sur une courbe d'étalonnage de sulfate de fer (FeSO_4) et exprimés en millimoles de Fe^{2+} par gramme d'extrait d'EPFIO (mM Fe^{2+} / g d'EPFIO) en utilisant une courbe d'étalonnage, qui a été obtenue en utilisant des solutions de FeSO_4 .

II.2.1.2.3. Méthode de piégeage du radical libre, le 2, 2-diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH°)

La capacité des polyphénols d'*U dioica* à piéger le radical 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH°), a été évaluée selon la méthode de **Yang et al. (2008)**. Le diphényl picryl-hydrazyle (DPPH) est un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényl picryl-hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la

capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons) (Sanchez-Moreno, 2002). On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où (AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune).

Un millilitre de la solution méthanolique de l'EPFIO à différentes concentrations a été ajouté à 3 mL d'une solution méthanolique de DPPH à 0.1 mM/ L. Après 20 min d'incubation à 27°C, l'absorbance a été mesurée à 517 nm contre un témoin. L'acide ascorbique et la quercétine ont été utilisés comme antioxydants de référence.

Le pourcentage de piégeage du radical DPPH a été calculé comme suit:

$$\text{Taux (\%)} \text{ d'activité antiradicalaire} = [1 - (\text{Abs EPFIO} / \text{Abs témoin})] \times 100$$

Les valeurs d'IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%) ont été déterminées à partir des courbes de l'activité d'inhibition des radicaux DPPH en fonction des concentrations de l'extrait par la méthode de régression. Ces valeurs sont exprimées en mg /mL.

II.2.1.2.4. Détermination du niveau d'inhibition du blanchiment du β-carotène

Dans le test du blanchiment du β-carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β-carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système d'émulsion aqueuse en aboutissant à la dégradation du β-carotène (Unten et al., 1997). La présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du β-carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système.

Le test a été réalisé selon la méthode de Yu et al. (2006). Un mélange de 0.5 mg de β-carotène a été dissous dans 1mL de chloroforme et mélangé à 25μL d'acide linoléique et 200μg de Tween-20. Le chloroforme a été éliminé sous vide à 50°C, puis 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés lentement sous agitation vigoureuse pour former une émulsion dont 5 mL ont été ajoutés à un tube contenant 1mL de la solution antioxydante (extrait EPFIO, quercétine ou acide ascorbique) à différentes concentrations.

L'absorbance a été immédiatement mesurée à 470 nm, ensuite les tubes ont été placés dans un bain marie à 50 ° C et l'absorbance a été mesurée à 120 minutes. L'activité antioxydante a été évaluée à l'aide de la formule suivante:

$$AA\% = [1 - (A_o - A_t) / (A_{c_o} - A_{c_t})] \times 100$$

Où AA est l'activité antioxydante, A_o l'absorbance initiale, A_t l'absorbance après 120 min, A_{c_o} l'absorbance initiale du témoin et A_{c_t} l'absorbance du témoin après un temps de 120 min.

La valeur IC₅₀ est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée à partir de la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait. Ces valeurs sont exprimées en mg/mL.

II.2.1.3. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'EPFIO

II.2.1.3.1. Test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine

Le principe de cette méthode se résume à inhiber la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA) selon le protocole de **Jagtap et al. (2011)**. Le Diclofenac de sodium est utilisé à différentes concentrations comme anti-inflammatoire standard.

Des solutions de différentes concentrations (50, 100, 250, 500 et 1000µg/mL) de l'EPFIO et de l'anti-inflammatoire standard, le Diclofenac de sodium, ont été utilisées dans la conduite de ce test. La procédure consiste à mélanger 1mL de chacune des solutions EPFIO et Diclofenac de sodium avec 1mL de la BSA à 1mM dans du tampon phosphate (0.2M et pH = 7,4). L'ensemble est incubé 15mn à une température de 27±1°C, puis placé au bain marie à 60±1°C pendant 10 min, l'absorbance est mesurée à 660nm.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine a été calculé comme suit :

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 - (V_t - V_c / V_c) * 100$$

V_t : absorbance d'EPFIO ou du standard.

V_c : absorbance du contrôle.

II.2.1.3.2. Test de stabilité de la membrane des globules rouges humains vis-à-vis de l'hémolyse

Selon le protocole de **Shinde et al. (1989)**, le principe de ce test consiste à stabiliser la membrane de globule rouge vis-à-vis de l'hémolyse induite par une solution hypotonique.

Pour cela, du sang humain prélevé sur des volontaires sains et consentants est récupéré dans des tubes contenant un volume égale de solution d'Alsever stérilisée (2% de dextrose, 0.8% de citrate de sodium, 0.05% d'acide citrique et 0.42% de chlorure de sodium dans 100 mL d'eau distillée) puis centrifugé à 3000 tours/ min pendant 20 min. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est rincé avec une solution isosaline à 0.85% (P/V) et pH =7.4.

Un volume de 0.5mL d'extrait EPFIO ou de l'anti inflammatoire standard, le diclofénac, à différentes concentrations 50 µg /mL, 100 µg/mL, 200 µg /mL, 500 µg /mL, 800 µg /mL, 1000 µg/mL) est mélangé avec 1mL de tampon phosphate (0.15M, pH 7.4) et 2mL de la solution hyossaline (0.36% de NaCl) ainsi que 0.25mL de suspension des globules rouges.

Ce mélange est incubé 30min à 37°C, laissé refroidir pendant 20min, puis centrifugé à 3000 tours /min pendant 20 min. L'absorbance des surnageants récupérés est mesurée à 560nm.

Le pourcentage de stabilisation de la membrane du globule rouge contre l'hémolyse est déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de stabilisation} = 100 - [(A1 (\text{échantillon/ standard}) / A0 (\text{contrôle}) * 100]$$

A0 : est l'absorbance de la réaction contrôle.

A1 : est l'absorbance en présence de l'échantillon ou le standard (diclofenac)

II.2.1.4. Méthode d'évaluation de la neurotoxicité d'extraits phénoliques d'ortie

Pour déterminer un éventuel effet toxique de l'extrait étudié sur les cellules neuronales cancéreuses CAD (ou cath.a), un test de viabilité cellulaire appelé aussi le test du MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium bromide] est réalisé.

II.2.1.4.1. Nature, origine et culture de la lignée cellulaire neuronale tumorale utilisée

Des lignées de cellules catécholaminergiques du système nerveux central, Cath.a, sont obtenues par oncogénèse ciblée chez des souris transgéniques, portant un antigène de type sauvage SV40T sous contrôle transcriptionnel du promoteur tyrosine hydroxylase de rats (Suri et al., 1993). Le dépositaire et l'auteur est le Dr D. Chikaraishi, du département de neurobiologie, Centre médical de l'Université Duke, Durham, Caroline du Nord, États-Unis.

La culture des cellules CAD et les expériences ont été réalisées dans des installations de CL1 dans des conditions stériles. Des cellules CAD ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂

sur des flacons de culture tissulaire de 75cm² (T75) (Sarstedt, Newton, NC), dans un milieu spécifique commercialisé sous l'étiquette « Dulbecco's modified eagles' medium DMEM/F-12 Media - GlutaMAX™-I » (GIBCO, Grand Island, New York, USA), additionné de 10% de sérum fœtal bovin (FBS, Sigma, St. Louis, Missouri, USA).

Les cellules ont été soumises à un passage tous les 6 à 7 jours à une dilution de 1/4. Les cellules CAD se différencient pour former des axons neuronaux dans des conditions sans sérum. Pour induire une différenciation morphologique, les cellules ont été transférées sur le même milieu sans supplément de sérum après 12-24 h.

Une fois les cellules CAD deviennent confluentes à 80% à peu près dans les flacons de culture, on jette le milieu de culture d'origine, puis on rajoute 10 mL de nouveau milieu spécifique « Dulbecco's modified eagles' medium DMEM/F-12 Media-GlutaMAX™- I » additionné de 10% de sérum fœtal bovin dans chaque flacon.

On déloge les cellules, adhérant aux parois des flacons, par un pipetage doux en aspirant et en injectant doucement le milieu de culture, pendant 3 minutes, pour ne pas détruire les cellules. Le contenu de chaque flacon est récupéré et centrifugé à 1000 tours/min pendant 5 min pour récupérer le culot de cellules et éliminer le surnageant. 5mL du milieu spécifique DMEM/F-12 est ajouté au culot de cellules et c'est à partir de cette suspension que les dilutions désirées pouvaient alors être préparées.

II.2.1.4.2. Procédure opératoire

La viabilité des cellules neuronales cancéreuses CAD a été déterminée en utilisant le test MTT [3- (4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium bromide], basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium par les déshydrogénases mitochondriales dans les cellules viables. Les cellules CAD ont été placées dans une plaque de culture tissulaire à 24 puits. Une série de concentrations d'extraits EPFIO ont été préparées (1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001 mg /mL) en utilisant 10 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO) comme diluant initial, puis en complétant avec de l'eau distillée. Les dilutions sont ensuite injectées dans la plaque à 24 puits et incubées à 37 °C (sous atmosphère 5% de CO₂).

Après 24 heures de traitement, 50 µL de solution tampon de phosphate (PBS à pH 7.4) contenant 5 mg/mL de MTT ont été ajoutés à chaque puits et incubés à 37°C (sous atmosphère 5% de CO₂) pendant 2 heures et demie. Ensuite, le contenu de chaque puits est placé dans un tube Eppendorf et centrifugé pendant 10 min à 13 000 trs /min, le surnageant est éliminé (le milieu contenant du MTT). En dernier, 250 µL d'isopropanol ont été ajoutés au

culot de chaque eppendorf et bien agité. La densité optique d'échantillons de 100 μ L a été déterminée par spectrophotométrie à 596 nm (ThermoLabsystems Multiskan Ascent, V1.3).

La viabilité cellulaire relative a été déterminée par la quantité de MTT convertie en sel de formazan insoluble par rapport au témoin (traité au PBS). La réduction de la viabilité des cellules a été déterminée par réduction de l'absorbance des échantillons à diverses concentrations par rapport au témoin non traité (100% viables). Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm écart type (ET) pour 5 répétitions pour chaque échantillon préparé.

II.2.2. Les expériences in vivo

II.2.2.1. Les animaux d'expérience et conditions d'élevage

Des rats mâles et femelles Wistar pesant entre 150g et 200g ont été utilisés dans la présente expérimentation. Les rats ont été fournis par l'institut Pasteur d'Algérie. Ces animaux ont été placés dans des cages métaboliques de manière aléatoire au niveau de l'animalerie afin de former 7 lots à raison de 4 rats (2 mâles et 2 femelles) par lot dans le cas de l'étude toxicologique et de 6 rats mâles par lot dans le cas de l'étude de l'activité analgésique, antipyrétique et antiinflammatoire. Les rats ont été maintenus à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité et ont bénéficié d'une période d'adaptation de 15 jours avant leur utilisation où ils ont reçu la nourriture (croquettes provenant de la société de production des aliments pour animaux, Bouzaréa, Alger) et l'eau de robinet à volonté (Figure 2). Le protocole est conforme aux lignes directrices du National Institute of Health (NIH-USA) qui impose l'utilisation d'animaux mâles et femelles pour mener une étude toxicologique.



Figure 2 : les rats Wistar en élevage

II.2.2.2. Détermination de la toxicité aigüe d'extraits phénoliques de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar

II.2.2.2.1. Mode opératoire

Après 16 heures de jeûne, six lots de 4 rats (2 mâles et 2 femelles) ont reçu par voie orale 500, 1000, 1500, 2000 mg d'EPFIO/kg de poids corporel ; le septième lot a été utilisé comme témoin recevant de l'eau distillée, à raison de 10 ml/kg (**Ouédraogo et al., 2012**).

II.2.2.2.2. Détermination de la dose létale 50 (DL₅₀)

Une observation comportementale a été réalisée 3h après l'administration de l'extrait EPFIO. Ensuite une hydratation et une alimentation ont été effectuées de façon quotidienne pendant 14 jours. Pendant cette période, les signes de toxicité notamment la modification du pelage, la motilité, les tremblements, le poids, l'aspect des selles, la mobilité ainsi que le décès ont été notés (**Ouédraogo et al., 2012**). La DL₅₀ est la dose d'extrait qui causerait la mort de 50% des rats. Elle est calculée selon la méthode de Karber et Behrens (**Turner, 1965**) en utilisant la formule:

$$\text{Dose létale } 50 = DL_{50} = DL_{100} - (\sum ab / n)$$

DL₁₀₀ : dose létale 100

a : différence entre deux doses successives.

b : moyenne de morts entre deux doses successives.

n : nombre moyen d'animaux par lot.

II.2.2.3. Détermination de l'activité analgésique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar

L'activité analgésique périphérique de l'EPFIO a été déterminée par deux méthodes : le test du writhing et le test à la formaline réalisés chez des rats mâles.

II.2.2.3.1. Test du writhing : constriction abdominale

II.2.2.3.1.1. Procédure d'induction de la douleur

Selon la méthode de **Koster et al. (1959)**, la procédure consiste à induire une action algogène par injection *intrapéritonéale* d'une dose de 10mL d'acide acétique 1% (V/V)/Kg poids corporel à des rats mâles. Cette injection provoque une sensation de douleur qui se manifeste chez le rat par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale, appelés crampes abdominales. Pour cela, 6 lots de 5 rats mâles ont été préparés et mis à jeun 16 h au préalable.

Une heure avant l'induction de la douleur, les lots de rats ont reçu les traitements suivants par voie orale à une dose de 10 mL/kg poids corporel:

Lot 1 (témoin négatif) : l'eau distillée.

Lot 2 (témoin positif) : l'aspirine (10mg/kg).

Lot 3, 4 et 5 : respectivement 100, 200 et 300 mg d'EPFIO/kg poids corporel

Lot 6 (lot de référence) : aucun traitement.

II.2.2.3.1.2. Procédure de suivi et d'évaluation de l'activité analgésique

Le dénombrement des crampes par observation du comportement des rats débute cinq minutes après l'injection de l'acide acétique, le nombre de contorsion a été compté chez chaque rat durant 15 minutes.

L'effet analgésique a été estimé par le pourcentage d'inhibition des crampes, selon la formule suivante (**Chaturvedi et al., 2012**):

$$\% \text{ inhibition} = (1 - W_t / W_b) \times 100$$

W_b représente la moyenne du nombre de contorsions des rats du lot témoin

W_t est la moyenne du nombre de contorsion des rats du lot traité.

II.2.2.3.2. Test à la formaline

II.2.2.3.2.1. Procédure d'induction de la douleur

Ce test est réalisé selon le protocole de **Hunnskaar et Hole (1987)**. La méthode utilisée dans cette étude est similaire à celle décrite dans la précédente étude (constriction abdominale). La douleur a été induite chez des rats mâles par l'injection de 20 μ L de la solution de formaline à 5% (V/V) dans la patte arrière droite. Six lots de cinq rats ont été préparés et ont reçu par voie orale, une heure avant l'injection de la formaline, les traitements suivants avec un volume de 10 mL /Kg p.c.:

Lot 1 (témoin négatif) : l'eau distillée.

Lot 2 (témoin positif): l'indométacine (10 mg/kg).

Lot 3, 4 et 5: respectivement 100, 200 et 300 mg/kg d'extrait EPFIO.

Lot 6 (lot de référence) : aucun traitement.

II.2.2.3.2.2. Procédure de suivi et d'estimation de l'activité analgésique

II.2.2.3.2.2.1. Estimation du temps de lèchement de la patte

Le temps enregistré durant le lèchement de la patte est indicateur de la douleur.

Immédiatement après l'injection de la solution de formaline, le temps de léchage de la patte traitée a été compté pendant les cinq premières minutes (première phase appelée la douleur neurogène). Ensuite, le temps de léchage est compté une deuxième fois entre 15 et 30 min (deuxième phase appelée la douleur inflammatoire)

II.2.2.3.2.2.2. Pourcentage de protection

Dans ce test, l'activité analgésique est estimée par le pourcentage de protection contre la douleur selon la formule suivante (**Hunskar et Hole, 1987**):

$$\% \text{ de protection} = (1 - T_c / T_t) \times 100$$

T_t = temps moyen de léchement chez le lot témoin.

T_c = temps moyen de léchement chez le lot traité.

II.2.2.4. Détermination de l'activité antipyrétique de l'EPFIO chez le rat Wistar

L'activité antipyrétique de l'extrait phénolique a été réalisée par la méthode de pyrexie induite par la levure de bière selon la méthodologie adaptée de **Sawadogo et al. (2006)**. Des rats mâles-ont été répartis au hasard en cinq groupes (n = 6). La température rectale initiale de chaque rat a été mesurée à l'aide d'un thermomètre numérique. Ensuite, les rats ont reçu par voie sous cutanée, dans la région dorsolatérale, une suspension aqueuse à 20% (P/V) de levure de bière à une dose de 20 mL/ kg poids corporel.

Après 18 h, la température rectale a été mesurée à nouveau et les animaux qui présentaient une augmentation de la température rectale basale supérieure ou égale à 0.5 °C ont été sélectionnés pour le test. Les lots ont été homogénéisés quant au niveau de l'hyperthermie.

Les différents lots ont reçu, par voie orale, les traitements suivants avec un volume de 10mL /Kg poids corporel:

Lot 1 témoin : l'eau distillée.

Lot 2 de référence : paracétamol (10mg/kg).

Lot 3, 4 et 5 : respectivement 100, 200 et 300 mg/kg d'extrait EPFIO.

L'évolution des températures rectales est suivie par des mesures chaque 1h pendant 6 heures après l'administration des échantillons, à l'aide d'un thermomètre numérique lubrifié.

II.2.2.5. Méthode d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'EPFIO chez le rat Wistar

II.2.2.5.1. Procédure d'induction de l'inflammation (œdème) par la carragénine

Le test est effectué selon la méthode de **Winter (1962)** ; selon laquelle, une injection de carragénine sous la voûte plantaire de la patte arrière droite du rat provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par des substances anti-inflammatoires.

Cette réaction se traduit par un œdème dont la mesure du volume permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire.

Les rats mâles ont été mis à jeûn 16 heures avant l'expérimentation et le volume initial (V₀) de la patte arrière droite et gauche ont été mesurés.

Les rats ont reçus les traitements suivants par voie intra-péritonéale (*ip*) (fig. 3) avec un volume de (10 mL/Kg):

- **Lot 1 (lot de référence)** : aucun inducteur d'inflammation et aucun traitement.
- **Lot 2 (témoin positif)**: la solution véhicule (l'eau physiologie);
- **Lot 3 (témoin négatif)** : un anti-inflammatoire utilisé en thérapeutique qui est le diclofenac (10 mg/kg) ;
- **Lot 4,5,6,7** : ces quatre lots de rats reçoivent respectivement 100, 150, 200 et 250 mg d'extrait EPFIO / kg poids corporel.

Une heure après, les rats de chaque lot ont subit une injection de 100µL d'eau physiologique dans la voûte plantaire de la patte gauche du rat et de 100µL de carragénine 1% (P/V) en même temps dans la voûte plantaire droite du même rat.



Figure 3 : injection par voie intra-péritonéale (*ip*) des traitements.

II.2.2.5.2. procédure de suivi de l'évolution de l'œdème

Pour suivre l'évolution de l'œdème, on a mesuré les deux pattes grâce à un vernier caliper : une patte traitée P(t) et une autre non traitée P(nt), et ceci à 1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 6h après l'injection de la carragénine (fig. 4). Ces valeurs seront corrigées en tenant compte de la valeur (d) mesurée à 1h avant l'injection de la carragénine. Cette valeur (d) représente la différence anatomique entre les deux pattes (**Chatter Riahi et al., 2012**):

$$d = p(t) - p(nt)$$

p(t) : patte droite traitée.

p(nt) : patte droite non traitée.

La moyenne des valeurs obtenues pour chaque lot à un temps donné sera déterminée selon la formule (1). Le pourcentage d'inhibition de l'œdème (**PIO**) permet d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de l'extrait EPFIO et de le comparer à celui du produit de lot témoin ; le PIO a été calculé selon la formule (2) (**Chatter Riahi et al., 2012**):

$$M = (D - d) = [\Sigma (D - d) / n] \quad (1)$$

$$PIO \% = [M (D - d) \text{ témoin} - M (D - d) \text{ essai}] / M (D - d) \text{ témoin} * 100 \quad (2)$$

M : moyenne des valeurs obtenues.

D : différence entre la patte traitée et la patte non traitée à un temps donné.

d : différence anatomique entre les deux pattes.

n : nombre de rats pour chaque lot.



Figure 4: mesure de l'œdème à l'aide d'un vernier caliper.

II.2.2.5.3. Prélèvement sanguin et dosage des marqueurs de l'inflammation

Après les 6 heures de l'expérimentation et afin d'éviter tout risque de changement des paramètres biochimiques par application d'une anesthésie générale, les rats ont été maintenus sous une légère anesthésie de chloroforme et sacrifiés juste avant la collecte des échantillons de sang. Le sang est prélevé par ponction au niveau de l'aorte jugulaire pour le dosage des marqueurs de l'inflammation.

II.2.2.5.3.1. Dosage de la C-Protéine Réactive (CRP) et de l'albumine

La protéine C-réactive et l'albumine sont des protéines de la phase aigue qui apparaissent dans le sang lors des processus inflammatoires. Les modifications du taux des protéines de la réponse inflammatoires peuvent avoir une grande valeur indicative (**Fablet et Madec, 2009**).

Le sang prélevé sur les rats est centrifugé à 2500 tr/min pendant 15 minutes, le sérum est ensuite récupéré. Les protéines ont été dosées par des méthodes immunoturbidimétrique quantitative et spectrophotométrique réalisées au niveau d'un laboratoire d'hématologie privé en utilisant un analyseur automate et un analyseur de biochimie.

II.2.2.5.3.2. Formulation et Numération Sanguine (FNS)

Le sang prélevé est récupéré dans des tubes EDTA pour réaliser une NFS ou hémogramme qui est définit comme étant l'étude cytologique quantitative et qualitative du sang circulant.

Cette analyse a aussi été réalisée dans un laboratoire d'hématologie privé, laboratoire de Dr ATTOU (spécialiste en hématologie).

II.2.2.5.4. Examen histologique des pattes de rats traités

Les pattes de chaque lot de rats sont prélevées et fixées par immersion dans une solution de formaldéhyde à 10% (V/V) pendant 72 heures ; ensuite les tissus fixés ont été incorporés dans de la paraffine pour réaliser des coupes de 3 et 5µm avec un microtome. Ces coupes ont été montées sur des lames de verre et colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine pour une analyse en microscopie optique.

L'ensemble de la manipulation a été réalisée au laboratoire d'histologie vétérinaire de l'institut Pasteur d'Alger.

III.3. Analyse statistique

Chaque protocole de cette étude a été répété cinq fois. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel IBM SPSS version 26.0. Les résultats sont exprimés sous forme de

moyennes \pm écart type et les différences entre les moyennes ont été évaluées à l'aide d'une ANOVA (analyse de la variance univarié) ou une MANOVA (analyse de la variance multivariée) suivi du test Post hoc de Tukey. Afin de caractériser la relation entre les capacités antioxydantes détectées par différents tests et les teneurs totales en phénols, acides hydroxycinnamiques et flavonoïdes ; Les résultats ont été évalués en utilisant les coefficients de corrélation de Pearson. La différence était considérée comme significative à $P < 0,05$ hautement significative à $P < 0,01$ et hautement significative à $P < 0,001$.

Chapitre III

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Extraction des polyphénols

L'effet thérapeutique de nombreuses espèces végétales est souvent attribué à la présence de composés phénoliques dans leurs tissus (Vajic et al., 2015; 2018). Cela justifie l'intérêt croissant en recherche, à l'égard de ces substances. C'est dans ce contexte que cette étude a été entreprise en choisissant l'ortie, *Urtica dioica*, comme source potentielle en polyphénols responsables en partie des vertus qui lui sont imputées. C'est ainsi que différentes extractions de composés phénoliques à partir des parties aériennes (feuilles et inflorescences), fraîches et sèches, d'*U. dioica* ont été réalisées.

III.1.1. Rendement de l'extraction

Les rendements des différents extraits sont définis comme étant les rapports de la quantité de substances végétales extraites sur la quantité de matière végétale utilisée. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Une différence hautement significative (ANOVA, $P < 0.01$) entre les différents extraits vis-à-vis du rendement a été révélée. Ainsi, on observe que les rendements en polyphénols des extraits méthanoliques (EM) sont inférieurs à ceux obtenus par le mélange eau/méthanol/acétate d'éthyle (extrait EMAE) pour une même forme de matériel végétal. Les rendements les plus élevés sont enregistrés avec le matériel végétal séché à température ambiante suivi par le matériel végétal frais et en dernier celui séché à l'étuve.

Selon le test Tukey, les rendements obtenus avec les six extraits sont classés en trois groupes homogènes. La figure 5 montre que les rendements les plus faibles sont enregistrés par les deux extraits du matériel végétal séché à l'étuve, ainsi que par l'EM du matériel végétal frais (3.28%, 5.38% et 4.72%). Il n'existe pas de différence significative entre ces trois extraits pour le rendement ($P = 0.81$).

L'extrait EMAE du matériel végétal frais appartient au groupe de moyennes intermédiaires mais ne présente pas une différence significative avec l'EM du matériel végétal séché à température ambiante ($P = 0.65$). Ce dernier forme avec l'extrait EMAE du matériel végétal séché à température ambiante, un groupe homogène ($P = 0.13$) avec les rendements les plus élevés (9.04% et 10.94% respectivement).

D'après les résultats obtenus, on constate que la méthode d'extraction et le prétraitement du matériel végétal utilisé ont induit une variation significative des valeurs de rendement de l'extraction des polyphénols.

Tableau 4: Rendements d'extraction des polyphénols de feuilles/inflorescences d'*U. dioica*

Différentes formes du matériel végétal	Rendement en polyphénols (%)	
	Extraction méthanol (EM)	Extraction EMAE : eau/méthanol/ acétate d'éthyle
Frais	4.72 ± 0.91	7.98 ± 1.42
Séché à l'étuve	3.28 ± 0.36	5.38 ± 0.39
Séché à température ambiante	9.04 ± 0.49	10.94 ± 0.92

P<0.01

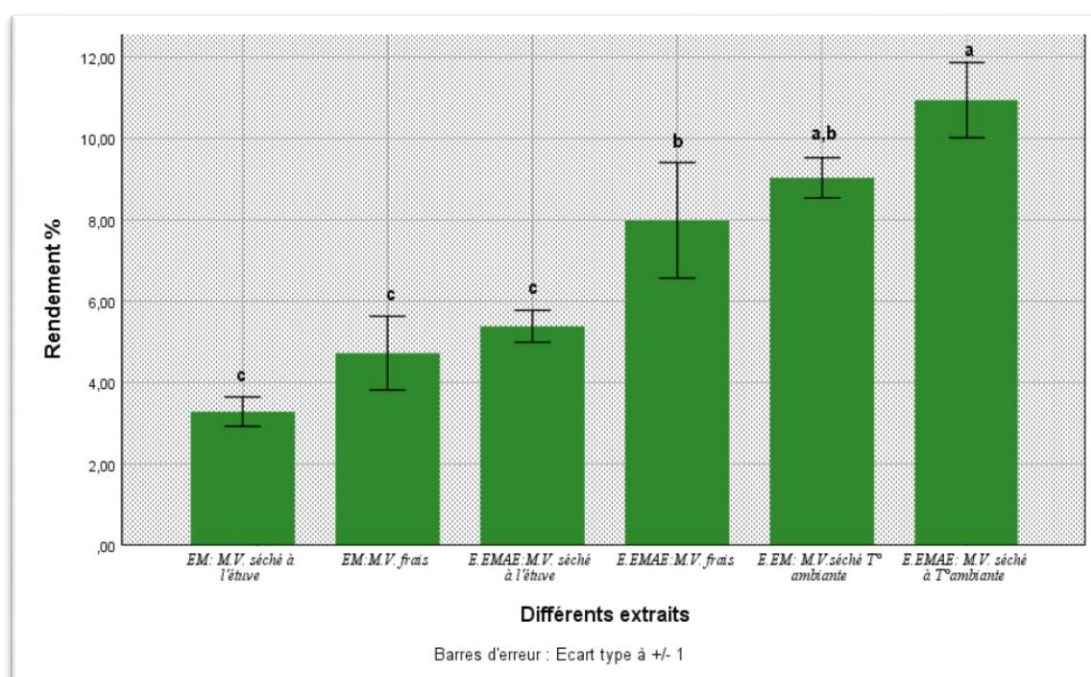


Figure 5: Effet du solvant d'extraction et du prétraitement du matériel végétal sur le rendement d'extraction des différents extraits d'*Urtica dioica* (test Tukey, P<0.05).

La prolongation du temps d'extraction améliore, en principe, la solubilité des polyphénols en raison de la deuxième loi de diffusion de Fick qui prédit que l'équilibre d'extraction sera atteint après un certain temps (Silva et al., 2007). En revanche, une extraction prolongée, peut induire des réactions indésirables telles que la dégradation

enzymatique et l'oxydation des composés phénoliques, d'où une diminution du rendement en polyphénols (Stevigny et al., 2007 ; Khoddami et al., 2013; Robards 2003). Ainsi, le rendement d'extraction en polyphénols obtenu dans les travaux de Sidaoui et al. (2015) sur la composition des feuilles d'*U. dioica*, avec une macération pendant 24 h, est de 7.5%. Ce taux est inférieur aux rendements obtenus dans nos travaux avec 2 macérations successives de 30 min chacune.

De leur côté, Zekovic et al. (2017) en utilisant l'éthanol à 96% pour l'extraction des polyphénols à partir de feuilles d'*U. dioica* ont enregistré un rendement de 3.66% ; et en utilisant l'acétate d'éthyle seul, le rendement était de 1.50%. Ces taux sont inférieurs à ceux obtenus dans le présent travail.

Toutefois, il est nécessaire de signaler que la comparaison de nos résultats avec ceux de travaux antérieurs s'avère difficile car plusieurs facteurs (solvants, méthode d'extraction, origine du matériel végétal, etc.) réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études (Silva et al., 2007).

III.1.2. Teneurs en polyphénols totaux des feuilles et inflorescences d'ortie

Les teneurs en phénols totaux des extraits sont exprimées en termes d'équivalent en mg d'acide gallique par g de matière végétale (mg EAG/g MV) ; par extrapolation sur une courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Fig. 6).

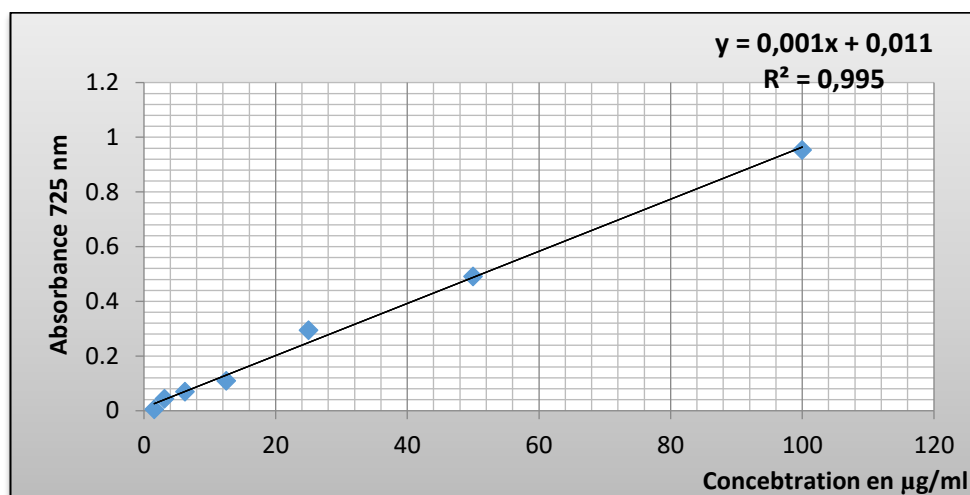


Figure 6: courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits sont reportées dans le tableau 5. Les résultats confirment que la méthode et les solvants d'extraction utilisés, ainsi que le

prétraitement du matériel végétal (MV), induisent une différence hautement significative entre les différents extraits pour la teneur en polyphénols totaux (ANOVA, $P < 0.001$). Les extraits obtenus par l'extraction EMAE présentent des teneurs plus élevées que celles des extraits méthanoliques.

Le matériel végétal frais présente le taux le plus élevé qui est de 8.06 ± 0.01 mg EGA/g, suivi du matériel séché à température ambiante avec 6.11 ± 0.16 mg EAG/g et en dernier celui séché à l'étuve avec un taux de $5,67 \pm 0,41$ mg EAG/g.

Sur la base de leurs teneurs en polyphénols totaux, les extraits sont classés en 5 groupes homogènes (fig.7). De cela, il apparaît qu'il existe une différence très hautement significative ($P < 0,001$) entre l'extrait le plus riche en polyphénols (matériel végétal frais soumis à l'extraction EMAE et le reste des extraits. Par contre, entre les deux extraits : feuilles et inflorescences séchées à température ambiante soumises à l'extraction EMAE et celles fraîches soumises à l'extraction au méthanol il n'existe pas de différence significative ($P = 0.15$). L'extrait méthanolique de matériel végétal séché à l'étuve présente la teneur la plus faible avec 1.97 ± 0.12 mg EAG/g.

Nous avons utilisé les feuilles et les inflorescences de l'ortie car des recherches antérieures confirment que ces deux parties de la plante sont plus riches en composés phénoliques que les tiges et les racines (**Orcic, 2014 ; Falla et al., 2008**).

Les deux méthodes d'extraction utilisées sont basées sur la macération. Cette technique largement connue pour l'extraction des polyphénols, est critiquée pour le fait qu'elle engendre un taux de polyphénols inférieur à d'autres méthodes comme celles avec ultrasons (**Vajic et al., 2015 ; Pompeu et al., 2009**).

Cependant, **Paniwnyk et al. (2001)** ont rapporté que les ultrasons exercent un effet négatif sur l'extraction de certains composés phénoliques comme la rutine avec un niveau de réduction du rendement de son extraction de 15,2 à 32,4%. Ces auteurs indiquent que cette réduction pourrait être le résultat de la dégradation de la rutine causée par les radicaux hydroxyles produits pendant la sonication (**Paniwnyk et al., 2001**). Compte tenu du fait que l'activité biologique des parties aériennes d'ortie est principalement attribuée à ces composés phénoliques, cette réduction peut être un facteur limitant pour l'utilisation potentielle de l'extraction assistée par ultrasons dans ce cas (**Vajic et al., 2015**).

La nature des solvants est l'un des principaux facteurs influençant l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques des plantes (**Liyana-Pathirana et Shahidi, 2005**). Dans l'étude d'optimisation de l'extraction des composés phénoliques de la feuille d'*U. dioica*, entreprise par **Vajic et al. (2015)**, les résultats obtenus suggèrent que les extraits méthanoliques avaient une teneur en polyphénols totaux significativement plus élevée que les extraits éthanoliques. Ce qui justifie le choix du méthanol comme solvant d'extraction des polyphénols d'ortie dans ce travail.

Tableau 5 : Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO)

Différents extraits		Teneur en Polyphénols totaux (mg EAG/g MV)
Solvant	Matériel végétal	
Méthanol	Frais	5.67 ± 0.41
	Séché à T° ambiante	4.57 ± 0.14
	Séché à l'étuve	1.97 ± 0.12
eau/ méthanol/ acétate d'éthyle	Frais	8.07 ± 0.01
	Séché à T° ambiante	6.11 ± 0.16
	Séché à l'étuve	3.00 ± 0.10

(P<0.001)

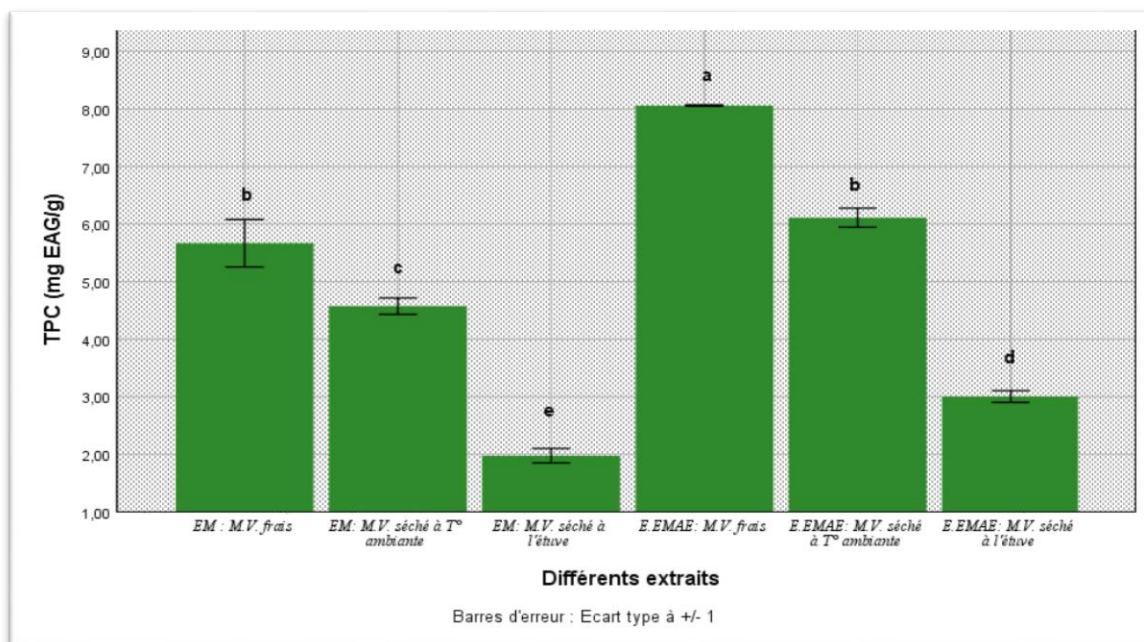


Figure 7 : Effet de la méthode d'extraction et du prétraitement du matériel végétal sur les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits d'*Urtica dioica* (test Tukey, P<0.05).

Néanmoins, les résultats qu'on a obtenus montrent que l'utilisation du méthanol comme seul solvant a donné des teneurs en polyphénols totaux (entre 1.97 à 5.38 mg EAG/g) inférieures à ceux obtenus lors de l'utilisation du mélange EMAE (entre 3.00 et 8.07 mg EAG/g).

Sur la base de ces résultats, nous considérons que l'extraction réalisée en combinant l'eau avec les deux solvants organiques, le méthanol et l'acétate d'éthyle, dans des proportions de 10:45:45 (V/V), est la plus appropriée pour l'extraction des composés phénoliques à partir des feuilles et inflorescences d'ortie.

Effectivement, l'addition d'eau aux solvants contribue à la création d'un milieu polaire qui assure l'extraction des composés phénoliques (**Lapornic et al., 2005; Liyana-Pathirana et shahid, 2006; Santos-Buelga et Wiliamson, 2003**), en particulier des glycosides phénoliques et de nombreux flavonoïdes (**Khoddami et al., 2013**). Cependant, l'utilisation d'eau de plus de 10% peut donner un extrait avec des teneurs élevées en impuretés telles que les acides organiques, les sucres et les protéines solubles qui peuvent interférer dans l'identification et la quantification des polyphénols (**Arnok et al., 2012 ; Tsao et Deng, 2004**).

De plus, un minimum de 70% de méthanol a été signalé comme nécessaire pour inactiver la PPO (polyphénoloxydase), qui est largement distribuée dans les plantes, et pour permettre de récupérer le maximum de composés phénoliques (**Robards et al., 1999 ; Tura et Robards, 2002**).

III.1.3 Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes totaux des extraits sont déterminées par extrapolation sur une droite d'étalonnage de quercétine présentée dans la figure 8.

Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits sont présentées dans le tableau 6. La variation des résultats de dosage des flavonoïdes est très hautement significative ($P < 0.001$) entre les différents extraits. Pour le matériel végétal sec ou frais, les taux de flavonoïdes restent faibles pour l'extraction méthanolique par rapport à l'extraction EMAE. Les deux extraits de feuilles et d'inflorescences d'ortie séchées à l'étuve présentent les taux en flavonoïdes les plus faibles (0.74 ± 0.25 et 0.98 ± 0.66 mg EQ/g). Le taux le plus élevé est de 3.93 ± 0.06 mg EQ/g, enregistré avec l'extrait EMAE d'ortie fraîche.

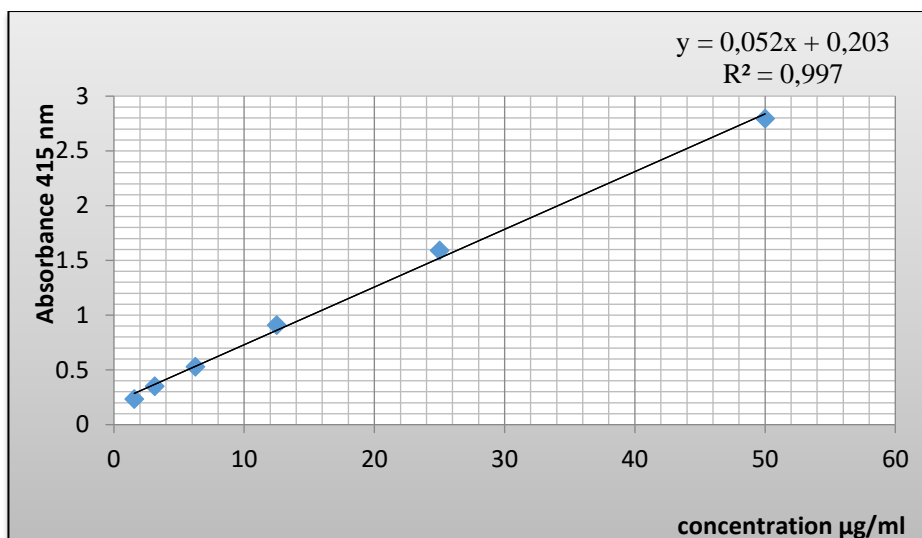


Figure 8: courbe d'étalonnage de la quercétine.

L'extrait d'ortie, avec la teneur en flavonoïdes la plus élevée (extrait EMAE: MV frais), présente une différence significative ($P= 0.014$) avec l'extrait d'ortie séché à l'étuve et extrait avec la même méthode, ainsi qu'une différence très hautement significative ($P<0.001$) avec le reste des extraits. Il n'existe pas de différence significative entre les deux extraits méthanoliques d'ortie fraîches et séchée à température ambiante ($P=0.52$) ; ainsi qu'entre les deux extraits d'ortie séchée à l'étuve pour les deux méthodes d'extraction ($P= 0.86$) (fig. 9).

Tableau 6: Teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de feuilles et d'inflorescences d'*Urtica dioica*

Différents extraits		Teneur en Flavonoïdes Totaux (mg EQ/g)
Solvant	Matériel végétal (MV)	
Méthanol	Frais	2.12 ± 0.18
	Séché à T° ambiante	1.73 ± 0.56
	Séché à l'étuve	0.74 ± 0.25
eau/ méthanol/ éthyle acétate	Frais	3.93 ± 0.06
	Séché à T° ambiante	3.03 ± 0.06
	Séché à l'étuve	0.98 ± 0.07

($P<0.001$)

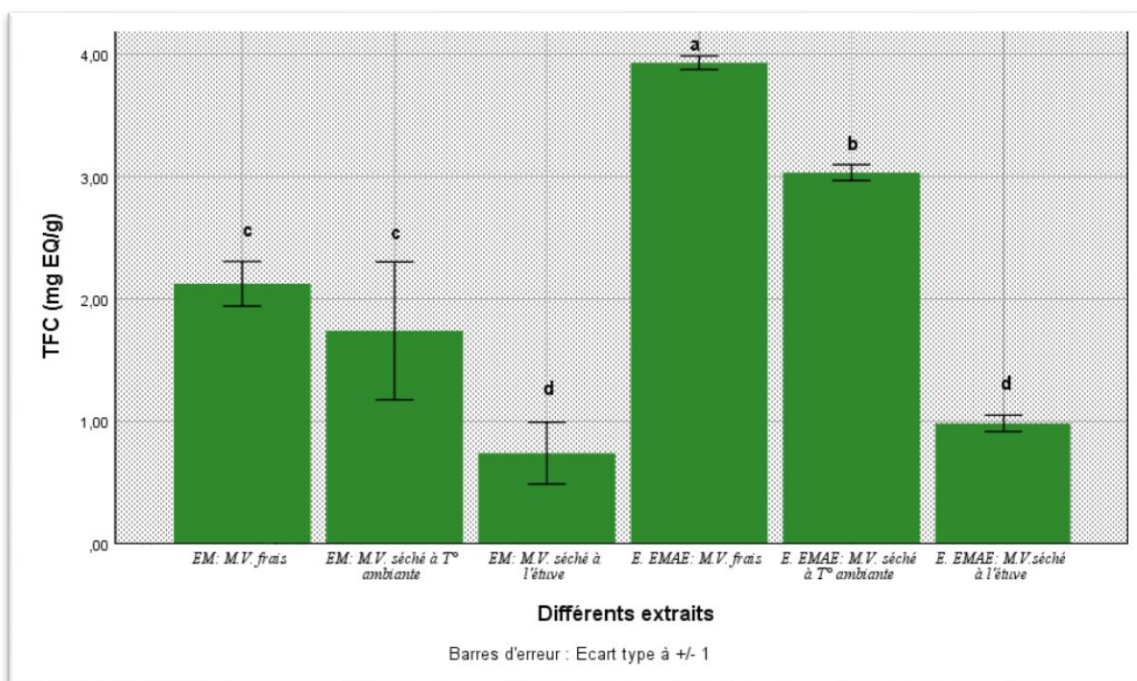


Figure 9: Effet du solvant d'extraction et du prétraitement du matériel végétal sur les teneurs en flavonoïdes des différents extraits d'*Urtica dioica*, (test Tukey, $P < 0.05$).

III.1.4. Teneurs en acides hydroxycinnamiques totaux

Les teneurs en acides hydroxycinnamiques totaux des extraits sont déterminées par extrapolation sur une droite d'étalonnage d'acide caféique présentée dans la figure 10.

Les résultats des dosages des acides hydroxycinnamiques totaux sont reportés dans le tableau 7. Les extrais présentent une variation hautement significative ($P < 0.01$) pour le taux d'acides hydroxycinnamiques.

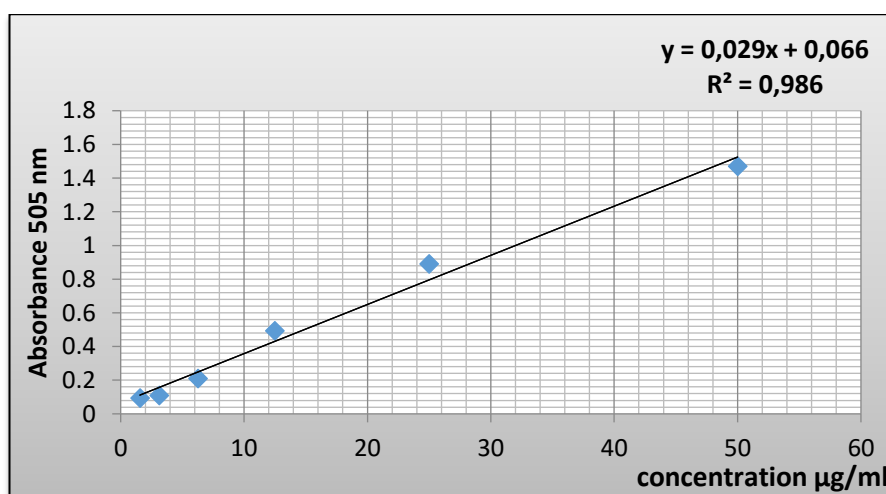


Figure 10: courbe d'étalonnage de l'acide caféique.

Tableau 7 : Dosages des acides hydroxycinnamiques totaux des différents extraits de feuilles et d'inflorescences d'*U. dioica*.

Différents extraits		Teneur en acides hydroxycinnamiques (mg EAC/g MV)
Solvant	Matériel végétal (MV)	
Méthanol	Frais	1.02 ± 0.06
	Séché à T° ambiante	1.03 ± 0.1
	Séché à l'étuve	0.09 ± 0.03
eau/ méthanol/ acétate d'éthyle	Frais	2.16 ± 0.1
	Séché à T° ambiante	1.88 ± 0.19
	Séché à l'étuve	0.28 ± 0.12

(P<0.01)

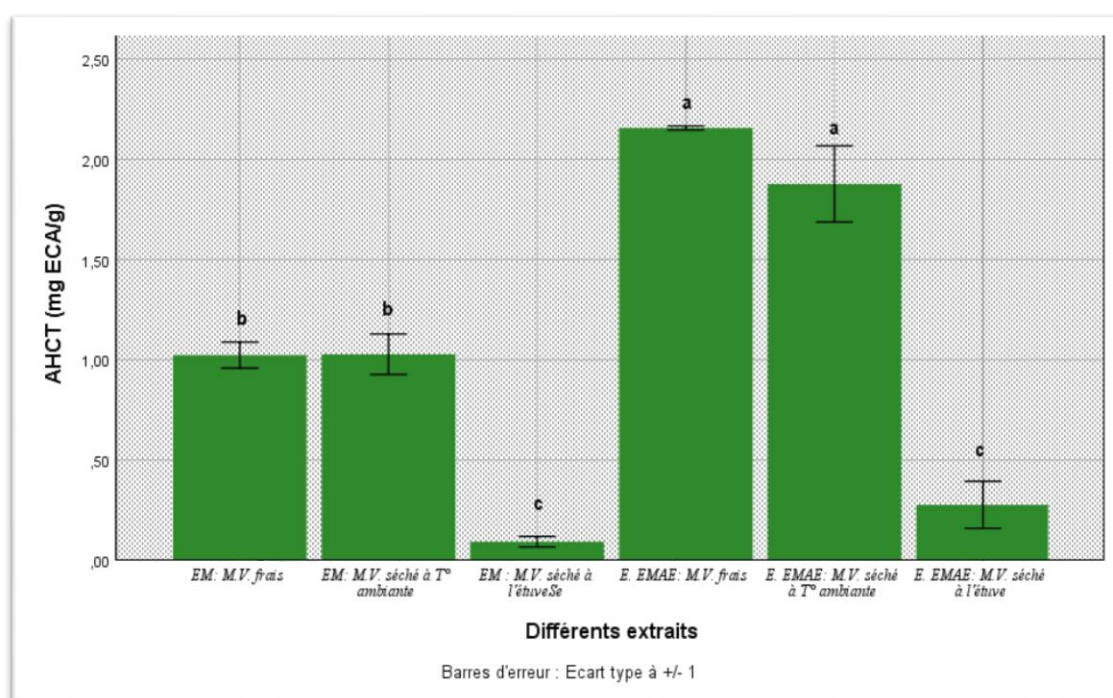


Figure 11: Effet du solvant d'extraction et du prétraitement du matériel végétal sur les teneurs en acides hydroxycinnamiques totaux des différents extraits d'*U. dioica* L.

La richesse de l'extrait EMAE d'ortie fraîche est confirmée une fois de plus avec un taux d'acides hydroxycinnamiques de 2.16 ± 0.1mg EAC/g. Pour le matériel végétal séché à l'étuve, les taux d'acides hydroxycinnamiques restent faibles pour les deux solvants

d'extraction par rapport aux autres extraits (0.09 ± 0.03 pour le méthanol et 0.28 ± 0.12 mg EAC/g pour le mélange EMAE).

Les extraits sont classés en 3 groupes homogènes (test Tukey, $P < 0.05$). Un premier groupe avec les taux d'acides hydroxycinnamiques les plus élevés, constitué des deux extraits obtenus par le mélange EMAE à partir de feuilles et d'inflorescences fraîches d'une part et séchées à température ambiante d'autre part ($P = 0.32$).

Le deuxième groupe, avec des taux moyens, représenté par les deux extraits méthanoliques d'ortie fraîche et séchée à température ambiante ($P = 1.00$). Le dernier groupe ($P = 0.86$) composé des deux extraits du matériel végétal séché à l'étuve avec les taux les plus faibles (0.09 ± 0.03 et 0.28 ± 0.12 mg EAC/g) (fig.11).

III.1.5. Corrélation entre le rendement d'extraction et le dosage des polyphénols totaux

Une corrélation est réalisée entre les résultats d'estimation des rendements et les teneurs des polyphénols totaux des différents extraits ; cela afin de démontrer l'existence ou pas d'une relation entre le rendement et la richesse en composés phénoliques.

Le coefficient de Person « r » a été utilisé pour estimer la corrélation (la normalité a été vérifiée par le test de Shapiro Wilk). Les résultats obtenus démontrent une faible corrélation positive et significative entre le rendement et la teneur en polyphénols totaux avec $r = 0.582^*$ ($P = 0.01 < 0.05$). La représentation graphique de cette corrélation est exposée dans la figure 12.

Le coefficient de dispersion $R^2 = 0,339$, confirme la faible corrélation entre les deux paramètres étudiés. Ces résultats, nous ont permis de déduire que la relation entre le rendement de l'extraction et la richesse en composés phénoliques est faible.

Les dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des acides hydroxycinnamiques dans cette étude indiquent significativement que l'extrait EPFIO (Extrait Phénolique de Feuilles et d'Inflorescences d'Ortie)-EMAE (Eau-Méthanol-Acétate d'Éthyle) est celui qui est le plus riche en substances phénoliques, et c'est pourquoi il a été retenu pour la suite du protocole expérimental de ce travail.

La teneur en polyphénols totaux de cet extrait EPFIO-EMAE est de l'ordre de 8.06 mg GAE/g ; elle est comparable à celles rapportées par **Vajic et al. (2015)** (8.9 mg EAG/g) pour un extrait hydro-méthanolique de polyphénols feuilles d'ortie et par **Zekovic et al. (2017)** (8.82 ± 0.89 mg EAG/g) pour un extrait à l'acétate d'éthyle de polyphénols de feuilles de la même plante.

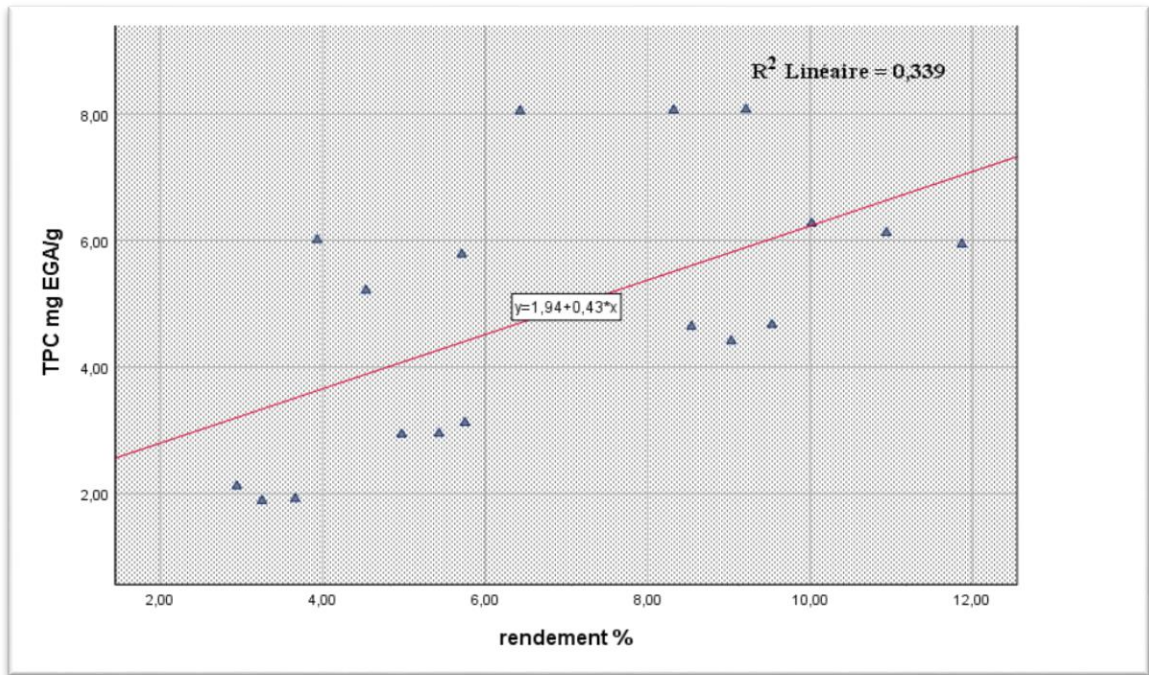


Figure 12 : La Corrélation entre les teneurs en polyphénols totaux et les rendements d'extraction des différents extraits d'*U. dioica*.

D'autres auteurs, comme **Carvalho et al. (2017)** et **Manjir et al. (2012)**, ont obtenus moins de polyphénols dans des extraits éthanolique (7.9 mg GAE/g) et méthanolique (6.35 mg GAE/g) de feuilles d'ortie.

En revanche, **Zenao et al. (2017)** ont rapporté une teneur en polyphénols totaux bien supérieure (25.85 ± 1.2 mg EAG/g) dans un extrait éthanolique de polyphénols de feuilles d'ortie.

Par ailleurs, des extractions au soxhlet, avec 9 solvants différents, effectuées par **Mandal et al. (2009)** leur ont permis d'enregistrer des teneurs en polyphénols allant de 1.27 à 24.22 mg EAG/g et des teneurs en flavonoïdes entre 4.33 et 43.34 mg EQ/g.

La teneur en flavonoïdes de notre extrait était de 3.93 mg EQ/g, ce taux est plus élevé que ceux obtenus par **Carvalho et al. (2017)** et **Zekovic et al. (2017)** et qui étaient de l'ordre de 0.22 et 1.4 mgEQ/g, respectivement.

Les travaux de **Zenao et al. (2017)** et ceux de **Sidaoui et al. (2015)** ont rapporté des teneurs en flavonoïdes dans des extraits éthanoliques de parties aériennes d'ortie, respectivement 5.71 et 1.8 fois plus élevées que celles enregistrées dans ce travail.

III.1.6. Analyse chromatographique des polyphénols

III.1.6.1. Identification des polyphénols de l'extrait phénolique de feuilles et

inflorescences d'ortie (EPFIO-EMAE) par HPLC-PDA-ESI-MS

Les polyphénols présents dans l'extrait EPFIO ont été identifiés à l'aide des spectres PDA et des données MS. Le profil chromatographique UV typique à 280 nm de l'échantillon analysé est présenté dans la figure 13.

Le tableau 8 présente tous les composés identifiés avec leur fragmentation MS² dans des conditions d'ionisation électrospray négative (ESI) par comparaison avec les données disponibles dans la littérature. Les composés ont été numérotés selon leur ordre d'élution, parmi les 20 composés identifiés, 16 étaient des composés phénoliques.

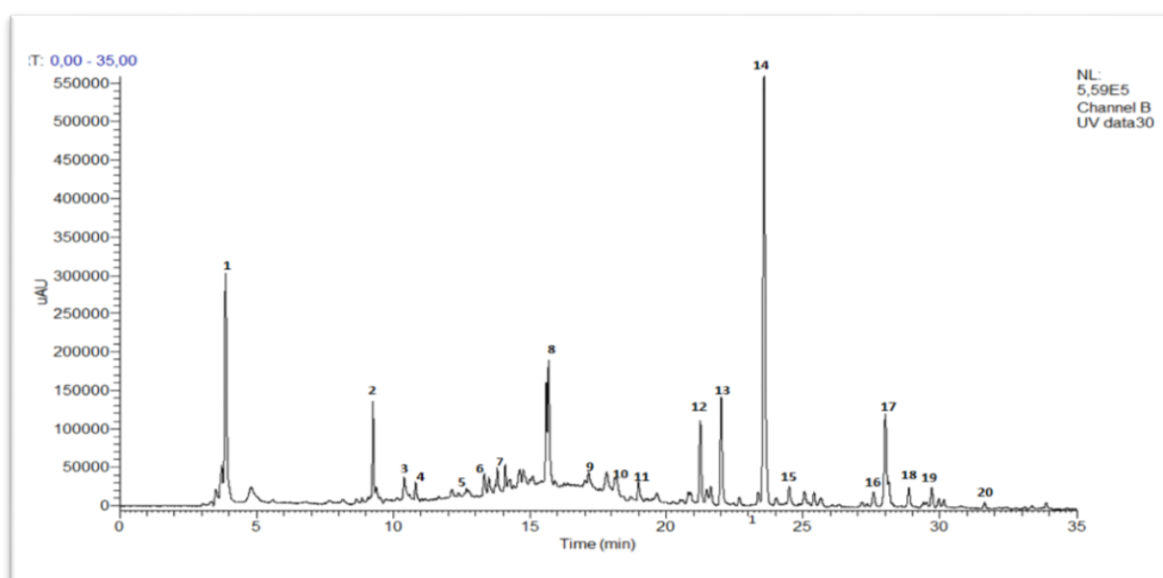


Figure 13: Profil HPLC-PDA de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) enregistré à 280 nm.

Les composés phénoliques identifiés appartiennent à deux classes, à savoir, les flavonoïdes qui étaient les plus abondants (9 composés) et représentaient 78.86% du poids des polyphénols quantifiés et les acides hydroxycinnamiques (7 composés) avec 21.14%.

Les glycosides phénoliques identifiés dans notre extrait étaient des dérivés flavoniques de kaempferol, lutéoline, quercétine, naringénine et d'apigénin. L'extrait EPFIO contenait aussi des flavonoïdes non conjugués comme la naringénine et l'epicatechine.

Plusieurs des conjugués acide hydroxycinnamoyl-malique hydroxycinnamoyl-tartarique tels que les acides féruloylmalic, p-coumaroyl-malique et l'acide cafféoyl-tartarique ont été détectés dans cette étude.

Des composés polaires ont été identifiés dans notre extrait, à savoir, l'acide malique, l'alcool sinapylique et l'acide hydroxy - octadécatriénoïque

III.1.6.2. Quantification des différents composés phénoliques

La quantification des polyphénols dans l'extrait EPFIO analysé a été effectuée par extrapolation sur des courbes d'étalonnage et les résultats ($\mu\text{g} / \text{g}$ de poids frais) sont reportés aussi dans le tableau 8.

Le composé dominant de l'extrait EPFIO étudié était un flavanol qui est la rutine (quercétine 3-O-rutinoside) avec $2005 \mu\text{g} / \text{g}$, ce qui correspond à 65.66%, suivi de 11.58% d'un acide hydroxycinnamique qui est l'acide férulique et de ses dérivés (acide 5-hydroxyférulique et désoxyhexoside de l'acide hydroxyférulique), de 6.1% de naringénine et ses dérivés, de 4.49% d'acide féruloylmalique, de 2.18% d'apigénine di-C-hexoside, de 1.53% de kaempférol-3-O-glucoside, de 1.41% d'acide cinnamique et de 1.33% de catéchine (épicatéchine et épigallocatechine).

L'identification de la composition de l'EPFIO, par HPLC, révèle que les flavonoïdes sont les plus abondants dans l'extrait (78.86%) suivis par les acides hydroxycinnamiques (21.14%).

Ces résultats sont comparables à ceux de plusieurs recherches antérieures qui ont aussi identifié les polyphénols d'*U. dioica* à partir d'extraits hydro-alcoolique des parties aériennes (Pinelli et al., 2008 ; Farag et al., 2013 ; Carvalho et al., 2017 ; Vajic et al., 2015).

Malgré, l'identification d'autres classes de polyphénols comme les lignanes et anthocyanes dans des extraits de feuilles d'*U. dioica* par Farag et al. (2013), ces composés n'ont, cependant, pas été enregistrés dans l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) dans ce travail.

Les flavonoïdes dans la grande ortie se présentent généralement sous forme de conjugués de sucres (Chaurasia et Wichtl, 1987) ; ce qui a été confirmé par la présente étude car des composés glycosides ont été identifiés.

Tableau 8: Identification et quantification des polyphénols d'*Urtica dioica L.* par HPLC-PDA-ESI/MS

N	Temps de rétention (min)	Formule	[M-H]-	MS ²	Composés	Quantification (µg/g)
1	3.87	C ₄ H ₆ O ₅	133	115	Malic acid	ND
2	9.25	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	355	377 209 191	Hydroxyferulic acid deoxyhexoside	121
3	10.39	C ₉ H ₈ O ₂	147		Cinnamic acid	43
4	10.81	C ₁₀ H ₉ O ₅	209	113	5-Hydroxyferulic Acid	17.57
5	13.30	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	209	209	Sinapoyl alcohol	ND
6	13.77	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271	151	Naringenin	85.11
7	14.06	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305		Epigallocatechin	24.63
8	15.71	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193	149	Ferulic acid	215
9	17.83	C ₁₂ H ₁₈ O ₁₃	477	301	Quercetin 3-O-glucuronide	34
10	18.16	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	325	ND	Naringenin Derivative	101.2
11	19.00	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289	245	Epicatechin	15.91
12	21.25	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	311	171 229 156	Caffeoyltartaric Acid	93
13	22.03	C ₁₄ H ₁₄ O ₈	309	291 171	Feruloylmalic acid	137
14	23.56	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	609	301 271	Rutin	2005
15	24.50	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	447	171 285	Kaempferol-3-O-glucoside	46.81
16	25.04	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	309		Acidedihydroxy-octadecatrienoïque	ND
17	27.59	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂	461	285	Luteolin-7-O-glucuronide	28.72
18	28.02	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293	275	Acide 9-hydroxy-octadecatrienoïque	ND
19	28.87	C ₁₃ H ₁₂ O ₇	279	163 133	<i>p</i> -coumaroylmalic acid	19.02
20	29.71	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593	575 395	Apigenindi-C-hexoside	66.63

ND : Non Déterminé

Des conjugués formés à partir de la réaction d'acides hydroxycinnamiques avec l'acide quinique, l'acide malique, le glucose et l'acide benzoïque ont déjà été rapportés pour *U. dioica* (Bucar *et al.*, 2006; Budzianowski, 1991; Pinelli *et al.*, 2008) et également signalés dans la présente étude.

Yıldız *et al.* (2008) ont montré que la rutine était le principal flavonol (jusqu'à 18%) dans les feuilles, et que l'acide chlorogénique était présent dans les extraits de feuilles hydrolysés et non hydrolysés. De même, l'analyse chimique d'extraits de feuilles, de tiges et de racines d'ortie des régions méditerranéennes de Turquie a montré que les composés phénoliques prédominants dans les feuilles étaient la rutine, l'acide chlorogénique et caféique (Otles et Yalcin, 2012). Dans la même étude, la présence d'acide p-coumarique, ainsi que de kaempférol et d'isorhamnétine, a également été confirmée. La rutine et l'isorhamnétine 3-O-rutinoside ont également été détectées dans des extraits méthanoliques de parties aériennes d'ortie (Akbat *et al.*, 2003).

Les résultats de quantification des composés phénoliques dans l'extrait EPFIO vont dans le même sens que ceux de Carvalho *et al.* (2017) qui ont détecté de la rutine, l'acide caffeoyltartarique, l'acide hydroxyferulic desoxyhexoside, l'acide feruloylmalique, l'apigénine di-C-hexoside et de l'acide p-coumaroylmalique. Pinelli *et al.* (2008) ont aussi détecté de la rutine avec une teneur de 1347 µg/g de matière fraîche (MF) dans un extrait d'*U. dioica* des régions italiennes. De même, Zeno *et al.* (2017) ont obtenu un taux de rutine de 106.01 µg/g. Ces taux restent inférieurs à celui enregistré pour l'EPFIO qui est de 2005 µg/g MF.

Certains composés identifiés dans l'ortie par Kavtaradze *et al.* (2001) (rutine et la quercétine) ou encore par Otles et Yalcin (2012) (rutine, naringénine, isorhamnétine, les acides ferulique, chlorogénique, syringique et vanillique), ne l'ont pas été dans ce travail.

Dans l'étude réalisée par Orcic *et al.* (2014), la présence de rutine, de naringénine, d'epicatechin et d'epigallocatechine ; ainsi que celle des acides cinnamique, ferulique a été confirmée ; alors que Farag *et al.* (2013) ont aussi identifié la rutine et Kaempferol 3-O-glucoside. Orcic *et al.* (2014) ont rapporté des teneurs de 90µg/g MS en acide ferulique et de 6100µg/g MS en rutine.

Des acides phénoliques avec leurs dérivés (les acides chlorogénique, 3-O et 5-O-caféoylquinique, 5-O-feruloylquinique et 2-O-caféoylmalique), de la rutine, ainsi que des flavonoides (glucoside, diglucoside et rutinoside de quercétine et d'isoquercétine) ont également été identifiés dans les parties aériennes de l'ortie Grevsen *et al.* (2008), Vajic *et*

al., 2018 ; Zhang, 2014 ; Zenaou et al., 2017) ; alors que ces composés n'ont pas été détectés dans la présente expérience.

La quantité et la qualité des polyphénols dans les végétaux varient considérablement en fonction de différents facteurs intrinsèques et extrinsèques, tels que la génétique végétale et les variétés, la composition du sol, les stades phénologiques, et autres (Farak et al., 2013 ; Daglia, 2012).

Pour les composés polaires identifiés dans l'EPFIO, l'acide malique, alcool sinapylique et l'acide hydroxy - octadécatriénoïque ont également été décrits chez l'ortie dans des travaux précédents (Farak et al., 2013; Grevsen et al., 2008).

Nos résultats confirment que l'EPFIO est une source riche en acide ferulique, rutine et naringénine, acide cinnamique et en glycosides ; composés qui confèrent à l'ortie ses activités antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Al Maruf et al., 2015, Vajic et al., 2018, Carvalho et al., 2017).

III.2. Méthodes d'étude des activités biologiques de l'EPFIO (Extrait Phénolique de

Feuilles et d'Inflorescences d'Ortie)

III.2.1. Les expériences *in vitro*

III.2.1.1. Mise en évidence et évaluation de l'activité antimicrobienne de l'EPFIO

Dans cette étude, quatorze espèces bactériennes différentes et une espèce de levure ont été utilisées pour examiner l'éventuelle activité antimicrobienne de l'EPFIO étudié.

III.2.1.1.1. Pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur gélose (AWDT :

Agar Well Diffusion Test)

Les résultats du pouvoir antimicrobien de l'EPFIO évalué par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches bactériennes testées en comparaison à celui de deux antibiotiques, la vancomycine et la gentamicine, et d'un antifongique (le miconazole) sont présentés dans le tableau 9.

Les résultats du test MANOVA révèlent un effet significatif des différents antibactériens (extrait EPFIO, vancomycine, gentamicine) vis à vis de l'inhibition de la croissance des différentes bactéries testées sauf vis à vis de *Bacillus cerus* (P= 0.102). L'effet

de l'EPFIO et du miconazole sur l'inhibition de croissance de la levure *C. albicans* a été non significatif (P= 0.097).

Pour mieux apprécier la comparaison entre l'efficacité de l'EPFIO et celle des antibiotiques utilisés comme référence, le test Tukey a été pratiqué, et il montre l'absence de différence significative entre l'action antibactérienne de l'extrait EPFIO et la gentamicine vis à vis de *E. faecalis* (P= 0.06) et *E. hirae* (P=0.75). Pour la souche *B. cereus*, la différence entre les deux antibiotiques de référence et l'extrait EPFIO a été également non significative.

L'EPFIO a généré des zones d'inhibition contre tous les microorganismes testés à l'exception des deux bactéries bénéfiques, à savoir *Bifidobacterium animalis subsp lactis* et *Lactobacillus rhamnosus* qui, en revanche, sont inhibées par les deux antibiotiques utilisés. Ceci suggère que l'extrait EPFIO étudié n'a pas d'impact négatif sur des espèces du microbiote intestinal, et confirme une fois de plus les effets indésirables des antibiotiques de synthèse.

Les bactéries Gram-positives testées étaient sensibles à l'EPFIO avec des zones d'inhibition allant de 8.5 mm pour *Listeria monocytogenes* à 20.5 mm pour *Staphylococcus aureus*, l'une des bactéries les plus impliquées dans les toxi-infections (**Rauha et al., 2000 ; Kukric et al., 2012**).

Les bactéries à Gram négatif étaient moins sensibles à l'EPFIO, à l'exception d'*Escherichia coli* (ATCC 10536) et de *Salmonella typhimurium* avec des zones d'inhibition de 10.34 mm et 9.17 mm, respectivement. Le diamètre de la zone d'inhibition du microorganisme responsable de la plupart des infections cliniques à levures, était de 18.33mm.

L'EPFIO a généré une zone d'inhibition de 3mm pour *E. coli* ATCC 25922 et 10,34mm *E. coli* ATCC 10536. **Ghaima et al. (2013)** et **Gulcin et al. (2004)** ont rapporté des diamètres de zones d'inhibition de 10mm et de 8mm pour les souches *E. coli* isolée cliniquement et *E. coli* ATCC 9837 ; alors que d'autres auteurs (**Bonjar et al., 2004 ; Bonjar, 2004 ; Walter et al., 2011**), avaient rapporté que les extraits de feuilles d'ortie avaient peu d'effet antimicrobien.

Les membranes des bactéries à Gram négatif agit comme une barrière contre les agents externes tels que les colorants hydrophiles, les antibiotiques et les détergents (**Khanam et al., 2015 ; Modarresi et al., 2012**). En conséquence, la perméabilité de la membrane de ces

bactéries est bien inférieure à celle des bactéries à Gram positif (**Oroujalian, 2010 ; Khosravinia et al., 2013 ; Kiaei et al., 2010**)

Tableau 9: Diamètres des zones d'inhibition en mm de la croissance de bactéries par l'EPFIO, la vancomycine et la gentamicine; ainsi que celle d'une levure par l'EPFIO et le miconazole.

Souches	Extrait EPFIO	Vancomycine	Gentamycine	Miconazole	P value (MANOVA test)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10,34 ± 0,76 ^b	20 ± 2,00 ^a	13 ± 1,00 ^b	-	0,000
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	11,83 ± 1,26 ^b	21 ± 1,00 ^a	11,17 ± 1,04 ^b	-	0,001
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	11,16 ± 1,04 ^b	19,84 ± 1,89 ^a	22,67 ± 1,25 ^a	-	0,000
<i>B. cerus</i> ATCC 10876	19 ± 2 ^a	21 ± 1,32 ^a	22,84 ± 1,75 ^a	-	0,102
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	8,5 ± 2,29 ^c	14,84 ± 0,76 ^b	22,17 ± 1,26 ^a	-	0,002
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	20,5 ± 0,50 ^b	25,17 ± 0,76 ^a	23,34 ± 1,53 ^a	-	0,018
<i>K. pneumonia</i> ATCC 13883	4,84 ± 1,04 ^c	13,34 ± 1,53 ^b	22,5 ± 1,32 ^a	-	0,000
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 13315	6,33 ± 1,53 ^c	13,17 ± 0,76 ^b	21,34 ± 1,53 ^a	-	0,000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	3,34 ± 2,08 ^c	10,5 ± 2,18 ^b	19,5 ± 1,32 ^a	-	0,005
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3 ± 2,00 ^b	17,5 ± 0,5 ^a	20 ± 1,00 ^a	-	0,001
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 13311	9,17 ± 0,76 ^c	14,34 ± 0,58 ^b	19,17 ± 1,04 ^a	-	0,000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	10,34 ± 1,53 ^c	17,34 ± 2,08 ^b	23,84 ± 1,25 ^a	-	0,001
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	18,33 ± 0,58 ^a	-	-	21,84 ± 1,04 ^a	0,097
<i>Bifidobacterium Animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12	0,00 ± 0,00 ^b	15,5 ± 1,5 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,000
<i>Lactobacillus Rhamnosus</i> LbRE- LSAS	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	8, ± 1,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,000

Le fait que l'EPFIO soit riche, d'une part en acides hydroxycinnamiques tels que l'acide férulique qui possède une activité antibactérienne à large spectre contre les bactéries gram-négatives et positives (**Borges et al., 2013; Naz et al., 2006**), l'acide cinnamique avec lequel une activité antibactérienne a été signalée contre *E. coli* NCTC 10418, *S. aureus* NCTC 10788 et *E. hirae* NCTC 13383 dans les travaux de **Malheiro et al. (2019)**; et d'autre part en flavonoïdes tels que la rutine qui a une activité antimicrobienne contre *S. aureus* (MTCC 265 et ATCC 25923), *E. coli* (MTCC 167 et ATCC 10536) et *C. albicans* (ATCC 40227) (**Soni, 2013, Araruna et al., 2012**) et la naringénine dont la puissance antibactérienne contre *S. aureus*, *E. thypi*, *E. coli* (souches non précisées par les auteurs) (**Agus et al., 2017**) pourrait expliquer les résultats sur le potentiel antimicrobien observé dans ce travail.

Des expériences avec des composés phénoliques purs (**Cueva et al., 2010 ;2012**) ont montré que les acides phénoliques étaient efficaces contre les bactéries Gram négatif et positif. Les composés tels que l'acide férulique et la rutine seraient plutôt efficaces contre *Listeria monocytogenes* (**Liu, 2003; Saavedra et al., 2010**).

Cependant, les composés phénoliques purs étaient parfois inefficaces ou moins efficaces que les extraits phénoliques de plantes, probablement en raison de l'effet additif et synergique des composants de ces extraits (**Lowy, 2003**).

III.2.1.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les résultats relatifs aux concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'EPFIO, déterminés pour les bactéries présentant des zones d'inhibition supérieures à 8 mm sont présentés dans le tableau 10.

Le principal effet bactérien observé était bactériostatique. Il semble que l'EPFIO inhibe la vie active des bactéries (i.e. la croissance exponentielle). Cependant, un effet bactéricide a été observé pour *B. cereus* ATCC 10876 et *S. aureus* ATCC 29213 avec des CMB de 0.156 et 0.039 mg/mL, respectivement.

Tableau 10: Concentration minimale inhibitrice (CMI) et effet bactérien de l'extrait phénolique de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO)

Strains	MIC (mg.mL-1)	Effet bactérien
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0.625	bactériostatique
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	1.25	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1.25	
<i>Bacillus cerus</i> ATCC 10876	0.156	bactéricide
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	2.5	bactériostatique
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0.039	bactéricide
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	5	bactériostatique
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	1.25	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.156	

L'effet bactéricide de l'EPFIO sur *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a été démontré par **Kiaei et al. (2010)**, qui affirment qu'une concentration de 100mg/mL d'extrait hydro alcoolique d'*U. dioica*, inhibait complètement la croissance de bactéries Gram positif, isolées chez des patients atteints d'une infection urinaire.

La CMI enregistré par l'extrait de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) contre *E. coli* ATCC 10536, qui est de 1.25 mg/mL, est meilleur que celle mentionnée dans les travaux de **Seyedeh et al. (2016)** qui est de 2.5mg/mL.

Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes sont reconnus par leur toxicité contre les micro-organismes. Le mécanisme de la toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (protéases et des carbohydrases et autres interactions) pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et l'enveloppe cellulaire (**Cowan, 1999**). En outre, leur activité antibactérienne est probablement due à leur capacité à se complexer avec les protéines extracellulaires et les protéines solubles et de former un

complexe avec les parois des cellules bactériennes qui provoque une perturbation des membranes bactériennes (Tsuchiya et al., 1996).

Dans une étude sur l'action antimicrobienne de la propolis, Mirzoeva et al. (1997) ont montré que les flavonoïdes et la quercétine provoquent une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne interne et une perturbation du potentiel membranaire. Salvatore et al. (1998) ont rapporté que le « flavanone lonchocarpus A » inhibe la synthèse macromoléculaire dans *Bacillus megaterium*, et que la synthèse de l'ARN, de l'ADN, la paroi cellulaire et des protéines ont toutes été inhibées.

Mori et al. (1987) ont montré que la synthèse de l'ADN a été fortement inhibée par les flavonoïdes chez *Proteus vulgaris*; tandis que la synthèse de l'ARN a été la plus touchée chez *S. aureus*. Les flavonoïdes présentant cette activité sont la robinétine, la myricétine et l'épigallocatechine. La synthèse des protéines et des lipides a été également touchée. Ces auteurs suggèrent que l'anneau B des flavonoïdes peut jouer un rôle dans l'intercalation ou dans une liaison hydrogène avec les empilements des bases d'acides nucléiques et que ceci peut expliquer une action inhibitrice de la synthèse de l'ADN et de l'ARN. Plus récemment, Plaper et al., (2003) ont indiqué que la quercétine se lie à la sous-unité Gyr B d'*E. coli* et l'ADN gyrase inhibe l'activité de l'enzyme ATPase.

III.2.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante d'EPPFIO (Extrait Phénolique

de Feuilles et d'Inflorescences d'Ortie)

Pour évaluer avec précision l'activité antioxydante, une seule méthode n'est pas suffisante car de nombreux facteurs peuvent affecter l'évaluation. Il est nécessaire de prendre plus d'une mesure et également de prendre en compte les différents mécanismes de l'activité antioxydante (Kurkic et al., 2012). Pour cela, quatre tests ont été utilisés et dans lesquels le pouvoir antioxydant de l'extrait phénolique des feuilles et inflorescences étudié est comparé à la quercétine et l'acide ascorbique.

III.2.1.2.1. Détermination de la capacité antioxydante en équivalents Trolox (TEAC)

Les densités optiques (DO) enregistrées au cours de cette évaluation ont permis de calculer les pourcentages d'inhibition du radical ABTS qui sont apparus augmenter proportionnellement avec la concentration en antioxydants. L'acide ascorbique et la

quercétine, utilisés comme antioxydants de référence (étalons) dans l'inhibition du radical ATBS, ont permis la détermination du pouvoir antioxydant de l'extrait EPFIO (fig.14).

À une concentration de 100µg/mL, l'acide ascorbique et la quercétine génèrent des pourcentages d'inhibition de $94.82 \pm 1.76\%$ et de $51.99 \pm 1.41 \%$, respectivement; alors que l'extrait EPFIO assure cette inhibition à hauteur de $40.16 \pm 0.54\%$.

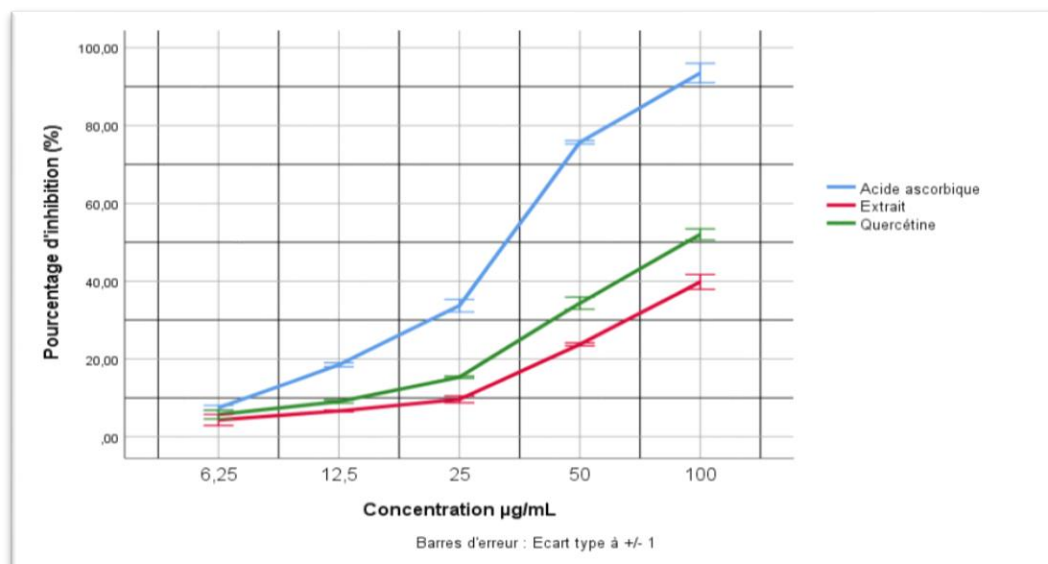


Figure 14 : Pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS• en fonction des différentes concentrations de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO), de l'acide ascorbique et de la quercétine ($P < 0.01$).

À partir de l'équation de la courbe d'étalonnage du Trolox (fig. 15), les concentrations en mM ET/g ont été déterminées et sont présentées dans la figure 16. L'analyse de variance indique une activité antiradicalaire hautement significative de l'extrait ($P < 0.01$).

Il n'existe pas de différence significative entre l'activité antiradicalaire de l'extrait et de la quercétine ($P = 0.13$).

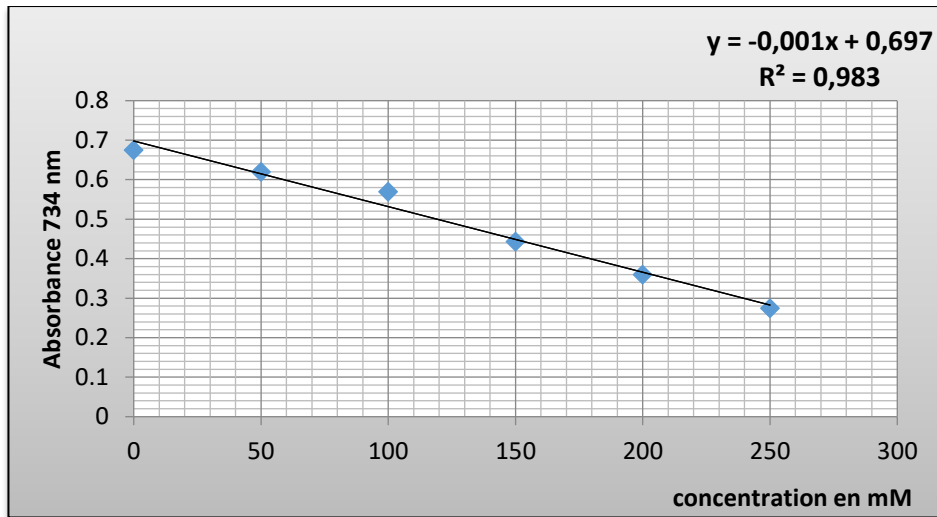


Figure 15: courbe d'étalonnage de trolox à 734 nm

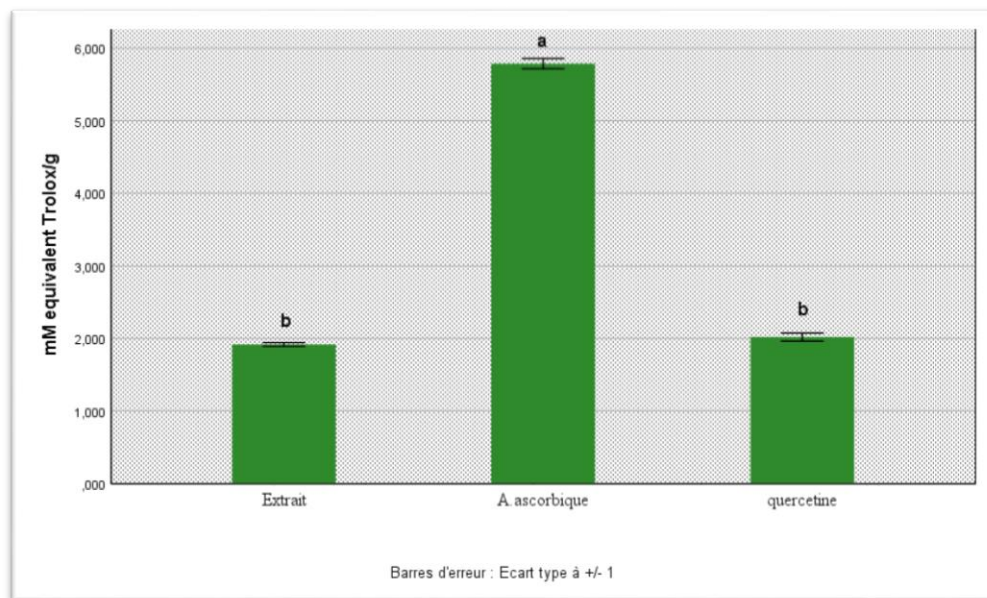


Figure 16 : Activité antiradicalaire en mM d'Equivalents Trolox de l'EPFIO comparée à celles de l'acide ascorbique et de la quercétine (test Tukey, $P < 0.05$).

Les résultats montrent que l'extrait d'ortie possède une activité antioxydante significativement ($P < 0.05$) plus faible que celle de la vitamine C. Avec une valeur de 5.78 ± 0.07 mM ET/g, l'acide ascorbique présente une activité antioxydante 3 fois plus élevée que celle de notre extrait (1.92 ± 0.02 mM ET/g).

Les résultats de la présente étude sont comparables à ceux de **Vajic et al. (2018)** qui ont montré que l'extrait méthanolique d'*U. dioica*, avec 1.5 ± 0.1 mM ET/g, possède une activité

antioxydante supérieure à celle du BHT (Butylated Hydroxy Toluene : antioxydant couramment utilisé comme additif alimentaire) mais inférieure à celle de la vitamine C.

Les extraits méthanolique et éthanolique de feuilles d'ortie ont présenté des activités antioxydantes respectives de 0.46 (Dall'Acqua et al., 2008) et de 8.11 mM ET/g (Sidaoui et al., 2015), soit respectivement, plus de 4 fois inférieure et plus de 4 fois supérieure à celle mesurée pour l'extrait EPFIO dans ce travail (1.98 mM ET/g).

La lecture de nos résultats nous oriente vers les suggestions de Rice-Evans et al. (1996) et Pietta (2000) qui avaient déduit que les substances phytochimiques naturelles, telles que les composés phénoliques, présentent dans leur structure moléculaire des anneaux aromatiques, avec un ou plusieurs groupes hydroxyles qui leur permettent d'agir en tant qu'antioxydants car leur système étendu d'électrons conjugués permet un transfert rapide d'électrons ou d'atomes hydrogène vers les radicaux libres.

III.2.1.2.2. Activité du piégeage du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH)

L'activité de piégeage des radicaux libres de l'EPFIO avait été évaluée à l'aide de la méthode du DPPH. La possibilité que l'extrait pouvait donner de l'hydrogène ou des électrons avait été mesurée en utilisant le radical stable 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). Le DPPH est un radical libre qui peut accepter un électron ou un proton hydrogène et devenir une molécule diamagnétique stable (Manouze et al., 2017; Maaroufi et al., 2017).

Les concentrations ayant conduit à une inhibition de 50% (IC₅₀) de ce radical DPPH sont présentées dans la figure 17. Il convient de rappeler qu'il y a une relation inverse entre l'IC₅₀ d'une substance antioxydante et son activité anti-radicalaire. Le test DPPH a révélé que l'EPFIO a une activité antioxydante très hautement significative (P < 0.001) avec une IC₅₀ de 129.42 ± 6.93 µg/mL.

Il n'existe pas de différence significative (test Tukey, P= 0.163) entre l'activité antiradicalaire exercée par l'extrait EPFIO et celle de la quercétine (IC₅₀= 121,09 ± 4,41 µg/mL) qui est connue pour avoir une forte activité antioxydante (Cai et al., 2004). L'activité antiradicalaire de l'acide ascorbique représente 1.33 fois celle de l'extrait EPFIO avec une IC₅₀ de 96.82 ± 0.98 µg/mL.

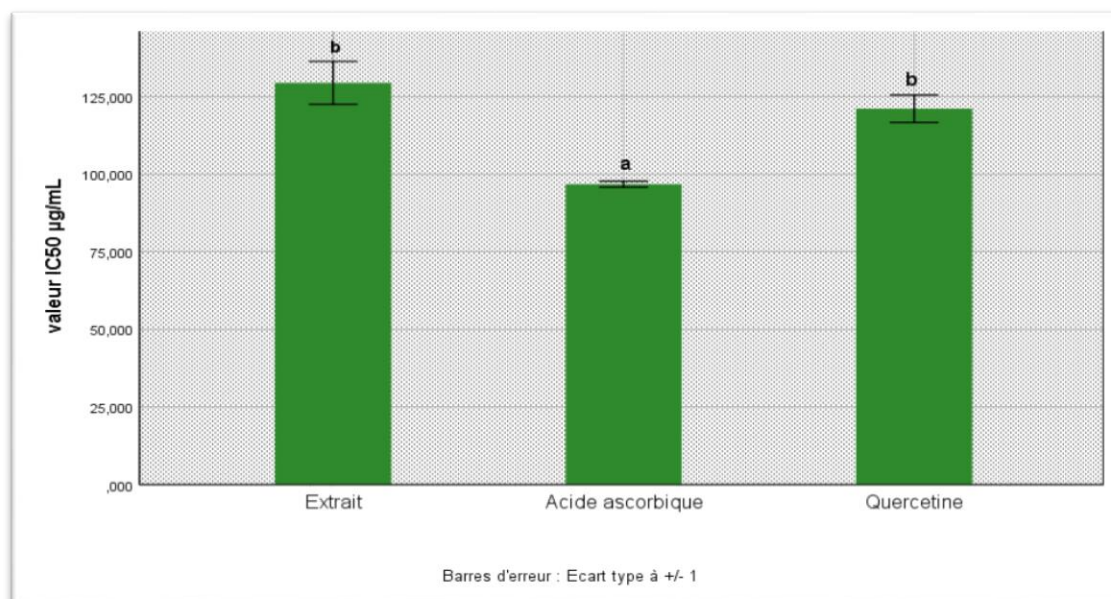


Figure 17 : Concentrations inhibitrices de 50% des radicaux libres DPPH (IC₅₀ en µg/mL) de l'extrait phénolique des feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO), de l'acide ascorbique et de la quercétine (test Tukey, P<0.05).

Dans les travaux de **Khare et al. (2012)**, l'extrait hydroalcoolique d'*U.dioica* a présenté une IC₅₀ de 88.33 ± 2.88 µg/mL, inférieure à celle de l'EPFIO ; alors que, **Dall'Acqua et al. (2008)** avaient rapporté une IC₅₀ de 419.1 ± 10 µg/mL pour l'extrait méthanolique de feuilles d'ortie, qui est 3 fois plus élevée que celle enregistré dans notre travail. De même **Zekovic et al. (2017)**, ont obtenus une IC₅₀ de 220 ± 0.02 µg/mL pour un extrait éthanolique d'ortie.

III.2.1.2.3. Mesure du pouvoir réducteur du fer ferrique (Test FRAP)

Le potentiel antioxydant de l'EPFIO a été déterminé par la méthode de FRAP basée sur l'aptitude des antioxydants à réduire le fer ferrique du TPTZ-Fe (III) en fer ferreux du TPTZ-Fe (II). Les résultats ont été exprimés en mM de Fe²⁺/ g d'extrait en utilisant une courbe d'étalonnage établie avec des solutions de FeSO₄ (fig. 18).

L'ANOVA révèle un effet antioxydant hautement significatif de l'EPFIO (P<0.01) équivalent à 1.61 ± 0.01 mM Fe²⁺/g. Cet effet antioxydant est supérieur à celui de la quercétine qui est de 1.15 ± 0.03 mM Fe²⁺/g, et inférieur de 3.5 fois à celui de l'acide ascorbique qui est de 5.77 ± 0.11 mM Fe²⁺/g (fig.19). Ces résultats indiquent que l'extrait d'ortie a le pouvoir de réduire les ions ferriques. Cette réduction est vraisemblablement due

au flavonoïde majoritaire de l'EPFIO, la rutine (Aherne et Brien, 2000), et accessoirement à l'acide chlorogénique (Kono et al., 1998).

Carvalho et al. (2017) trouvent que l'extrait méthanolique d'*U. dioica* a une capacité réductrice du fer ferrique en fer ferreux (3.81 ± 0.32 mM Fe²⁺/g) supérieure à celle de l'EPFIO (1.61 ± 0.01 mM Fe²⁺/g) testé dans cette expérience ; lequel est supérieur à ceux publiés par Bourgeois et al. (2016) (0.47 ± 0.03 mM Fe²⁺/g) et par Vajic et al. (2018) (0.993 ± 0.02 mM Fe²⁺/g).

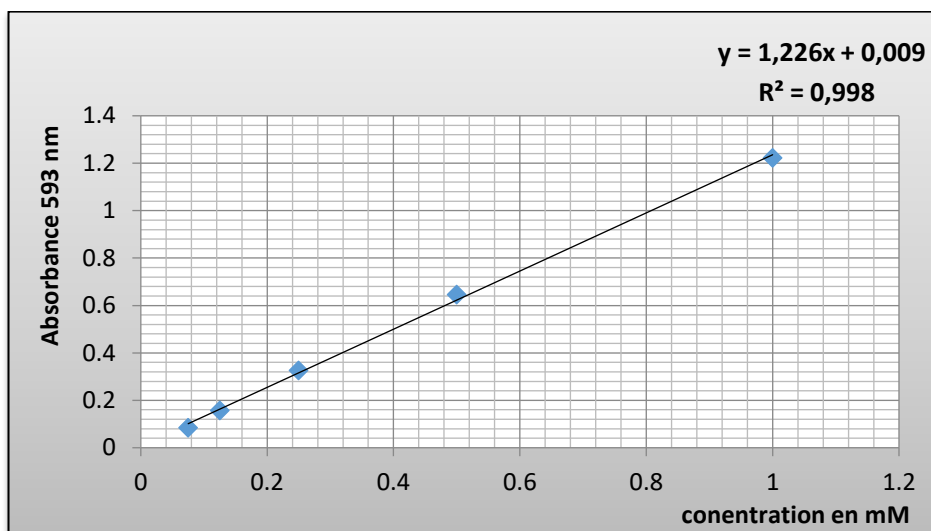


Figure 18: courbe d'étalonnage du FeSO₄ à 593nm.

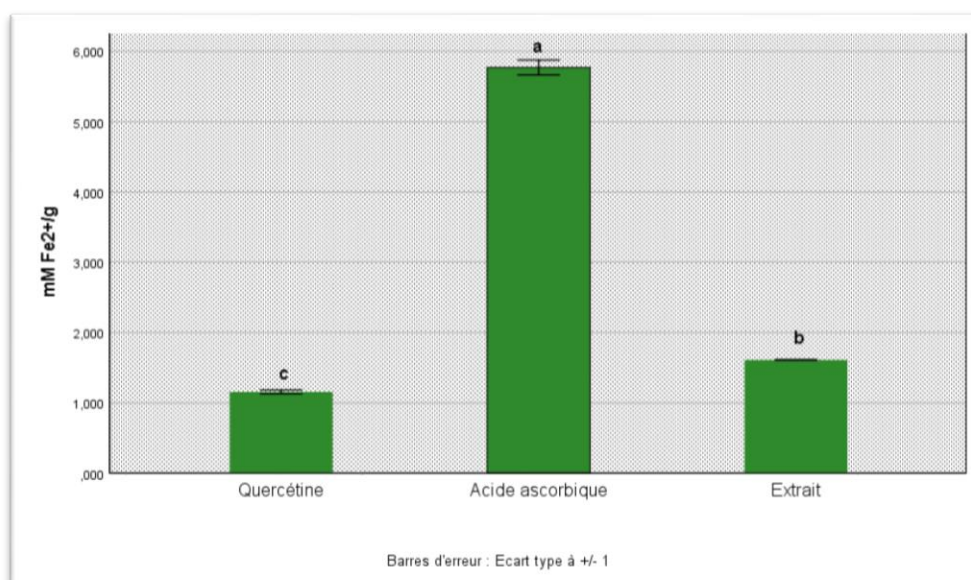


Figure 19 : Pouvoir réducteur du fer ferrique de l'extrait phénolique des feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO), de la quercétine et de l'acide ascorbique (Test Tukey, P<0.05).

III.2.1.2.4. Détermination du niveau d'inhibition du blanchiment du β -carotène

Dans la méthode de blanchissement du β -carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres due à l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylène de l'acide linoléique (Kumaran et Karunakaran, 2006), puis le radical libre va oxyder le β -carotène hautement insaturé. La présence des antioxydants dans l'extrait permet de minimiser l'oxydation du β -carotène par les hydroperoxydes. Les hydroperoxydes formés dans ce système seront neutralisés par les antioxydants des extraits (Mariod et al., 2009). Donc cette méthode est généralement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des composés dans des émulsions accompagnés de l'oxydation du β -carotène et de l'acide linoléique.

L'EPFIO a exercé une activité antioxydante très hautement significative ($P < 0.001$) pour l'inhibition de blanchiment du β -carotène. Les valeurs des IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) sont présentées dans la figure 20.

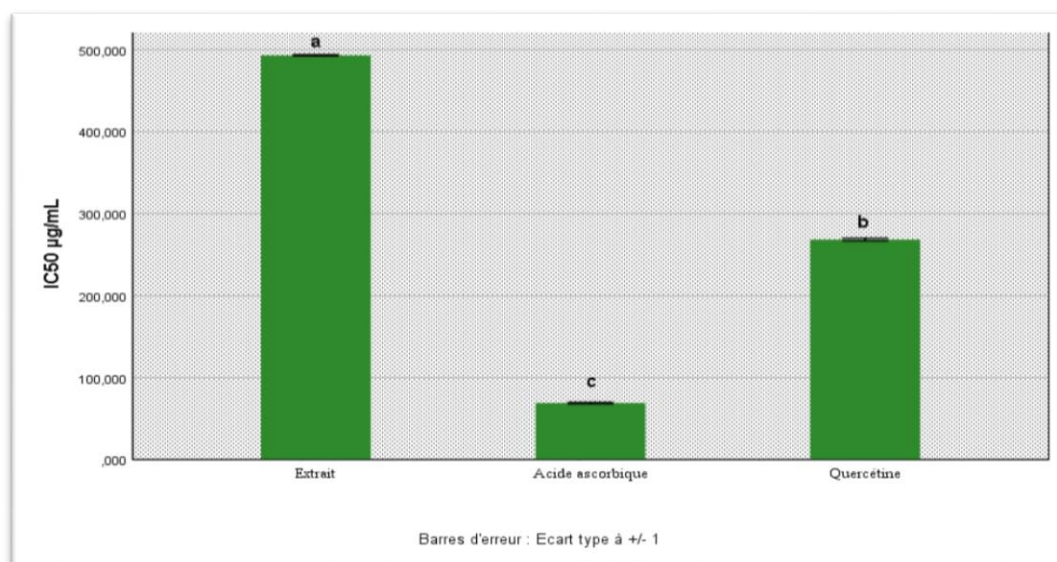


Figure 20 : Concentrations d'EPFIO, d'acide ascorbique et de quercétine inhibitrices de 50% (IC_{50} $\mu\text{g/mL}$) du blanchiment du β -carotène (test Tukey, $P < 0.05$).

La concentration de l'extrait des feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO), nécessaire à une inhibition de 50% du blanchiment du β -carotène est élevée par rapport à celles de l'acide ascorbique et de la quercétine. Le test tukey réalisé (fig. 20) confirme une différence significative ($P < 0.05$) entre les trois antioxydants (extrait EPFIO, acide ascorbique et quercétine).

L'IC₅₀ exercée par l'extrait EPFIO (492.87 ± 0.94µg/mL) est 7 fois supérieure à celle de l'acide ascorbique (68.79 ± 1.00 µg/mL) et 1.8 fois à celle de la quercétine (tableau 11).

Dans le système β-carotène / acide linoléique, le β-carotène subit une décoloration rapide en absence d'un antioxydant. Les radicaux libres de l'acide linoléique formés lors de la production d'un atome d'hydrogène à partir de l'un de ses groupes méthylène diallyliques, attaquent le β-carotène hautement insaturé. En conséquence, le β-carotène est oxydé et décomposé en partie; pour perdre ensuite sa caractéristique de couleur orange, qui est mesurée par spectrophotométrie à 470 nm (Miladi et Damak, 2008 ; Rufino et al., 2010).

Dans cet essai, la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition des hydroperoxydes diènes conjuguées résultant de l'oxydation de l'acide linoléique.

Tableau 11 : Activité antioxydante *in vitro* de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) déterminée selon quatre méthodes différentes.

	DPPH (IC ₅₀ µg/mL)	Inhibition de blanchiment de la β- carotène (IC ₅₀ µg/mL)	FRAP mM Fe ²⁺ /g	ABTS mM ET/g
EPFIO	129.42 ± 6,93 ^b	492.87 ± 0,94 ^c	1.609 ± 0,004 ^b	1.916 ± 0.02 ^b
Quercetine	121.09 ± 4.41 ^b	268.18 ± 1.76 ^b	1.157 ± 0.027 ^c	2.017 ± 0.05 ^b
Acide ascorbique	96.82 ± 0.98 ^a	68.79 ± 1.00 ^a	5.768 ± 0.106 ^a	5.785 ± 0.07 ^a

P<0.001

III.2.1.2.5. Corrélations entre les paramètres d'activité antioxydante et les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et acides hydroxycinnamiques

Les tests au DPPH, ABTS et du blanchiment du β-carotène ont permis d'évaluer la capacité de l'extrait EPFIO à piéger les radicaux libres. Le test FRAP a permis de mesurer le potentiel antioxydant des extraits en déterminant leur capacité à réduire le fer ferrique en fer ferreux.

Selon les dosages colorimétriques effectués, l'EPFIO étudié a présenté un profil phénolique (8.065± 0.012 mg EAG/g) dominé par les flavonoïdes (3.93 ±0.056 mg EQ/g) suivi des acides hydroxycinnamiques (2.159 ±0.01mg EAC/g). Ce profil a été confirmé par HPLC.

Ces résultats ont été utilisés pour le calcul d'éventuelles corrélations sur la base des coefficients de Pearson pour évaluer les relations entre les phénols totaux, les flavonoïdes, le contenu en acides hydroxycinnamiques et les activités antioxydantes et antiradicalaires de l'extrait EPFIO.

Les résultats du test statistique de corrélation Pearson sont compilés dans le tableau 12. Dans ce tableau, on peut observer une forte corrélation significative entre la teneur en polyphénols totaux (TPT) et la teneur en flavonoides totaux (TFT) ($r = 0.988$, $P < 0.05$), indiquant la probabilité que la TFT soit principalement responsable des activités antioxydantes / antiradicalaires des échantillons.

L'analyse des corrélations de Pearson a montré une forte corrélation entre les tests DPPH, ABTS et FRAP et IbBC et la TPT ; qui semble confirmer que les composés phénoliques présents dans l'extrait sont responsables à la fois des activités antiradicalaires et antioxydantes. Une autre conclusion importante est la forte corrélation négative significative entre la TPT et le FRAP ($r = - 0.951$, $P < 0.05$). Cette corrélation indique la probabilité que les composés présents dans l'extrait présentent une grande capacité à réduire les métaux lourds, ce qui suggère qu'ils pourraient également éviter certaines des voies oxydatives catalysées par les métaux.

Par ailleurs, les résultats du tableau 12 indiquent de bonnes corrélations entre les tests antiradicalaires et antioxydants, ce qui renforce la fiabilité des résultats obtenus et particulièrement ceux des tests FRAP et ABTS qui ont démontré une très forte corrélation hautement significative ($r = 1$, $P < 0.01$). Le même constat peut être fait au sujet des résultats de tests de blanchiment du β -carotène (IbBC) et DPPH qui ont montré une très forte corrélation hautement significative ($r=0.997$, $P<0.01$).

En définitive, l'EPFIO étudié présente aussi bien une activité antiradicalaire qu'une activité antioxydante. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par plusieurs auteurs pour *U. dioica* (Khare et al., 2012 ; Vajic et al., 2018 ; Carvalho et al., 2017).

Tableau 12: Corrélations de Pearson entre les paramètres d'activité antioxydante et les teneurs phénoliques totaux (TPT), en flavonoïdes totaux (TFT) et en acides hydroxycinnamiques totaux (TAHCT).

		TPT	TFT	TAHCT	DPPH	ABTS	FRAP	IbCB
TPT	Correlation r	-	0,988*	0,933	0,978*	-0,954*	-0,951*	0,986*
	P-value	-	0,012	ns	0,022	0,046	0,049	0,014
TFT	Correlation r	0,988*	-	0,880	0,961*	-0,911	-0,905	0,979*
	P-value	0,012	-	ns	0,039	ns	ns	0,021
TAHCT	Correlation r	0,933	0,880	-	0,970*	-0,997**	-0,998**	0,951*
	P-value	ns	ns	-	0,03	0,003	0,002	0,049
DPPH	Correlation r	0,978*	0,961*	0,970*	-	-0,985*	-0,983*	0,997**
	P-value	0,022	0,039	0,03	-	0,015	0,017	0,003
ABTS	Correlation r	-0,954*	-0,911	-0,997**	-0,985*	-	1**	-0,971*
	P-value	0,046	ns	0,003	0,015	-	0,001	0,029
FRAP	Correlation r	-0,951*	-0,905	-0,998**	-0,983*	1**	-	-0,968*
	P-value	0,049	ns	0,002	0,017	0,001	-	0,032
IbCB	Correlation r	0,986*	0,979*	0,951*	0,997**	-0,971*	-0,968*	-
	P-value	0,014	0,021	0,049	0,003	0,029	0,032	-

Le stress oxydatif a été relié à plusieurs problèmes de santé comme l'artériosclérose, le cancer, la maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, le diabète et l'asthme (Edris, 2007). L'équilibre cellulaire des radicaux libres est maintenue par différents antioxydants (Raut et Karuppayil, 2014). L'antioxydant peut agir sous différents mécanismes comme le piégeage des radicaux libres, par la décomposition des radicaux libres et par la chélation des ions métalliques (Cam et al., 2009). Toutes ces activités sont reliées aux composés de la plante, incluant les composés phénoliques et les flavonoïdes (Tomaino et al., 2005, Ferguson et Philpott, 2008; Miguel, 2010 ; Viuda-Martos et al., 2011 ; Sanchez-Vioque et al., 2013 ; Raut & Karuppayil, 2014).

Selon **Miguel (2010)**, ces composés font preuve de capacité à piéger les radicaux libres et d'inhiber la peroxydation des lipides en scindant la chaîne entre le pyroxyle et le radical piégeur. En plus, les phénols piègent directement les espèces réactives de l'oxygène (le radical hydroxyle, peroxydinitrite et l'acide hypochlorique).

III.2.1.3. Méthodes d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO)

L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait de l'EPFIO, a été réalisée par deux méthodes : l'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine et la stabilisation de la membrane érythrocytaire vis-à-vis de l'hémolyse.

III.2.1.3.1. Test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine

La dénaturation des protéines est un processus pathologique par lequel ces molécules perdent leur configuration et par conséquent leur fonctionnalité (**Tripathi, 2008**).

L'augmentation de l'absorbance des échantillons d'essai par rapport au contrôle témoigne de la stabilisation de l'albumine sérique bovine (BSA). Cela indique que l'extrait EPFIO et l'ibuprofène (témoin positif) ont exercé une inhibition de la dénaturation thermique de cette protéine.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de la BSA attestant l'activité anti-inflammatoire est présenté dans le tableau 13. Le traitement de la protéine BSA avec la plus faible concentration d'EPFIO (50 µg/mL) a entraîné une inhibition de la dénaturation très hautement significative ($P < 0.001$) de $60.82 \pm 0.39\%$. Ce taux est légèrement inférieur à celui de l'ibuprofène qui est de $63.92 \pm 0.16\%$. Le traitement de la protéine avec la concentration de l'EPFIO la plus élevée (1000 µg/mL) a conduit à une inhibition hautement significative ($P < 0.01$) de $72.38 \pm 1.7\%$ toujours inférieur au standard $79.56 \pm 0.62\%$.

L'effet anti-dénaturation est souvent accompagné par la diminution de la viscosité des solutions protéiques qui augmente lors de la dénaturation (**Chandra et al., 2012**).

Tableau 13 : Effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur l'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (%)	
	Ibuprofène	EPFIO
50	$63.92 \pm 0.16^{***}$	$60.82 \pm 0.39^{***}$
100	65.64 ± 0.55	65.79 ± 0.45
250	$72.14 \pm 0.63^*$	$69.74 \pm 1.08^*$
500	$77.48 \pm 0.99^{**}$	$70.93 \pm 1.72^{**}$
1000	$79.56 \pm 0.62^{**}$	$72.38 \pm 1.7^{**}$

ANOVA : * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

La dénaturation des protéines peut avoir lieu lors d'un processus inflammatoire auto-immune dans lequel la production d'auto-antigènes est augmentée comme dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (Flavelle, 2002). Ainsi, tout produit qui empêche la dénaturation des protéines peut être un agent anti-inflammatoire efficace (Mounnissamy et al., 2008).

Etant donné la rareté des publications sur l'inhibition de la dénaturation de la BSA par les polyphénols de l'ortie, nos résultats sur ce point précis n'ont pas pu être comparés avec ceux d'autres travaux menés sur les feuilles et inflorescences d'ortie. Néanmoins, l'effet anti-inflammatoire de notre extrait est supérieur à celui d'extrait de *Pergularia daemi* (20.4% à 50 $\mu\text{g/mL}$), utilisée en phytothérapie (Sridevi et al., 2015). L'activité inhibitrice de la dénaturation protéique d'extrait de café (100%) utilisé à une concentration de 62.5 $\mu\text{g/mL}$ rapportée par Chandra et al. (2012) est bien supérieure à celle obtenue avec l'EPFIO dans ce travail.

Dans les travaux de Leelaprakash et MohanDass (2011) sur *Enicostemma axillare* (plante vivace de l'Inde), l'extrait présentait une inhibition de la dénaturation protéique de 32% et l'aspirine de 68% à la concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$. Le résultat obtenu par l'EPFIO dans la présente étude à la même concentration est deux fois supérieur à l'effet de leur extrait et légèrement inférieur à celui de l'aspirine. L'inhibition *in vitro* de la dénaturation protéique par l'EPFIO peut être attribuée à sa teneur en polyphénols, vraisemblablement suite à l'effet synergique de plusieurs composés plutôt qu'à celui d'un seul constituant.

Il a été rapporté que l'une des caractéristiques de plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens est leur capacité à stabiliser (prévenir la dénaturation) l'albumine traitée thermiquement au pH physiologique (pH: 6,2-6,5) (Suresh Kumar et Mishra, 2008). Par conséquent, d'après les résultats de la présente étude préliminaire, on peut conclure que l'ortie possède un effet anti-inflammatoire in vitro marqué contre la dénaturation des protéines.

III.2.1.3.2. Test de stabilité de la membrane des globules rouges humains vis-à-vis de

l'hémolyse

La stabilisation de la membrane érythrocytaire par l'EPFIO est dose-dépendante car son effet de protection augmentait avec les concentrations croissantes (50, 100, 250, 500 et 1000 µg/mL). Les résultats de l'effet de l'extrait par rapport au standard, le Diclofénac de sodium, sont reportés dans le tableau 14.

Tableau 14 : Effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur la stabilisation de la membrane des globules rouges vis-à-vis de l'hémolyse (HRBC).

Concentration (µg/mL)	Inhibition de la lyse membranaire HRBC(%)	
	Diclofenac-sodium	EPFIO
50	52.53 ± 0.64***	32.92 ± 1.00***
100	61.65 ± 0.93***	35.50 ± 1.2***
250	72.64 ± 0.79***	43.95 ± 2.20***
500	84.69 ± 1.00***	47.95 ± 1.59***
1000	89.22 ± 1.19*	60.44 ± 10.62*

ANOVA : *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

L'activité anti-inflammatoire du Diclofenac (AINS) et celle de l'EPFIO était significative pour la concentration de 1000 µg/mL, et très hautement significative pour le reste des concentrations. À la concentration de 1000 µg/mL, l'EPFIO a permis une protection des hématies contre la lyse membranaire avec un taux de 60.44%. Ce taux a été obtenu avec le Diclofenac à une concentration 10 fois moindre (100 µg/mL).

Dans les travaux de Sridevi et al. (2015), l'inhibition de la lyse membranaire induite par hypotonie d'*Enicostemma axillare* est de 35.2% à 100 µg/mL, ce taux est similaire à celui enregistré dans ce travail avec *U. dioica*.

Cette activité protectrice de l'EPFIO vis-à-vis de la lyse membranaire des globules rouges a été attribuée aux diverses fractions de polyphénols comme les flavonoïdes et les acides phénoliques. Les flavonoïdes sont des médiateurs pro-inflammatoires bien connus dans la pathogenèse de l'inflammation (Wu et Ng, 2010 ; Yam et al., 2009).

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).

Au cours de l'inflammation, il y a la lyse des lysosomes qui libèrent les enzymes qui provoquent un désordre. Les AINS exercent leurs effets bénéfiques en inhibant la libération des enzymes lysosomales en stabilisant les membranes lysosomales (Mounnissamy et al., 2008). L'exposition des globules rouges (GR) à des substances nocives telles que le salicylate de méthyle ou la phénylhydrazine ou leur exposition à l'hypotonie ou la chaleur, a comme résultat la lyse des membranaires, accompagnée de l'hémolyse et l'oxydation de l'hémoglobine (Feirrali et al., 1992).

La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale et selon Chou (1997), la stabilisation de la membrane érythrocytaire par l'extrait implique qu'il a la capacité de stabiliser la membrane lysosomale. Les composés avec la propriété stabilisante de membranes sont bien connus avec leur capacité d'interférer dans la réponse inflammatoire précoce, surtout l'empêchement de l'intervention des phospholipases qui déclenchent la formation des médiateurs inflammatoires (Aitadafoun et al., 1996). Shallangwa et al. (2013) ont également démontré les liens entre l'activité antioxydante des flavonoïdes et leur activité anti-inflammatoire.

III.2.1.4. Méthode d'évaluation de la neurotoxicité de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO)

La toxicité de l'extrait d'*U. dioica* sur des cellules CAD a été examinée à l'aide du test MTT (bromure de 3- [4,5-diméthyl-2-thiazolyl] -2,5, diphényltétrazolium).

Les résultats présentés à la figure 21 sont hautement significatifs ($P < 0.01$) et indiquent que l'espèce *U. dioica* utilisée à des concentrations de 0.1 à 1 mg/mL de l'EPFIO ne montre aucune neurotoxicité chez les cellules CAD ($p < 0.01$).

Nos résultats concordent avec ceux de **Fattahi et al. (2014)** qui ont rapporté l'effet cytotoxique de l'extrait aqueux d'ortie sur les lignées cellulaires BT-474 et Hela après 24, 48 et 72 h d'exposition. Ils ont constaté que la viabilité des cellules BT-474 n'a pas été affectée par des concentrations d'extrait allant jusqu'à 1.5mg/ mL ; mais a été affectée à 3mg/mL. Aucun changement significatif n'a été détecté pour les cellules Hela, même en présence de 3 mg/mL d'extrait après 3 jours d'exposition.

Par ailleurs, **Konrad et al. (2000)** ont montré que la réduction de la croissance des cellules MCF-7 après une exposition de 5 jours à l'extrait méthanolique d'ortie de 1 à 6mg/mL, n'était que de 30%.

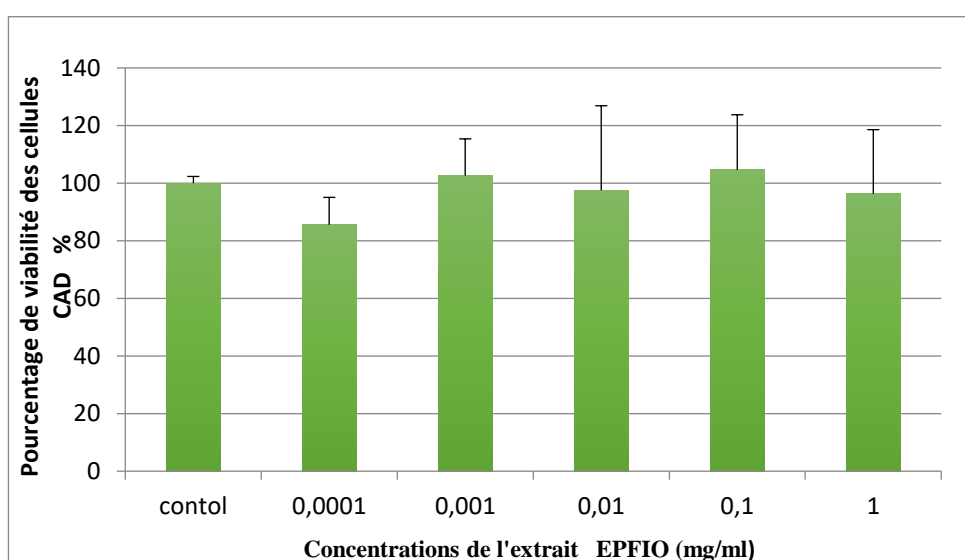


Figure 21 : Effet du traitement des cultures de cellules cancéreuses CAD avec l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) pendant 24 h sur la viabilité cellulaire $P < 0,01$

Bien que la feuille et la racine d'*U. dioica* se chevauchent légèrement dans leurs activités, chacune de ces parties de la plante a des effets uniques. Ainsi, selon le type de cancer, différentes parties de la plante peuvent être efficaces pour le traitement. Par exemple, l'*Urtica dioica* agglutinin (UDA), une lectine spécifique de la racine d'ortie, est largement utilisée dans le traitement du cancer de la prostate (**Konrad et al., 2000 ; Wagner et al.,**

1995). En outre, il a été démontré que la feuille d'ortie peut diminuer la prolifération de la lignée cellulaire MCF-7 (Fattahi et al., 2013; Guler et al., 2013).

Par conséquent, il n'y a pas toujours de relation directe entre les quantités de composants antioxydants tels que les flavonoïdes et les composés phénoliques avec l'efficacité du traitement du cancer. Cela peut également être dû à des différences dans les quantités de divers récepteurs de surface cellulaire ou constituants de transduction de signal dans chaque type de cellule (Fattahi et al., 2014).

III.2.2. Les expériences in vivo

III.2.2.1. Détermination de la toxicité aigüe de l'extrait phénolique de feuilles et

d'inflorescences d'ortie (EPFIO) d'ortie chez le rat Wistar

La toxicité aigüe est la capacité d'une substance toxique à causer des effets via une seule administration pendant une courte durée (Walum, 1998). Dans cette étude, l'administration par voie orale de différentes doses (500,1000, 1500 et 2000 mg/kg p.c) de l'EPFIO n'a induit aucun signe visible de toxicité ou mort instantanée chez les rats testés au cours de la période d'observation. Par conséquent, la DL_{50} est > 2000 mg /Kg p.c.. L'évaluation de la toxicité aigüe est la première étape dans l'investigation toxicologique des substances inconnues. L'index de la toxicité aigüe est la DL_{50} .

Les résultats de cette étude sont similaires à ceux de Dar et al. (2012), qui n'ont observé aucune toxicité cellulaire ni troubles hématologiques avec une concentration en extrait de feuilles d'ortie de 2000mg/Kg poids corporel.

Doukkali et al. (2015) rapportent que l'administration orale d'extrait méthanolique de feuilles de d'*U. urens* (la petite ortie) à une dose de 2000 mg/kg de poids corporel de souris adultes n'induit aucun changement significatif du poids corporel entre le groupe traité et le témoin, avec absence de signes de toxicité tels que convulsions, hypothermie, hyperactivité. Ces résultats corroborent avec ceux de la présente étude.

III.2.2.2. Détermination de l'activité analgésique de l'extrait phénolique de feuilles et

d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar

III.2.2.2.1. Test du writhing : constriction abdominale

Un analgésique périphérique est un analgésique qui supprime ou atténue la douleur par action périphérique sans provoquer une perte de conscience. La méthode de l'acide acétique

est la méthode la plus répandue dans l'évaluation de l'activité analgésique périphérique (**Duraisankar et Ravichandran, 2012**). L'administration orale de l'EPFIO (100, 200 et 300 mg /Kg) chez les rats a réduit significativement ($P < 0.05$) les constrictions abdominales.

Les résultats sont présentés dans la figure 22. L'EPFIO a présenté une protection contre la douleur légèrement supérieure à celle de l'aspirine. Il n'existe pas de différence significative ($P = 0.8$) entre le pourcentage de protection de l'aspirine et celui de l'extrait avec la concentration de 100mg/kg, avec des taux de $85.53 \pm 5.39\%$ et $86.84 \pm 5.43\%$, respectivement.

Les trois concentrations 100, 200 et 300 mg/kg d'EPFIO ont permis l'obtention de pourcentages de protection contre la douleur d'environ 86.84 ± 5.43 , 95.45 ± 3.10 et $96.52 \pm 3.40 \%$, respectivement et qui sont comparables car aucune différence significative ($P = 0.11$) n'a été enregistrée entre eux.

Les niveaux d'anti-douleur obtenus dans ce travail sont supérieurs à ceux rapportés par **Dhouibi et al. (2017)** qui avec une concentration de 400 mg/kg de poids corporel d'extrait éthanolique de feuilles d'*U. dioica*, ont obtenu un pourcentage de protection de 91.8%. Dans les travaux de **Hajhashemi et Klooshami (2012)**, l'extrait hydroalcoolique de feuille d'*U. dioica* a induit un pourcentage de protection de 81% à 400mg/kg.

Le test de contorsions induites par l'acide acétique chez le rat est largement utilisé pour cribler et étudier des composés pour l'activité anti-nociceptive à médiation périphérique et est considéré comme une méthode appropriée (**Khan et al., 2009**). L'administration péritonéale d'acide acétique péritonéal (0.6%) provoque des médiateurs endogènes de la douleur, tels que les prostaglandines, la sérotonine (5-HT), la bradykinine, l'histamine et la substance P qui sensibilisent la terminaison nerveuse de la douleur (**Collier et al., 1968 ; Khan et al., 2009**).

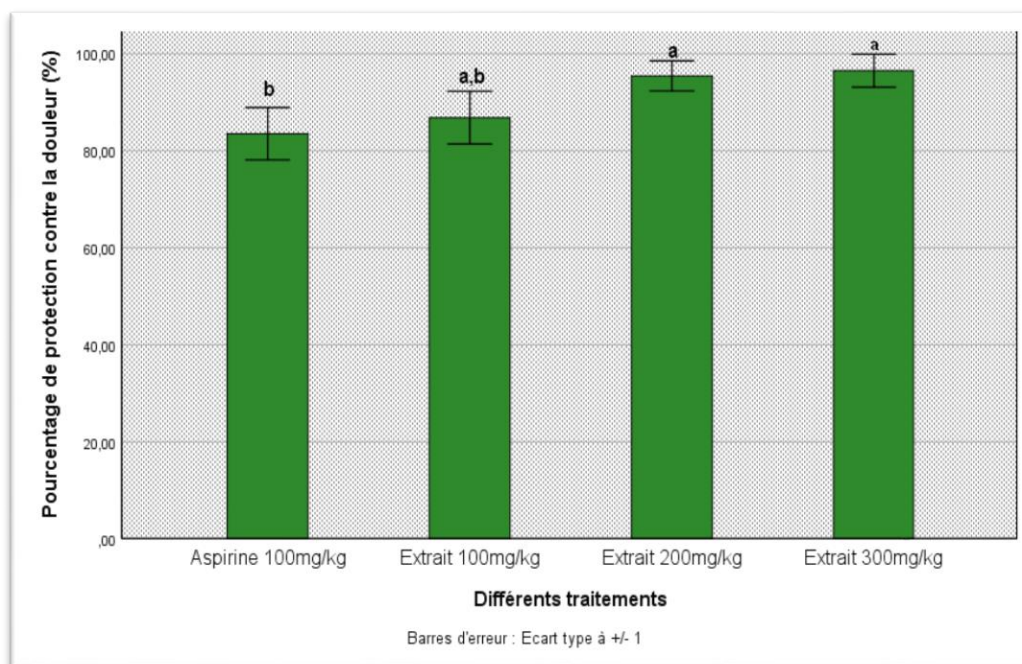


Figure 22: Effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur le pourcentage de protection contre la douleur induite par l'injection de l'acide acétique ($P < 0.05$).

Parmi les prostanoïdes, la prostacycline (PGI₂) était principalement responsable de la causalité de la douleur suite à l'administration d'acide acétique (Ronaldo et al., 2000). Au cours des 30 premières minutes après l'injection d'acide acétique, les taux de prostaglandines augmentent pendant le test de contorsion (Murata et al., 1997). L'acide acétique provoque une sensation de douleur due à la libération des médiateurs endogènes cités précédemment.

Ces produits chimiques endogènes stimulent les terminaisons nerveuses et les récepteurs péritonéaux qui ont conduit à la production de contractions abdominales en réponse. Il a été rapporté que la constriction abdominale est liée à la sensibilisation des récepteurs nociceptifs aux prostaglandines (Deraedt et al., 1980; Ismail et al., 2015).

L'irritation locale produite par une injection intrapéritonéale d'acide acétique provoque la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine (IL-1, IL-6, IL-8) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) (Sengar et al., 2015).

L'inhibition exercée par l'EPFIO suggère une activité analgésique à médiation périphérique et l'extrait exerce probablement une activité en inhibant la biosynthèse, la libération et l'action des prostaglandines. Toutes les doses de l'EPFIO ont induit une

diminution des constrictions abdominales produites par l'acide acétique d'une manière dose-dépendante.

L'acide acétique provoque des douleurs inflammatoires en induisant une perméabilité capillaire (Amico-Roxas et al., 1984 ; Nwafor et al., 2007), et en partie via les récepteurs péritonéaux de la concentration de PGE2 et PGF2a (Bentley et al., 1983).

III.2.2.2.2. Test à la formaline

L'essai à la formaline est un modèle applicable et fiable de nociception. Cette méthode renseigne sur les activités centrales et périphériques. L'injection sous-cutanée de 20 µL de la formaline à 5% dans la patte arrière droite du rat a induit une réponse nociceptive biphasique (phase I appelée la douleur neurogène et phase II appelée la douleur inflammatoire).

Comme il est reporté dans les figures 23 et 24, l'extrait EPFIO dans cette expérience a réduit d'une manière très hautement significative ($P < 0.001$) dose dépendante le temps de lèchement dans la phase précoce et d'une manière hautement significative ($P < 0.01$) dans la phase retardée. L'extrait a réduit la nociception dans la première phase de 34.53 ± 4.65 ; 46.22 ± 2.25 et $48.82 \pm 0.77\%$ à des concentrations d'EPFIO de 100, 200 et 300 mg/kg p.c., respectivement. L'indométacine n'a pas réduit le temps de lèchement durant cette phase.

Pendant la deuxième phase, l'extrait a réduit le temps de lèchement avec un effet protecteur maximum de $60.39 \pm 0.89\%$ à une concentration de 300mg/kg poids corporel. L'indométacine a un effet de $46.22 \pm 2.28 \%$ à 10mg/kg au cours cette phase, ce pourcentage est similaire à celui de notre extrait ($46.17 \pm 5.93\%$) à la concentration de 100 mg/kg.

Ces niveaux de réduction du temps de lèchement obtenus dans ce travail sont supérieurs à ceux rapportés par Hajhashemi et Klooshami (2012) avec des extraits de feuilles d'ortie au cours de la première phase et qui se chiffrent à 26% et 39.8% à des concentrations de 200 et 400 mg/kg, respectivement. Par contre, au cours de la deuxième phase, nos résultats étaient inférieurs car ces auteurs avaient enregistré 6, 60.2 et 94.8% à des concentrations d'extrait de feuilles d'ortie de 100, 200 et 400mg/kg, respectivement. Ces résultats sont en accord avec ceux qui ont été rapportés pour *U. urens* (une autre espèce d'*Urtica*) par Marrassini et al. (2010).

La première phase est caractérisée par l'activation des fibres C et la libération de la substance P et la deuxième phase retardée est due à la libération des médiateurs de

l'inflammation tels que la sérotonine, l'histamine, la bradykinine, et les prostaglandines initiés par les fibres C (Shibata et al., 1989).

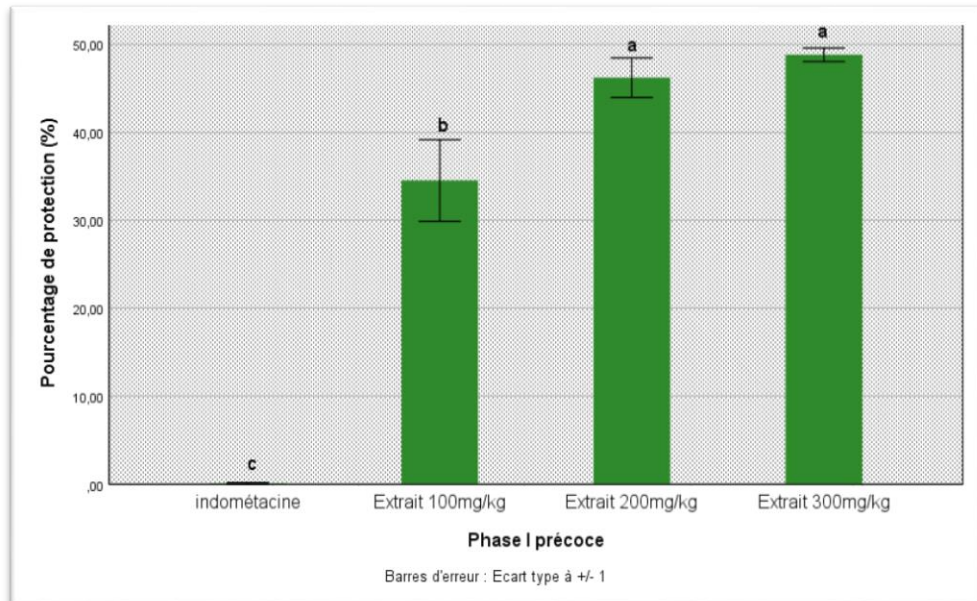


Figure 23 : Effet analgésique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) et de l'indométacine sur la première phase de douleur (première 5min) (ANOVA, $P < 0.001$)

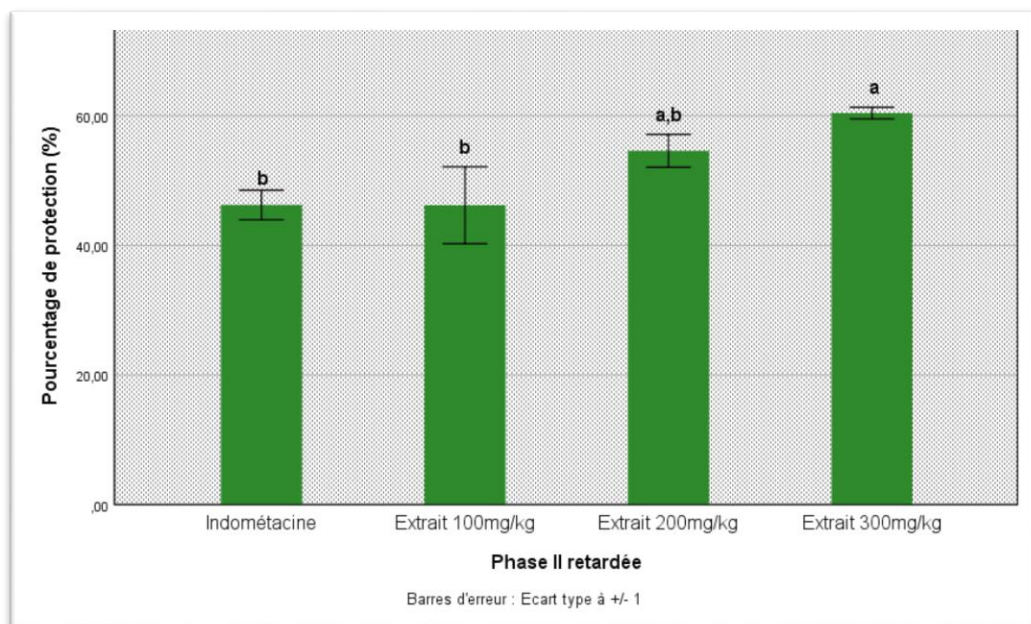


Figure 24 : Effet analgésique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) et de l'indométacine sur la deuxième phase de douleur (entre 15 et 30min) (ANOVA, $P < 0.01$)

Les composés à action centrale comme les antalgiques narcotiques inhibent les deux phases ; la phase précoce et retardée ; tandis que les composés à action périphérique inhibent seulement la phase retardée (**Banerjee et al., 2013**). Le profil bioactif de l'EPFIO et son activité antioxydante préalablement démontrés justifie son activité analgésique

III.2.2.3. Détermination de l'activité antipyrétique de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar

L'effet de l'extrait EPFIO sur l'hyperpyrexie induite par la levure de bière est indiqué dans le tableau 15. L'injection sous-cutanée de la suspension de la levure de bière a provoqué l'élévation de la température chez les rats après 17h d'administration de la suspension.

L'effet de cet extrait sur la température corporelle était significatif ($P < 0.05$) aux trois concentrations 100, 200 et 300mg/kg. La réduction de la température provoquée par la levure de bière commence après la troisième heure pour l'EPFIO et le paracétamol.

Le calcul de la diminution de température rectale à partir de la différence entre la température atteinte après 2h et la température après 5h de l'administration du traitement, permet de constater que l'extrait a induit une diminution de 2.25°C à 300mg/kg, ce résultat est comparable à celui du paracétamol (10 mg/kg) qui a permis une diminution de 2.34°C.

Les deux concentrations de l'extrait 100 et 200 mg/kg ont induit des diminutions de 1.17 et 1.58°C, respectivement.

La pyrexie ou la fièvre peut être provoquée par une infection, des dommages de tissus, une inflammation ou par le rejet de greffe. Le tissu infecté ou endommagé provoque la formation de médiateurs pro-inflammatoires (les cytokines comme les interleukines 1β , α , β et $TNF\alpha$) qui augmentent la synthèse de PGE2 au niveau de l'hypothalamus et déclenchent par ce fait l'élévation de la température corporelle (**Math et al., 2011 ; Duraisankar et Ravichandran, 2012**). En général les AINS exercent leur action antipyrétique par l'inhibition de la synthèse de PG au sein de l'hypothalamus (**Weissmann et al., 1980**).

Par conséquent, il s'avère que l'action antipyrétique de l'EPFIO peut être liée à l'inhibition de la synthèse de PG dans l'hypothalamus. La régulation de la température corporelle exige un équilibre sensible entre la production et la perte de la chaleur et l'hypothalamus contrôle le point de réglage pour rendre la température à sa valeur normale (**Ushikubi et al., 1998**). L'effet antipyrétique de l'extrait est dû probablement à la présence

des flavonoïdes. Ces derniers sont connus avec leur effet antipyrétique, par la suppression de TNF- α (Adesokan et al., 2008).

Tableau 15: Effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur la pyrexie induite par la levure de bière.

Traitement	Température rectale (°C) avant traitement (-17h)	Température rectale (°C) après le traitement				
		1h	2h	3h	4h	5h
Contrôle (eau distillée)	36.53±0.05**	38.16±0.01	38.25±0.18***	38.43±0.11***	38.53±0.09*	38.37±0.04**
EPFIO (100mg/kg)	36.13±0.42*	38.72±0.12** *	38.65±0.46	38.21±0.06**	38.17±0.05*	37.48±0.2**
EPFIO (200mg/kg)	35.90±1.08	38.78±2.0*	38.6±1.11*	38.17±0.92	37.44±0.8*	37.02±0.41
EPFIO (300mg/kg)	36.37±0.11**	38.18±0.51** *	38.25±0.67**	37.03±1.02**	36.47±0.15***	36.0±0.80*
Paracétamol (10mg/kg)	36.48±0.61*	38.11±1.31*	38.45±0.03*	38.01±0.24*	37.2±0.53***	36.11±1.4***

Chaque valeur présente la moyenne \pm ET (n=5). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

III.2.2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) chez le rat Wistar : test d'œdème induit par la carragénine

III.2.2.4.1. effet de l'extrait phénolique de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) sur l'évolution de l'œdème de la patte de rat

Les résultats de l'inhibition de l'œdème de la patte induit par la carragénine, sur un modèle animal et couramment utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire. L'injection de carragénine est à l'origine d'une réaction inflammatoire vasculoexudative. L'œdème résulte donc, d'une augmentation de la pression hydrostatique due à la vasodilatation et surtout d'une augmentation de la perméabilité de la paroi des petits vaisseaux sous l'effet des médiateurs chimiques (Weill et Batteux, 2003).

Les courbes de la figure 25 montrent que l'évolution de la taille de l'œdème, suite à l'injection de la carragénine, évolue de manière temps-dépendant et atteint son maximal après trois heures ; cela correspond à ce qui a été décrit dans les travaux de Kirkova *et al.* (1992). En effet, la carragénine provoque une augmentation de la synthèse de cyclooxygénase de type 2 (COX-2) et de prostaglandine type E2 (PGE2) (Nantel *et al.*, 1999 ; Posadas *et al.*, 2004).

Les différentes concentrations d'EPFIO utilisées (50, 100, 150, 200 et 250 mg/kg de poids corporel) ont réduit l'épaisseur et le volume de de l'œdème dont la taille se retrouve diminuée. Les deux concentrations d'EPFIO (250 et 200mg/kg) ont permis une réduction de la taille de l'œdème plus élevée que celle obtenu avec le diclofénac d'une manière très hautement significative ($P < 0.001$).

L'œdème se forme dans la première heure qui suit l'injection de la carragénine pour atteindre sa taille maximale à la 3^{ème} heure et commence à diminuer à partir de la 5^{ème} heure après l'injection. Pour cela, les pourcentages d'inhibition de l'évolution de l'œdème à 1h, 3h et 6h sont présentés dans les figures 26, 27et 28, respectivement.

Après une heure de l'injection, l'effet du diclofénac et de l'EPFIO à différentes concentrations sur le pourcentage d'inhibition de l'œdème était hautement significative ($P < 0.01$). L'extrait a enregistré des pourcentages d'inhibition de minimum $54.33\% \pm 20.88$ (50 mg/kg) et de maximum $87.35\% \pm 7.83$ (250mg/kg).

Il n'existe pas de différence significative entre le pourcentage d'inhibition du diclofenac ($60.18\% \pm 18.83$ à 10mg/kg) et celui de l'extrait EPFIO aux concentrations 50, 100, 150 et 200mg/kg ($P=0.099$, test Tukey) ; ainsi qu'entre le pourcentage d'inhibition de l'extrait à 250mg/kg qui est le plus élevé, le diclofenac, l'extrait EPFIO à 150 et 200mg/kg ($66.74\% \pm 7.92$ et $81.73\% \pm 7.48$, respectivement) ($P=0.104$, test Tukey).

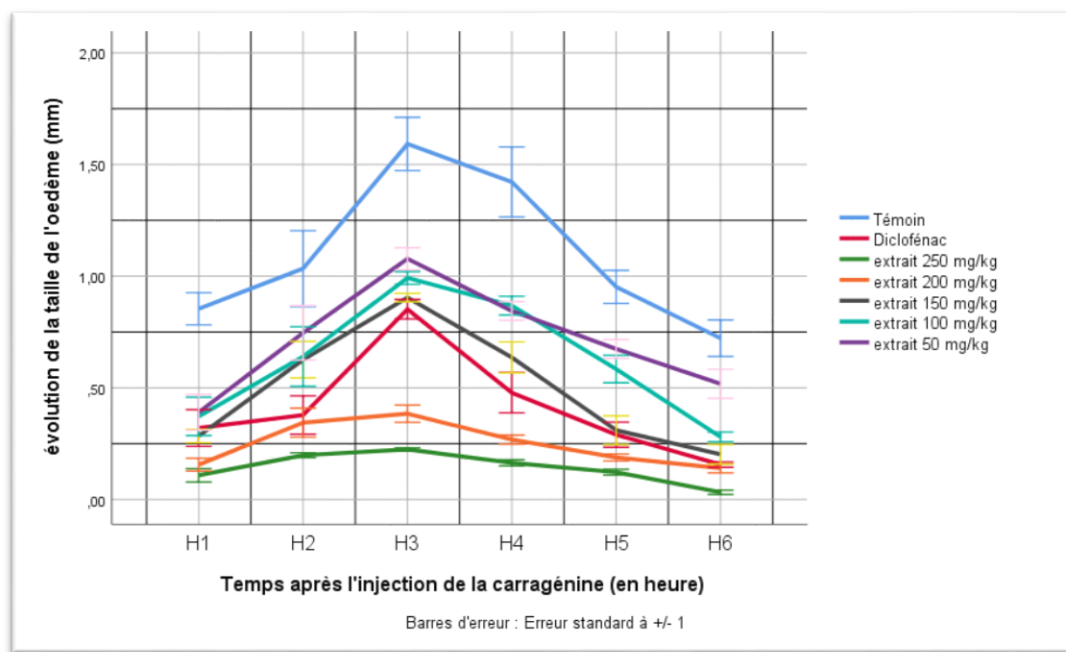


Figure 25 : Évolution de la taille de l'œdème en (mm) pendant les 6 heures qui ont suivi l'injection de carragénine chez les rats traités par différentes concentrations d'EPFIO en comparaison avec le standard, le diclofenac ($P<0.001$).

Ce résultat est probablement dû au fait que l'EPFIO a aussi une action, comme le diclofenac (AINS), qui passe par l'inhibition de la prostaglandine par inhibition des cyclooxygénases (Vergne et al., 2000), car l'augmentation des concentrations de ces enzymes passe par un optimum entre 1h et 2h après l'injection de la carragénine (Nantel et al., 1999).

La diminution des pourcentages d'inhibition de l'œdème 3h après l'injection de la carragénine par rapport à ceux enregistrés à 1h après est probablement due à l'augmentation maximale de la taille de l'œdème au bout de 3h suite à la réaction inflammatoire résultante de la lésion tissulaire provoquée par la carragénine. Ceci a pour conséquence l'induction de la synthèse de l'histamine, des prostaglandines, des leucotriènes (Ammon et al., 1993), du PAF (facteur d'activation plaquettaire), des cytokines, du NO (Monoxyde d'azote) et du TNF (facteur de nécrose tumorale) (Clarke et al., 1996).

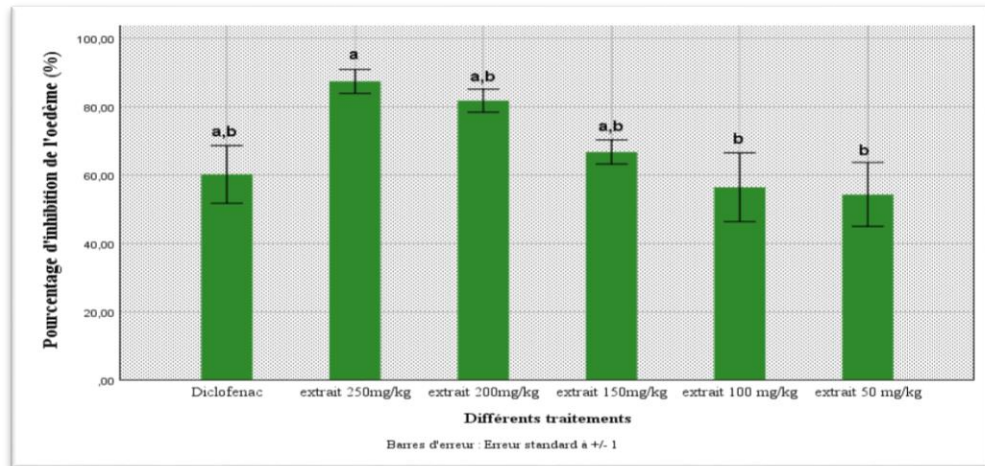


Figure 26 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème 1 heure après l'injection de la carragénine 1% (ANOVA $P < 0.01$, test Tukey).

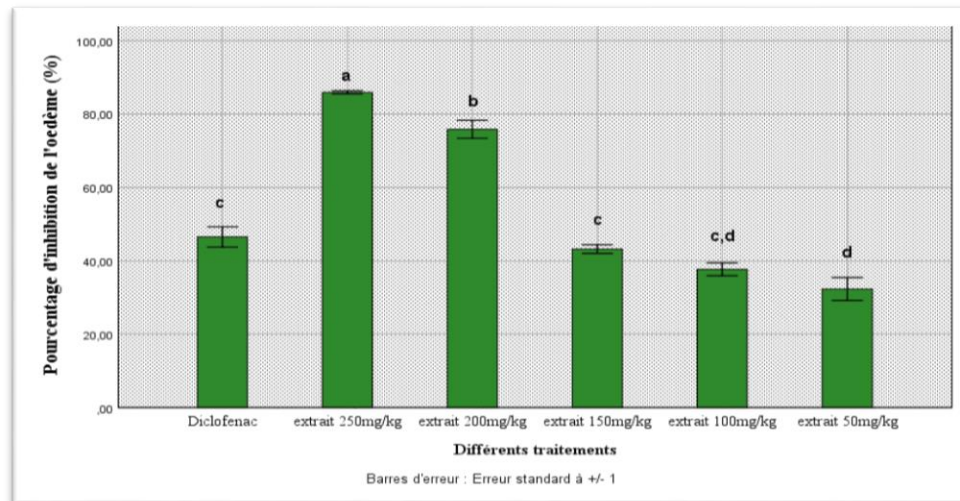


Figure 27 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème 3 heures après l'injection de la carragénine 1% (ANOVA $P < 0.001$, test Tukey)

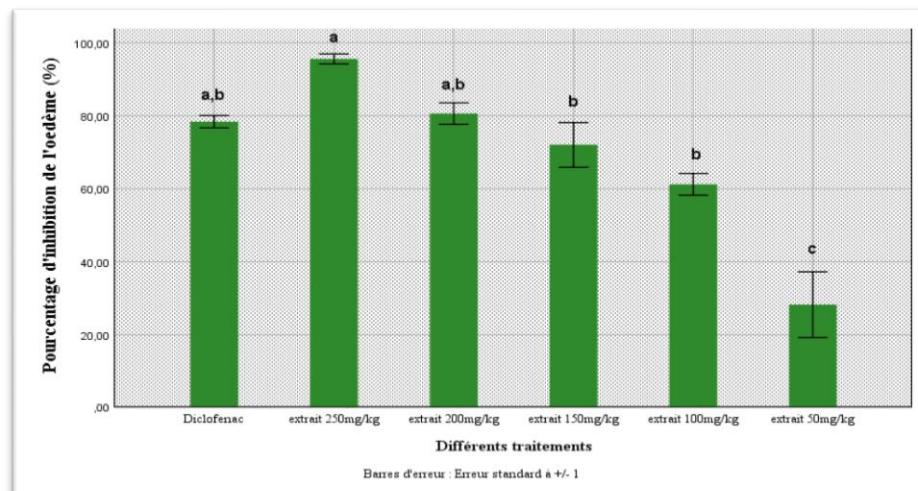


Figure 28 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème 6 heures après l'injection de la carragénine 1% (ANOVA $P < 0.01$, test Tukey).

Le diclofenac atteint son maximum d'inhibition de l'œdème qui est de $78.39\% \pm 3.74$ 6h après l'injection de la carragénine, mais il reste devancé par l'EPFIO aux concentrations de 200 et 250 mg/kg avec des pourcentages de $80.6\% \pm 6.94$ et $95.56\% \pm 3.23$ respectivement. Ces niveaux d'inhibition sont supérieurs à ceux obtenus par **Dar et al. (2012)** qui ont enregistré des pourcentages d'inhibition d'œdèmes de 25.64, 33.33 et de 51.28% avec des extraits aqueux, méthanolique et d'hexane de feuilles d'ortie, respectivement.

D'après nos résultats, il est possible que l'EPFIO ait inhibé la libération de certains médiateurs de l'inflammation (sérotonine, histamine et bradykinine) ainsi que les prostaglandines. Les activités anti-inflammatoires d'*U. dioica* peuvent être attribuées à certains de ses constituants comme les acides phénoliques et les flavonoïdes, qui sont des antagonistes de l'histamine, des inhibiteurs de la phosphodiesterase et des piègeurs de radicaux libres. Certains flavonoïdes inhibent aussi la production de cytokines, l'expression et la sécrétion du TNF- α (**Gonzalez-Gallego et al., 2010**)

III.2.2.4.2. Effet de l'extrait phénolique de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur les marqueurs de l'inflammation

III.2.2.4.2.1. Effet de l'extrait phénolique de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur les niveaux de la C-Protéine Réactive (CRP) et de l'albumine

Une technique automatisée immunoturbidimétrique a été employée pour le dosage de la CRP et de l'albumine. Les résultats du dosage de la C- reactive protein et de l'albumine sont reportés au tableau 16. Les concentrations de la CRP, enregistrées pour le lot de référence (3.94mg/mL) et l'EPFIO aux deux concentrations 250 et 200 mg/mL (4.04 et 5.47 mg/mL, respectivement), sont inférieures à celle du témoin négatif (rats traités avec du Diclofenac) qui est de 6 mg/mL. Cependant, il n'existe pas de différence significative ($P=0.781$) entre les niveaux de CRP de ces quatre lots.

Le test ANOVA révèle un effet hautement significatif ($P<0.01$) des différents traitements sur la concentration de la CRP. Une augmentation du niveau de la CRP chez le lot de rats non traités (témoin positif) a été enregistrée avec une concentration de 47.27 mg/mL. Cette dernière est presque 12 fois plus élevée que la moyenne de concentration de la CRP pour les rats du lot de référence qui est de 3.94 mg/mL.

Dans toutes les espèces animales étudiées, une augmentation rapide de la concentration en CRP est notée dans les heures qui suivent une agression (**Eckersall et al.,**

1996 ; Burger et al., 1992). Les cytokines de la réaction inflammatoire (CRI) libérées dans la circulation vont être responsables de la réponse systémique de la réaction inflammatoire et l'augmentation de la concentration plasmatique d'un certain nombre de protéines d'origine hépatique appelées protéines de la réaction inflammatoire positive (PRI+) comme la C-Protéine Réactive (CRP). D'autres protéines, également d'origine hépatique, voient leur concentration plasmatique diminuer, ces protéines s'appellent protéines de la réaction inflammatoire négative (PRI-) comme l'albumine (Engler, 1993).

Tableau 16 : Effet des différentes concentrations de l'extrait de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur les concentrations de la protéine C-réactive (CRP) et de l'albumine chez les rats Wistar.

Lot de rats expérimentaux	CRP (mg/L)	Albumine g/dL
Lot de référence	3.94 ± 0.25 ^a	4.23 ± 0.42 ^a
Lot témoin négatif (rats traités au diclofenc)	6 ± 0.2 ^{a,b}	3.87 ± 0.33 ^{a,b}
Lot témoin positif (rats non traités NaCl)	47.27 ± 0.87 ^e	2.68 ± 0.26 ^c
Lot traité avec EPFIO à 50mg/kg	24.2 ± 4.26 ^d	2.9 ± 0.43 ^c
Lot traité avec EPFIO à 100mg/kg	14.54 ± 1.32 ^c	3.4 ± 0.17 ^{b,c}
Lot traité avec EPFIO à 150mg/kg	10.3 ± 0.7 ^{b,c}	3.75 ± 0.21 ^{a,b}
Lot Lot traité avec EPFIO à 200mg/kg	5.47 ± 0.4 ^a	4.02 ± 0.08 ^{a,b}
Lot traité avec EPFIO à 250mg/kg	4.04 ± 0.66 ^a	4.04 ± 0.1 ^{a,b}
P value (ANOVA)	<0.01	<0.001

Les résultats du dosage de l'albumine indiquent un effet très hautement significatif (P < 0.001) des différents traitements sur la concentration en albumine. Ainsi une baisse de la concentration en albumine est enregistrée chez le lot témoin positif (les rats ont reçu la

solution de NaCl 0.9%) par rapport au lot de référence et au lot de rats traités au diclofenac (témoin négatif).

L'effet de l'EPFIO étudié aux concentrations de 200 et 250 mg/mL est meilleur que celui du diclofenac sur la concentration de l'albumine. Or les traitements avec les concentrations de 150, 200 et 250 mg/mL de l'EPFIO qui ont permis d'avoir des concentrations sériques en albumine de 3.75, 4.02 et 4.23 g/dl ne présentent pas de différence significative ($P=0.434$, test Tukey) avec le traitement au diclofenac (3.87g/dl) et le lot de référence.

Selon **Eissa et Zidan (2009)**, une hypo-albuminémie est un désordre hépatique qui a pour conséquence la perturbation de la synthèse hépatique de l'albumine. Cette synthèse d'albumine est stimulée par une chute de la pression osmotique mais, peut également être affectée par des changements physiopathologiques comme lors d'une maladie infectieuse ou inflammatoire, et dans ces cas la sécrétion est réduite. Ceci est dû aux cytokinines pro-inflammatoires (**Evans, 2002**).

Les résultats enregistrés témoignent de l'effet anti-inflammatoire important de l'EPFIO qui est comparable à celui d'un médicament anti-inflammatoire comme le diclofenac. Cet effet est probablement en lien avec la richesse de l'extrait en composés phénoliques actifs qui ont une action sur les cytokines proinflammatoires, le PAF (Facteur d'activation plaquettaire), le TNF kappa β , ainsi que sur l'interleukine-2 et l'interféron- γ (**Barnes et al., 2002; ESCOP, 2003; Obertreis et al., 1996; Riehemann et Schulze-Osthoff, 1999; Ganber et Spiteller, 1995**).

Ces résultats confirment l'utilisation traditionnelle de la partie aérienne de l'ortie pour le traitement des maladies inflammatoires (**Bertrand, 2010**).

III.2.2.4.2.2. Effet de l'extrait phénolique de feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur la Formulation et Numération Sanguine (FNS)

L'hémogramme est un diagramme sanguin qui analyse le nombre, la proportion, la morphologie et les variations des éléments figurés du sang. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au dénombrement des leucocytes et des plaquettes de rats avant et après l'inflammation aiguë induite par l'injection de carragénine.

Les résultats obtenus montrent que chez les rats du lot de référence, le nombre de leucocytes est de $8.28 \times 10^3 / \text{mm}^3$. Il n'existe pas de différence significative ($P= 0.069$) entre le traitement au diclofenac et le traitement avec l'extrait d'ortie aux deux concentrations 200

et 250 mg/kg vis-à-vis du taux de leucocytes. Pour le lot non traité le taux de leucocytes a atteint $13.4 \times 10^3 / \text{mm}^3$ (tableau 17).

Lors de la phase aigue, la production de médiateurs vaso-actifs induit une augmentation du flux vasculaire. La vasodilatation des vaisseaux au niveau local favorise l'extravasation des protéines plasmatiques dans le tissu. En parallèle, la production de cytokines sur le lieu de l'agression favorise la circulation des leucocytes du sang vers le tissu (Alves et al., 2009).

Selon Wagner et Roth, (2000), les leucocytes migrent à l'endroit de l'inflammation en réponse aux stimuli chimiotactiques et jouent un rôle important dans la pathogénie des désordres inflammatoires aigus et chroniques. Pendant la phagocytose, les leucocytes activés libèrent des radicaux superoxydes et d'autres contenus cytoplasmiques dans l'endroit de l'inflammation; ceci peut causer des dommages au tissu (Weissmann et al., 1980).

Alves et al. (2009) ont rapporté que la réduction des neutrophiles durant la péritonite peut être due à la production des cytokines pro-inflammatoires tel que: TNF and IL-1 β . L'EPFIO peut être à l'origine d'une réduction de la migration des neutrophiles dans la cavité péritonéale par ses effets sur ces cytokines.

Selon Esmon (2005), les médiateurs inflammatoires peuvent augmenter la production de plaquettes. D'après les résultats du tableau 17, il apparait une augmentation importante du taux de plaquettes dans le sang chez les rats qui ont reçu la solution de NaCl comparés à tous les autres lots expérimentaux. Cela montre que le traitement des rats par le diclofenac et l'extrait phénolique d'*U. dioica* aux concentration de 200 et 250 mg/ kg donne des taux de plaquettes semblables à celui du lot témoin sain.

Tableau 17 : Effet de l'extrait phénolique des feuilles et inflorescences d'ortie (EPFIO) sur le taux de leucocytes et de plaquettes des rats Wistar.

Lot de rats expérimentaux	Taux de leucocytes (x 10³ / mm³)	Taux de plaquettes (x 10³ / mm³)
Lot de référence	8.28 ± 0.43 ^a	622.21 ± 29.92 ^a
Lot témoin négatif (rats traités au Diclofenc)	9.42 ± 0.46 ^{a,b}	647,08 ± 55.35 ^a
Lot témoin positif (rats non traités NaCl)	13.4 ± 1.24 ^d	1018,86 ± 65.53 ^d
Lot traité avec extrait à 50mg/kg	13.23 ± 0.75 ^d	930,67 ± 24.68 ^{c,d}
Lot traité avec extrait à 100mg/kg	12.13 ± 0.26 ^{c,d}	900 ± 7.0 ^{c,d}
Lot traité avec extrait à 150mg/kg	11.16 ± 0.29 ^{b,c}	811.27 ± 13.3 ^{b,c}
Lot Lot traité avec extrait à 200mg/kg	10.86 ± 0.15 ^{b,c}	700,1 ± 21.07 ^{a,b}
Lot traité avec extrait à 250mg/kg	9.44 ± 0.80 ^{a,b}	635.34 ± 75,7 ^a
P value (ANOVA)	<0.001	<0.001

III.2.2.4.2.3. Examen histologique de la patte de rat

Six heures après l'induction de l'inflammation, une étude histologique a été réalisée. Les observations microscopiques lors des examens histopathologiques de pattes des rats nous ont permis de percevoir la réduction de la réponse inflammatoire induite par le traitement à l'EPFIO et au diclofenac (fig. 29).

L'examen histopathologique des pattes de rats ayant reçu de la carragénine mais non traités a mis en évidence la présence d'un œdème multifocal d'intensité modérée associé à une infiltration inflammatoire mixte et massive (fig. 29b). Le nombre de neutrophiles était plus important dans les tissus des pattes de rats non traités que dans ceux des pattes de rats traités avec l'EPFIO et le diclofénac.

Ainsi, pour les lots de rats traités avec l'EPFIO à 50, 100, 150 mg/kg (fig.29 c,d,e),l'examen histopathologique révèle la présence d'œdèmes multifocaux d'intensité minime accompagnés d'inflammation modérée à minime. Pour le lot de rats traités à l'EPFIO 250mg/kg, la présence de quelques cellules inflammatoires éparses est à signaler (fig.29 h).

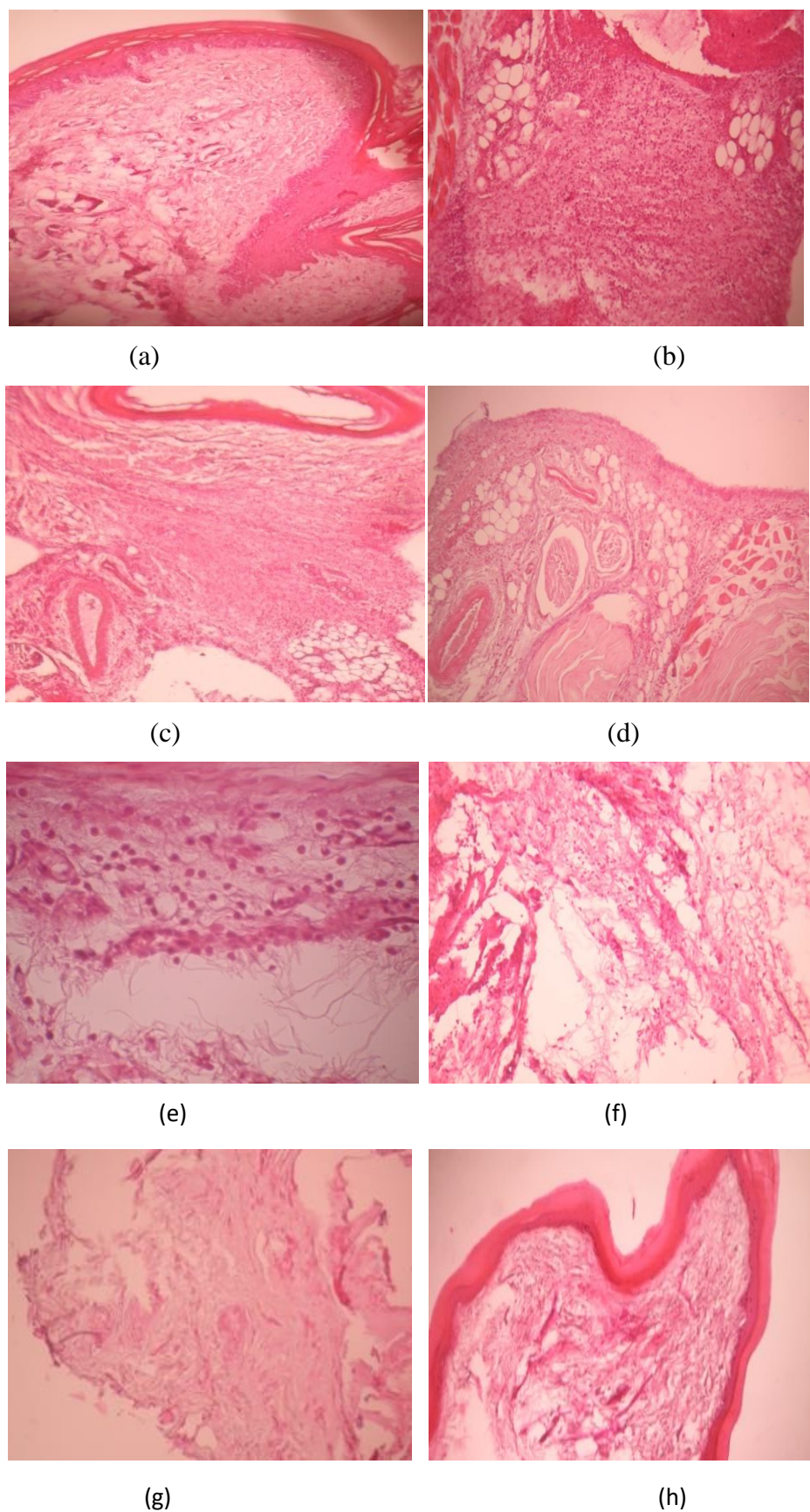


Figure 29 : Examen histologique des pattes de rats des différents lots expérimentaux. (a) Lot de référence (b) Témoin positif (c) EPFIO 50mg/kg (d) EPFIO 100mg/kg (e) EPFIO 150mg/kg (f) EPFIO 200mg/kg (g) EPFIO 250mg/kg (h) Témoin négatif –Diclofenac–.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Plante communément répandue, l'Ortie dioïque est en fait une plante dotée de nombreuses qualités dont découlent plusieurs utilisations qui méritent d'être soulignées et vulgarisées auprès du grand public.

La problématique soulevée dans cette thèse s'inscrit dans la contribution à une connaissance de la composition en polyphénols d'*Urtica dioica* récoltée dans la région Nord Ouest de l'Algérie, ainsi que la détermination de son potentiel biologique. Les feuilles et inflorescences de cette plante ont fait l'objet de cette étude en raison des vertus qu'on leur attribue.

Dans un premier volet de ce travail, nous avons testé trois prétraitements différents des échantillons et deux méthodes d'extractions. Des dosages colorimétriques de polyphénols totaux, de flavonoïdes et d'acides hydroxycinnamiques nous ont permis de déterminer l'extrait de feuilles et inflorescences d'ortie le plus riche en composés phénoliques.

L'analyse chimique de l'extrait de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) par HPLC-PDA-ESI-MS a révélé une variabilité chimique qualitative et quantitative, très intéressante. Nous avons noté la prédominance de la rutine (quercetine 3-O-rutinoside) avec 2005 µg / g d'ortie, ce qui correspond à 65.66%, suivie de l'acide férulique et de ses dérivés (acide 5-hydroxyférulique et désoxyhexoside de l'acide hydroxyférulique) avec 11.58%, la naringénine et ses dérivés avec 6.1 %, l'acide féruloylmalique pour 4.49%, l'apigénine di-C-hexoside pour 2.18%, du kaempférol-3-O-glucoside avec 1.53%, l'acide cinnamique avec 1.41% et de la catéchine (épicatéchine et épigallocatechine) avec 1.33%.

Dans un deuxième volet, nous avons mis en évidence et évalué les propriétés biologiques des polyphénols extraits par des tests in vitro et in vivo.

La première propriété vérifiée in vitro est l'activité antioxydante par les tests DPPH, TEAC, FRAP et celui de l'inhibition du blanchiment du β- carotène. L'activité antioxydante de l'extrait phénolique d'ortie a été comparé à celui de deux autres antioxydants, l'acide ascorbique et la quercetine.

Ainsi, pour les deux tests DPPH et TEAC, il n'existe pas de différence significative entre l'activité de l'extrait et celle de la quercétine. Par contre, pour le test FRAP l'extrait présente un potentiel de réduction des ions ferriques supérieur à celui de la quercetine, mais 3,5 fois inférieur à celui de l'acide ascorbique, un puissant antioxydant. L'extrait de feuilles et

d'inflorescences d'ortie (EPFIO) a présenté une activité antioxydante importante dans tous les tests et une forte corrélation avec le contenu phénolique élevé de cet extrait.

L'activité antimicrobienne de cet extrait phénolique, vis-à-vis de quatorze espèces microbiennes pathogènes et une espèce de levure a également été mise en évidence. Les polyphénols d'*U. dioica* ont eu un effet inhibiteur de la croissance de la plupart des souches testées, dont les plus sensibles étaient *S. aureus* et *C. albicans* avec des CMI de 0.039 et 0.156mg/ mL. Cependant, dans le test de neurotoxicité à une concentration de 1mg/mL, l'extrait n'a eu aucun effet sur la viabilité des cellules tumorales.

L'effet analgésique périphérique de l'extrait de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) utilisé à une dose de 400mg/Kg de poids corporel chez le rat Wistar a été démontré par le test writhing et le test de la formaline avec un pourcentage de protection contre la douleur de 81% et 60.39% respectivement.

L'effet de l'extrait EPFIO sur l'hyperpyrexie induite par la levure de bière était significatif et d'une manière dose-dépendante. Concernant l'activité anti-inflammatoire, l'extrait EPFIO utilisé à une concentration de 1mg/mL a induit une inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine à hauteur de 72.38 % et de la lyse membranaire HRBC d'environ 60.44 %.

Par ailleurs, l'inflammation provoquée par la carragénine a été réduite de 95% par l'extrait EPFIO utilisé à une dose de 200mg/kg. L'ensemble des résultats obtenus confirment les potentialités bioactives des polyphénols de l'ortie et leurs éventuelles applications pharmaceutiques et alimentaires.

L'ensemble de ces propriétés biologiques démontrées expérimentalement confèrent à l'extrait de feuilles et d'inflorescences d'ortie (EPFIO) étudié un statut de complément alimentaire naturel dénué de toute suspicion quant à leur composition chimique et des bénéfices santé que l'on peut en tirer.

En perspective, il serait fort intéressant d'explorer l'effet isolé et synergique des différents composés phénoliques identifiés des feuilles et inflorescences de cette plante et de tester d'autres activités biologiques comme les activités neuroprotectrices, antispasmodiques et antiparasitaires.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Adesokan A.A., Owoyele B.V., Akanji M.A., Soladoye A.O. (2008).** Effect of administration of aqueous and ethanol extracts of *Enantia chlorantha* stem bark on brewer's yeast induced pyresis in rats. *Journal of Biochemistry*, 2(7):165-169. Adzu et al., 2003
2. **Agus S., Achmadi S.S., Mubarik N.R. (2017).** Antibacterial activity of naringenin-rich fraction of pigeon pea leaves toward *Salmonella thypi*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7 (8): 725-728.
3. **Aherne S.A., O'Brien N.M., 2000.** Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against *tert*-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 29 (6): 507-514
4. **Ait haj Said A., El Otmani I., Derfoufi., Benmoussa A. (2016).** Mise en valeur du potentiel nutritionnel et thérapeutique de l'ortie dioïque (*Urtica dioïca* L.). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical science*, 7(10):8-14.
5. **Aitadafoun M., Mounieri C., Heymann S.F., Binistic C., Bon C. and Godhold J. (1996).** Alkoxybenzamides as new potent phospholipase A2, inhibitors. *Biochemical pharmacology*, 51:737-742.
6. **Akbay P., basaran A. A., Undeger U. et Basaran N. (2003).** In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L., *Phytother. Res.*, 17:34-37.
7. **AL Maruf A., Lip H., Wong H., O'brien P. (2015).** Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interaction*, 234: 96–104.
8. **Alves C. F., Alves V.B., Assis I.P., Clemente-Napimoga J.T., Uber-Bucek E., Dal-Secco D., Cunha F.Q., Rehder V.L.G., Napimoga M.H. (2009).** Antiinflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61(8):1097-104.
9. **Amico-Roxas M., Caruso A., Trombadore S., Scifo R., Scapagnini U. (1984).** Gangliosides antinociceptive effects in rodents. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 272(1):103-117.

10. **Ammon H.P.T., Safayhi H., Mack T., Sabieraj J. (1993).** Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boswellic acids. *Journal of Ethnopharmacology*. 38: 113-119.
15. **Anton R., Bernard M., Wichtl M. (2003).** Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Paris : Éd. Tech & Doc ; Cachan : Éd. médicales internationales. 692p.
16. **APGIII. (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APGII. *Bot. J Linn. Soc.* 141(4): 399-436.
17. **Araruna M.K., Brito S.A., Morais-Braga M.F., Santos K.K., Souza T.M., Leite T.R., Costa J.G., Coutinho H.D. (2012).** Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. *Indian J. Med. Res.* 135, 252-254.
18. **Arnok P. Ruangviriyachai, C., Mahachai, R., Techawongstien, S., Chanthai, S., (2012).***Int. Food Res. J.*, 19 :235–243.
19. **Arvouet-grand A., Vennat B., Pourrat A. and Legret P. (1994).** Standardization d'un extrait de propolis et identification des principaux constituents. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, 462-468.
20. **Atmani D., Nassima C., Dina A., Meriem B., Nadjat D., Hania B. (2009).** Flavonoids in Human Health: From Structure to Biological Activity. *Current Nutrition & Food Science*,5: 225- 237.
21. **Baker J.T., Borris R.P., Carté B., Cordell G.A., Soejarto D.D., Cragg G.M., Gupta M.P., Iwu M., Madulid D., Tyler V. (1995).** Natural product drug discovery and development: new perspectives on international collaboration. *J Nat Prod* ; 58(9):1325-57.
22. **Banerjee M., Pal S., Bhattacharya B., Ghosh B., Mondal S., Basu J. A. (2013).** Comparative study of efficacy and safety of gabapentin versus amitriptyline as coanalgesics in patients receiving opioid analgesics for neuropathic pain in malignancy. *Indian J. Pharmacol*, 45(4):334- 338.
23. **Barnes J., Anderson L.A., Phillipson J.D. (2002).** Nettle. In: Barnes J., Anderson L.A., Phillipson J.D. Ed. Herbal medicines. *A guide for health-care professionals. Pharmaceutical Press*, London: 360–364.
24. **Batlouni M. (2010).** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects. *ArquivosBrasileiros de Cardiologia*, 94(4): 522–563.

25. **Beloued A. (1998).** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires (Alger), 277p.
26. **Bentley G.A., Newton S.H., Starr J. (1983).** Studies on the antinociceptive action of α -agonist drugs and their interactions with opioid mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 79 (1): 125-134.
27. **Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem*, 239 :70–76.
28. **Bertrand B. (2002).** Les secrets de l'Ortie. Collection Le Compagnon Végétal. 7ème édition de Terran. 128p.
29. **Bertrand B. (2010).** Les secrets de l'ortie. Collection Le Compagnon Végétal. Ed. Terran. 222p.
30. **Bezanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. (1975).** Les plantes dans la thérapeutique moderne. Paris: Maloine, 529p.
31. **Bezanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M. (1980).** Plantes médicinales des régions tempérées. Paris: Maloine. 439p
32. **Bisht, S., Bhandari, S., Bisht, N.S. (2012).** *Urtica dioica* (L): an undervalued, economically important plant. *Agric. Sci. Res. J.* 2, 250–252.
33. **Bnoulam M., Merhfour F.Z., Ziyyat A., Mekhfi H., Aziz M., Legssyer A. (2003).** Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia*, 74 (7-8): 677-681.
34. **Bonjar S. (2004).** Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *J. Ethnopharmacol.* 94: 301-305.
35. **Bonjar S., Aghighi G.H., Karimi S., Nik A. (2004).** Antibacterial and Antifungal Survey in plants used in indigenous herbal-medicine of South East regions of Iran. *Journal of Biological Sciences.* 4(3): 405-412.
36. **Borges A., Ferreira C., Saavedra M.J., Simões M. (2013).** Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids Against Pathogenic Bacteria. *Microb. Drug Resist.* 19 :256–265.
37. **Bourgeois C., Leclerc A., Corbin C., Doussot J., Serrano V., Vanier J., Seigneuret J., Auguin D., Pichon C., Laine E., Hano C. (2016).** Nettle (*Urtica dioica* L.) as a source of antioxidant and anti-aging phytochemicals for cosmetic applications, *Comptes Rendus Chimie.* 19 (9): 1090-1100.
38. **Brantner A., Grein E. (1994).** Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 44 (1):35-40.

- 39. Broncano F.J., Rebuella M., Vivas J.M., Serranillos M. (1983).** Étude de l'effet sur le centre cardiovasculaire de quelques préparations de l'Urtica dioica L. *Plant Med Phytothér*, 17: 222–229.
- 40. Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575.
- 41. Bucar F., Britzmann B., Streit B., Weigend M., 2006.** LC-PDA-MS-profiles of phenolic compounds in extracts of aerial parts of Urtica species. *Planta Medica* 72, 152.
- 42. Budzianowski J., 1991.** Caffeic acid-esters from Urtica dioica and U. urens. *Planta Medica*, 57, 507.
- 43. Burger J., Brzorad J., and Gochfeld M. (1992).** Effects of an oil spill on emergence and mortality in fiddler crabs *Uca pugnax*. *Environmental Monitoring and Assessment* 22(2):107–115.
- 44. Cai Y., Luo Q., Sun M., Corke H., 2004.** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157–2184.
- 45. Cam M., Hışıl Y., Durmaz G. (2009).** Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112(3) 1: 721-726.
- 46. Capasso G. (2003).** Phytotherapy: a Quick Reference to Herbal Medicine. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 84p.
- 47. Carvalho A.R., Costa G., Figueirinha A., Liberal J., Prior J.A.V., Lopes M. C., Cruz M.T., Batista M.T. (2017).** Urtica spp.: Phenolic composition, safety, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Research Internationa*. 99: 485-494.
- 48. Celik I. et Tuluçe Y. (2007).** Elevation protective role of Camellia sinensis and Urtica dioica infusion against trichloroacetic acid-exposed in rats. *Phytother Res*. 21 (11): 1039-1044.
- 49. Chahardehi A.M., Ibrahim D., ABolhassani F., Sulaiman S.F. (2012).** Antidepressant like effect of extracts from Urtica dioica in mice model of depression. In: Proceedings of the 2nd Annual International Conference Syiah Kuala University, 22-24 November 2012, 2(1).

50. **Chandra S., Chatterjee P., Dey P., Bhattacharya S. (2012).** Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S178-S180.
51. **Chatter Riahi R., Tarhouni S., Kharrat R. (2012).** Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranée. *Les Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 88-2011 (1-4), pp.19-28.
52. **Chatuverdi R., Venables B., Petros R.A., Nalam V., Li M., Wang X., Takemoto L.J., 2012.** Anabietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *The Plant Journal*, 71: 161-172.
53. **Chaurasia N., Wichtl M. (1987).** Flavonol glycosides from *Urtica dioica*. *Planta Medica*, 53, 432–434.
54. **Chavoutier, P. L., Bouchet, J.-Y. & Richaud, C. (2000).** Reproductibilité et fiabilité des mesures périmétriques d'un membre inférieur sain. *Annales de Kinésithérapie*, 27(1), 3–7.
55. **Chou C.T., (1997).** The anti inflammatory effect of *Tripterygium wilfordii* Hook F on adjuvant induced paw edema in rats and inflammatory mediators release. *Phytotherapy Res*, 11:152-154.
56. **Chrubasik S. and Eisenberg E. (1999).** Treatment of Rheumatic Pain with Medicine in Europe. Part 2, *Urtica dioica* L. *Pain Clinic*, 11 (3), 179-185.
57. **Clarke D.J., Jacq A., Holland I.B. (1996).** A novel DnaJ-like protein in *Escherichia coli* inserts into the cytoplasmic membrane with a type III topology. *Mol.Microbiol.* 20:1273-1286
58. **Clifford M. N., Jaganat I. B., Ludwig I. A., Crozier, A. (2017).** Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*, 34: 1391–1421.
59. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), (2009).** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard M07-A8, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 8th edition.
60. **Clinical and Laboratory Standards Institute, M100–S18, (2008).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne.

- 61. Collier H.O., Dinneen L.C., Johanson C.A., Schneider C. (1968).** The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drug in the mouse. *British Journal of pharmacology*, 32 (2): 295-310.
- 62. Couplan F. (2013).** Guide nutritionnel des plantes sauvages et cultivées. Paris: Delachaux et Niestlé. 256 p.
- 63. Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4). 564–582.
- 64. Cueva C., Mingos S., Munoz- Gonzalez I., Bustos I., Requene T., Del campo R., Martin-Alvarez P.J., Bartolomé B., Morreno Arribas M.V. (2012).** Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 54: 557-563.
- 65. Cueva C., Morreno-Arribas M. V., Martín-Álvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A., Lopez Rivas C., Requena T., Rodriguez J.M., Bartolomé B. (2010).** Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria, 161(5): 372-382.
- 66. Daglia M. (2012).** Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23:174–181.
- 67. Dall' acqua S., Cervellati R., Loi M. C. and Innocenti G. (2008).** Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chem.* 106: 745–749
- 68. Dar S.A., Ganai F.A., Yousuf A.R., Balkhi M., Bhat T.M., Sharma P. (2012).** Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical Biology*, 51:170–180
- 69. Delvaille A., 2013.** Toutes les vertus d'un produit miracle: l'ortie. Ed. Artémis. Losanges.160p.
- 70. Deraedt R., Jouquey S., Delevallée F., Flahaut M. (1980).** Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur J Pharmacol* , 61(1):17-24.

71. **Deshpande V, Jadhav V M et Kadam VJ. (2009).** In-vitro antiarthritic activity of *Abutilon Indicum* (Linn.) Sweet. *Journal of Pharm. Res.*, 2(4): 644-645. 25.
72. **Dhouibi R., Affes H., Ben Salem M., Hammami S., Sahnoun Z., Zeghal K.M., Ksouda K. (2020).** Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 150 : 67-77.
73. **Dhouibi, R., Moalla, D., Ksouda, K., Ben Salem, M., Hammami, S., Sahnoun, Z., Zeghal, K.M., Affes, H. (2017).** Screening of analgesic activity of Tunisian *Urtica dioica* and analysis of its major bioactive compounds by GCMS. *Arch. Physiol. Biochem.* 1-9
74. **Di Virgilio N., Papazoglou P.E., Jankauskiene Z., Di Lonardo S., Praczyk M., Wielgusz K. (2015).** The potential of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) as a crop with multiple uses. *Industrial Crops and Product*, 68: 42-49.
75. **Dostbil N., Agaoglu S., Alemdar S. (2005).** The antibacterial activity of common nettle. *The Indian veterinary journal*, 82 (5): 492-494.
76. **Doukkali, Z., Taghzouti, K., Boudida, E.H. (2015).** Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. *Behavioral and Brain Functions*, 11:1-5.
77. **Duraisankar M. et Ravichandran V. (2012).** Antipyretic potential of polyherbal ayurvedic products. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(2): 146-150.
78. **Durak I., Biri H., Devrim E., Sozen S., Avci A. (2004).** Aqueous extract of *Urtica dioica* makes significant inhibition on adenosine deaminase activity in prostate tissue from patients with prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.* 3(9): 855-857.
79. **Durović S., Pavlic B., Sorgic S., Popov S., Savic S., Petronijevic M., Radojkovic M., Cvetanovic A., Zekovic Z. (2017).** Chemical composition of stinging nettle leaves obtained by different analytical approaches. *Journal of Functional Foods*, 32: 18-26.
80. **Ebrahimzadeh M.A., Pourmorad F., Bekhradnia A.R. (2008).** Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7(18): 3188-3192.
81. **Eckersall P.D., Saini P.K., McComb C. (1996).** The acute phase response of acid soluble glycoprotein, α_1 -acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-

reactive protein, in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51 (3-4): 377-385.

82. **Edris A.E. (2007).** Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research*, 21: 308-323.
83. **Eissa F.I., Zidan N. (2009).** Haematological, biochemical and histopathological alterations induced by abamectin and *Bacillus thuringiensis* in male albino rats. *Acta Biologica Hungarica* 61(1):33-44
84. **El Haouari, M., Rosado, J.A. (2019).** Phytochemical, anti-diabetic and cardiovascular properties of *Urtica dioica* L. (Urticaceae): a review. *Mini Rev. Med. Chem.* 19 (1), 63-71.
85. **El Houari M., Bnouham M., Bendahou M., Aziz M., Ziyat A., Legssyer A. (2006).** Inhibition of Rat Platelet Aggeration by *Urtica dioica* leaves extracts. *Phytother Res*, 20:568-72
86. **Engler R. (1993).** Protéines de la réaction inflammatoire. *Veterinary Research, BioMed Central*, 24 (4), pp.337-343
87. **Esmon C.T. (2009).** Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev.*, 23 (5): 225-229.
88. **European Scientific Cooperative on Phytotherapy (ESCOP) (2003).** Monographs, second ed., 556p.
89. **Evans T.W. (2002).** Review article: albumin as a drug: biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment. Pharmacol. Therap*, 16:6-11.
90. **Fablet C. et Madec F. (2009).** Protéines de la phase aigue de l'inflammation chez le porc : intérêt en santé animale et en santé public vétérinaire. *Revue Méd. Vét.*, 2009, 160, 1, 28-43.
91. **Falla D., Arendt-Nielsen L., Farina D. (2008).** Gender-specifica adaptations of upper trapezius muscle activity to actue nociceptive stimulation. *Pain*, 13(1): 217-225.
92. **Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities .*C. R. Biologies*, 331: 372-379.
93. **Farag M.A., Weigend M., Luebert F., Brokampludger G., Wessjohann A. (2013).** Phytochemical, phylogenetic, and anti-inflammatory evaluation of 43 *Urtica*

accessions (stinging nettle) based on UPLC–Q-TOF-MS metabolomic profiles. *Phytochemistry*, 96, 170–183.

94. **Fattahi S, Ardekani AM, Zabihi E, (2013).** Antioxidant and apoptotic effects of an aqueous extract of *Urtica dioica* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev.*,14:5317-23.
95. **Fattahi, S., Ghadami, E., Asouri, M., Motevalizadeh Ardekanid, A., Akhavan-Niaki, H. (2018).** *Urtica dioica* inhibits cell growth and induces apoptosis by targeting Ornithine decarboxylase and Adenosine deaminase as key regulatory enzymes in adenosine and polyamines homeostasis in human breast cancer cell lines. *Cell. Mol. Biol.* 64 (3), 97-102.
96. **Fattahi, S., Zabih, E., Abedian, Z. (2014).** Total Phenolic and Flavonoid Contents of Aqueous Extract of Stinging Nettle and In Vitro Antiproliferative Effect on HeLa and BT474 Cell Lines. *Int. J. Mol. Cell. Med.* 3:1-6.
97. **Feirrali M, Signormi C, Ciccolili L, Comporti M. (1992).** Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, devicene and isouranil. *Biochem. Journal*, 285: 295-301.
98. **Ferguson L.R. et Philpott M. (2008).** Nutrition and mutagenesis. *Annual Review of Nutrition*, 28 : 313-329.
99. **Flavell R.A. (2002).** The relationship of inflammation and initiation of autoimmune disease: role of TNF super family members .*Current Topics in Microbiology Immunology*, 266, 1-19.
100. **Fleurentin J, Hayon J-C. (2008).** *Plantes médicinales: traditions et thérapeutique.* Rennes: Éd. Ouest-France, 104-105.
101. **Flores-Ocelotl M.R., Rosas-Murrieta N.H., Moreno D.A., Vallejo-Ruiz V., Reyes Leyva J., Domínguez F., Santos-López F. (2018).** *Taraxacum officinale* and *Urtica dioica* extracts inhibit dengue virus serotype 2 replication in vitro. *BMC Complement Altern Med.*, 18(1): 95.
102. **Ganber D., Spiteller G. (1995).** Aromatase inhibitors from *Urtica dioica* roots. *Planta Med*, 21(2): 138-140.
103. **Gansser D., Spiteller G. (1995).** Aromatase inhibitors from *Urtica dioica* roots. *Planta Medica*. 61(2):138-140.

104. **Ganzer M., Schönthaler B., Stuppner H. (2003).** Urtica dioica Agglutinin (UDA) Separation and Quantification of Individual Isolectins by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 58(3):177-181.
105. **Gaziano J.M et Gibson C.M. (2006).** Potential for drug-drug interactions in patients taking analgesics for mild-to-moderate pain and low-dose aspirin for cardioprotection. *Am J Cardiol*, 97: 23-9.
106. **Ghaima K.K., Hashim N.M., Abdalrasool Ali S (2013).** Antibacterial and antioxidant activities of ethyl acetate extract of nettle (*Urtica dioica*) and dandelion (*Taraxacum officinale*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(5): 96-99.
107. **Ghedira K, Goetz P, (2009).** Urtica dioica L., Urtica urens et ou hybrides (Urticaceae). *Phytothérapie* ,7:279- 85.
108. **Gohari A., Noorafshan A., Akmal M., Zamani-Garmisiri F., Seghatoleslam A. (2018).** Urtica dioica distillate regenerates pancreatic beta cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 43(2): 174-183.
109. **Golalipour M.J., Balajadeh B.K., Ghafari S., Azarhosh R., Khori V. (2011).** Protective Effect of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) on Morphometric and Morphologic Alterations of Seminiferous Tubules in STZ Diabetic Rats, 14 (5): 472-477.
110. **González-Gallego J., García-Mediavilla M.V., Sánchez-Campos S., Tuñón M.J. (2010).** Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*, 104 (S3): 15-27.
111. **Gordts S.C., Renders M., Féris G., Huskens D., Van Damme E.J., Peumans W., Balzarini J., Schols D. (2015).** NICTABA and UDA, two GlcNAc-binding lectins with unique antiviral activity profiles. *J. Antimicrob. Chemother.* 70(6): 1674-1685.
112. **Grevsen K., Fretté X. C., Christensen L. P. (2008).** Concentration and Composition of Flavonol Glycosides and Phenolic Acids in Aerial Parts of Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.) are Affected by Nitrogen Fertilization and by Harvest Time. *Europ. J. Hort. Sci.*, 73 (1), 20–27.
113. **Guil-Guerrero J.L., Reboloso-Fuentes M.M., Isasa M.E.T. (2003).** Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2003;16(2):111-119.
114. **Gul S., Demirci B., Başer K.H., Akpulat H.A., Aksu P. (2012).** Chemical composition and in-vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *Bull Environ Contam Toxicol*.88:666-71.

115. **Gulçin I., Kufrevioglu O .I., Oktay M., Buyukokuroglu M.E. (2004).** Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J. Ethnopharmacol.*, 90, 205–215.
116. **Guler E.R. (2013).** Investigation of Chemopreventif Properties of *Urtica Dioica* L., in MCF-7 and MDA 231 Breast Cancer Cell Lines. *NEW J Med*;30:50-3.
117. **Guo, Y., Wu, H., Sun, X., Qian, X., Shen, Y. (2005).** Analysis on the properties of nettle fiber. *J. Text. Res.* 26, 27–28
118. **Hadizadeh I., Peivastegan B., Kolahi M. (2009).** Antifungal activity of nettle (*Urtica dioica* L.), colocynth (*Citrillus colocynthis* L. Schrad), oleander (*Nerium oleander* L.) and Konar (*Ziziphus spina-christi* L.) extracts on plants pathogenic fungi. *Pack J. Biol. Sci. Jan.* 12 (1): 58-63.
119. **Hajhashemi V. et Klooshani V. (2012).** Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Urtica dioica* leaf extract in animal models. *Avicenna J. Phytomed*, 3 (2): 193-200.
120. **Hansen J.M., Hallas J., Lauritsen J.M., Bytzer P. (1996).** Non-steroidal anti-inflammatory drugs and ulcer complications: a risk factor analysis for clinical decision-making. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 31(2): 126-130.
121. **Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M. (2007).** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105: 1126-1134.
122. **Hryb D.J., Khan M.S., Romas N.A., Rosner W. (1995).** The effect of extracts of the roots of the stinging nettle (*Urtica dioica*) on the interaction of SHBG with its receptor on human prostatic membranes. *Planta Med*; 61:31-2.
123. **Hubbe M., 2002.** Rheumatische Erkrankungen – eine beherrschbare Herausforderung. *Der Kassenarzt*; 16:32–8.
124. **Humphries, D.J., Reynolds, C.K. (2010).** The effect of adding stinging nettle (*Urtica dioica*) haylage to a total mixed ration on performance and rumen function of lactating dairy cows. *Adv. Anim. Biosci.* 1, 18–18

125. **Hunskaar S. et Hole K. (1987).**The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30 (1): 103–114.
126. **Ismail H., Boon Khoon T., Hayemasae N., Husseinsyah S. (2015).** Effect of Oil Palm Ash on the Properties of Polypropylene/Recycled Natural Rubber Gloves/Oil Palm Ash Composites. *Bioresources*, 10 (1): 1495-1505.
127. **Jagtap V.A., Agasimundin Y.S., Jayachandran E. and Sathe B.S. (2011).** In-Vitro Anti - Inflammatory Activity of 2- Amino- 3- (Substituted Benzylidinecarbohydrazide) - 4, 5, 6, 7-Tetrahydrobenzothiophenes. *Journal of Pharmacy Research*, 4(2), 378- 379.
128. **Jalili C., Salahshoor M.R., Naseri A. (2014).** Protective effect of *Urtica dioica* L. against nicotine-induced damage on sperm parameters, testosterone and testis tissue in mice. *Iran. J. Reproductive Med*, 12 (6): 401-408.
129. **Ji T.F., Liu C.H., Wang A.G., Yang J.B., Su Y.L., Yuan L. (2007).** Studies on the chemical constituents of *Urtica dioica* L. grown in Tibet Autonomous Region. *Zhong Yao Cai*;30:662-4.
130. **Johnson T.A., Sohn J., Inman W.D. (2013).** Lipophilic stinging nettle extracts possess potent anti-inflammatory activity, are not cytotoxic and may be superior to traditional tinctures for treating inflammatory disorders. *Phytomedicine*;20(2):143-147
131. **Journal Officiel de la République Française, 17 juillet 2014.** « Arrêté du 24 juin 2014 établissant la liste des plantes, autres que les champignons, autorisées dans les compléments alimentaires et les conditions de leur emploi ».
132. **Kadri A., Zarai Z., Békir A., Gharsallah N., Damak M., Gdoura R.(2011).**Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. *African Journal of Biotechnology*, 10(19):3908-3914.
133. **Kanter M., Meral I., Dede S., Gunduz H., Cemek M., Ozbek H., Uygan I. (2003).** Effects of *Nigella Sativa* L. and *Urtica dioica* L; on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and some liver enzymes in CCl₄-treated rats. *J. Veto. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50(5): 264-268.
134. **Karakaya S.E.L.S.N. (2000).** Determination of antimutagenic effects of some foods and drinks in vitro binding capacities of some dietary fibers to mutagens. *J. Nutr. Diet.* 29(2): 4-13.

135. **Kavalali G.M. (2003).** *Urtica*. Therapeutic and Nutritional Aspects of Stinging Nettles. London, New York: Taylor & Francis; p. 47-55 38.
136. **Kavtaradze N. Sh., Alaniya M. D., Aneli J. N. (2001).** Chemical components of *Urtica dioica* growing in Georgia. *Chemistry of Natural Compounds*, 37 (3).
137. **Kavtaradze N.S., Alaniya M.D. (2003).** Anthocyanins glycosides from *urtica dioica*. *Chem Nat Comp*;39:315.
138. **Kelles O., AK S., Bakirel T., Alpinar K. (2001).** Screening of some Turkish plants for antibacterial activity. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25(4): 559-565.
139. **Khan M.A., Khan H., Khan S., Mahmood T., Khan P.M., Jabar A. (2009).** Antiinflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Physalis minima* Linn. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, 24: 632–637.
140. **Khanam Z., When C.S., Ul Haq Bhat I. (2015).** Phytochemical screening and antimicrobial activity of root and stem extracts of wild *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali). *Journal of King Saud University- Science*, 27 (1): 23-30.
141. **Khare V., Kushwaha P., Verma S., Gupta A., Srivastava S., Rawat A. (2012).** Pharmacognostic Evaluation and Antioxidant Activity of *Urtica dioica* L., *Chinese Medicine*, 3, 128-135. doi:10.4236/cm.2012.33021.
142. **Khoddami A., wilkes ma, Roberts th, (2013).** Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18: 2328-2375.
143. **Khosravinia S., Ziaratnia S.M., Bagheri A., Marashi S.H. (2013).** Investigation of antibacterial effects of cell suspension culture and comparison by essential oils and seed extract in *Bunium persicum*. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*. 2(1): 79-92.
144. **Kiaei E., Mazandarani M., Ghaemi E. (2010).** Antibacterial activity of 7 species of medicinal plants on bacteria isolated from UTI patients in Golestan province. *Journal of medicinal plants*. 9(34): 74- 83.
145. **Kirkova M., Kassabova T., Russanov E. (1992).** In vivo effects of indomethacin on the activity of metal-containing enzymes. *General Pharmacology*, 23(5): 811-814.
146. **Kono Y., Kashine S., Yoneyama T., Sakamoto Y., Matsui Y., Shibata H. (1998).** Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 26 (1): 22-27.

147. **Konrad L., Muller H.H., Lenz C. (2000).** Antiproliferative effect on human prostate cancer cells by a stinging nettle root (*Urtica dioica*) extract. *Planta Med*;66:44-7.
148. **Koster R., Anderson M., Beer E.J. (1959).** Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, 18, 412-417.
149. **Kremer B.P. (2001).** *Guide Vigot des plantes médicinales communes d'Europe*. Paris: Vigot.224p.
150. **kukrić A., ljiljana A., topalić-trivunović A., biljana M., kukavica B., snježana B., svetlana S., pavičić A., mirela M., borobjab and aleksandar V. savić A. (2012).**Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.).*APTEFF*, 43,1-342.
151. **Kumaki Y., Wandersee M.K., Smith A.J., Zhou Y., Simmons G., Nelson N. M., Bailey K.W., Vest Z.G., Li J.K.K., Kay-Sheung Chan P., Smee D.F., Barnard D. (2011).** Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus replication in a lethal SARS-CoV BALB/c mouse model by stinging nettle lectin, *Urtica dioica* agglutinin. *Antiviral Res.*, 90(1): 22-32.
152. **Kumaran A., Karunakaran R. (2006).** Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus Aromaticus*. *Food Chemistry*, 97 (1): 109-114.
153. **Lamaison J.L., Petitjean-Freytet C., Carnat A. (1990).** Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivative contents and antioxidant activity of medicinal Apiaceae, Borraginaceae and Lamiaceae [*Sanicula*, *Lycopus*]. *Annales Pharmaceutiques Francaises* (France), 48(2), 103–108.
154. **Lapinskaya E.S., Kopyt'ko Y.F., Timokhina E.A. (2009).** Amino acids and cyclic dipeptides in stinging nettle (*Urtica dioica* and *U. urens*) homeopathic matrix tinctures. *Pharmaceutical Chemistry Journal.*;42(11):650-653.
155. **Lapornic B., Prošek M., Wonder A.G. (2005).** Comparison of extract prepared from plant byproducts using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering* 71: 214-222.
156. **Lasheas B. (1986).** Etude pharmacologique préliminaire de *Prunus spinosa* L., *Amelanchier ovalis* Medikus, *Juniperus communis* L ; et *Urtica dioica* L. *Plant Méd. Phytother.* pp. 219-226.

157. **Le moal M.A., Truffa-bachi P. (1988).** *Urtica dioica* agglutinin, a new mitogen for murine T lymphocytes, unaltered interleukin-1 production but late interleukin-2-mediated proliferation. *Cell. Immunol.*, 115: 24-35.
158. **Leelaprakash G. et MohanDass S., 2011.** In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. *International Journal of Drug Development & Research*, 3 (3): 189-196.
159. **Liu R.H. (2003).** Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78 (3): 517S–520S.
160. **Liyana-Pathirana C., Shahidi F. (2006).** Optimization of extraction of phenolics from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93: 45-56.
161. **Liyana-Pathirana C.M., Shahidi F. (2005).** Antioxidant activity of commercial soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2433-2440.
162. **Lowy F.D. (2003).** Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(9): 1265-1273.
163. **Maaroufi L., Sazzad Hossain M., Tahri W., Landoulsi A. (2017).** New insights of Nettle (*Urtica urens*): Antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(4): 73-86.
164. **Macheix J.J., Fleuriat A., Jay-Allemand C. (2006).** Les composés phénoliques des végétaux. *Science des aliments*, 26 : 189-190.
165. **Malheiro J.F., Maillardb J. Y., Borgesc F., Simõesa M. (2019).** Evaluation of cinnamaldehyde and cinnamic acid derivatives in microbial growth control *International Biodeterioration& Biodegradation*, 141: 71–78.
166. **Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79, 727-747.
167. **Mandal P., Misra T.K., Singh I.D., Das J.K., Bhunia M. (2009).** Free-Radical–Scavenging Activity in the Infl orescence of European Nettle/Sisnu (*Urtica dioica* L.) *J Young Pharm.*;1(2):129-135
168. **Manjir S.K., Veerukannayan M., Ananya R., Prahlad S.M., Deepak A., Ravi S. Y. (2012).** Antioxidant, Hepatoprotective, and Anthelmintic Activities of Methanol Extract of *Urtica dioica* L. Leaves. *Pharmaceutical Crops*, 3: 38-46.
169. **Manouze H., Bouchatta O., Gadhi A.C., Bennis M., Sokar Z., Ba-M'hamed S.** Anti-inflammatory, Antinociceptive, and Antioxidant Activities of Methanol and Aqueous Extracts of *Anacyclus pyrethrum* Roots. *Front Pharmacol*, 5,8:598.

170. **Mariod A. A., Ahmed Y. M., Matthaus B., Khaleel G., Siddig A., Gabra A. M., Siddig Ibrahim A. (2009).** A comparative study of the properties of six Sudanese cucurbit seeds and seed oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 86 (12): 1181-1188
171. **Marrassini C., Acevedo C., Mino J., Ferraro G., Gozalczany S. (2010).** Evaluation of Antinociceptive, Antiinflammatory Activities and Phytochemical Analysis of Aerial Parts of *Urtica urens L.* *Phytotehrapy Research*, 24 (12): 1807-1812.
172. **Math P., Mishra D.K., Prajapati P.K., Roshy J., Jha P.K.(2011).** Antipyretic activity of Madhukadi and Madhukadi Ghana-An Experimental study. *International Journal of Pharmaceutical & biological Archieve.* ; 2(1):572-576.
173. **Miguel M. G. (2010).** Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules*, 15: 9252-9287.
174. **Mikaeili A., Karimi I., Modaresi M. (2013).** In vitro antifungal activity of *Urtica dioica L.* extract against *Microsporum canis* determined by diameter of inhibition zone. *Trop. J. Pharmaceut. Res.* 12 (6): 997-1002.
175. **Miladi S. et Damak M. (2008).** In vitro antioxidant activities of Aloe vera Leaf skin extracts. *Journal de la société Chimique de Tunisie*, 10: 101-109.
176. **Mirzoeva O.K., Grishanin R.N., Calder P.C. 1997.** Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152 (3): 239-246.
177. **Modarresi Chahardehi A., Ibrahim D., Fariza Sulaiman S., Aboulhassani F. (2012).** Determination of antimicrobial activity of various extracts of stinging nettle (*Urtica dioica*). *Journal of Medicinal Plants*. 2(42): 98- 104
178. **Mokhtar M., Soukup J., Donato P., Cacciola F., Dugo P., Riazi A., Jandera P., Mondello L. (2014).** Determination of the polyphenolic content of a *Capsicum annum L.* extract by liquid chromatography coupled to photodiode array and mass spectrometry detection and evaluation of its biological activity. *J. Sep. Sci.* 38,171-178.
179. **Moradi H.R., Majd N.E., Esmaeilzadeh S., Tabatabaei S.R.F. (2015).** The histometrical effects of *Urtica dioica* extract on rat's prostate hyperplasia. *Veterinary Research Forum*, 6(1): 23-29.
180. **Mori A, Nishino C, Enoki N, Tawata S. (1987).** Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26: 2231-4.

181. **Moro Buronzo A. (2011).** Les incroyables vertus de l'ortie. Jouvence Alimentation santé. France.156p.
182. **Mounnissamy V.M., Kavimani S., Balu V., and Drlin Q.S. (2008).**Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of ethanol extract of Canjera rehedii. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 6: 235-237.
183. **Moutsie L.(2003).** L'ortie, une amie qui vous veut du bien. Encyclopédie d'Urovie; 56p.
184. **Murata T., Ushikubi F., Matsuoka T., Hirata M., Yamaski A., Sugimoto Y., Ichikawa A., Aze Y., Tanaka T., Yoshida N., Ueno A., Oh-ishi S., Narumiya. (1997).** Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*, 388, 678–682.
185. **Nahata, A., Dixit, V., 2012.** Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. *Andrologia* 44, 396–409.
186. **Nantel F., Denis D., Gordon R., Northey A., Cirino M., Metters K.M., Chung Chan C. (2009).** Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology*; 128: 853–859.
187. **Naz S., Ahmad S., AjazRasool S., Asad Sayeed S., Siddiqi R. (2006).** Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Onosmahispidium*, *Microbiol. Res.* 4 161 43–48.
188. **Nkhili E., Tomao V., El Hajji H., El Boustani E., Chemat F., Dangles O. (2009).** Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. *Phytochemical analysisn*, 20: 408-415.
189. **Notten M.J.M., Oosthoek A.J.P., Rozema J., Aerts R. (2005).** Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution*, 138 (1): 178-190.
190. **Nwafor, P.A., Effrain, K.D., Jack, T.W. (1996).** Gastroprotective effects of aqueous extract of *Khaya senegalensis* bark on indomethacin-induced ulceration in rats. *West African Journal of Pharmacology and Drug research*, 12:46-50.
191. **Obertreis B., Giller K., Teucher T. (1996).** Anti-inflammatory effect of *Urtica dioica* folia extract in comparison to caffeic malic acid. *Arzneimittelforschung* 46(1): 52–5

192. **Oliver F., Amon E.U., Breathnach A. (1991).** Contact urticaria due to the common stinging nettle (*Urtica dioica*). Histological, ultrastructural and pharmacological studies. *Clinical and Experimental Dermatology*;16(1):1-7
193. **Orčić D., Francišković M., Bekvalac K. (2014).**Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*.;143:48-53.
194. **Oroujalian F., Kasra Kermanshahi R., Azizi M., Basami MR. (2010).** Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2: 133-146.
195. **Otles S., et Yalcin B. (2012).** Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk, and Leaves of Nettle. *The Scientific World Journal*, 2012 : 1- 12.
196. **Ouedraogo N., Lompo M., Swadogo R.W., Tibiri A., Hay A.E., Koudou J., Dijoux M.G., Guissou I.P. (2012).** Etude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytotherapie*, 10(5) : 286-292.
197. **Ozkan A., Yumrutas O., Saygideger S.D., Kulak M.(2011).** Evaluation of Antioxidant Activities and Phenolic Contents of Some Edible and Medicinal Plants from Turkey's Flora. *Adv. Envir. Biol.* 5(2): 231-236.
198. **Paniwnyk L., Beaufoy E., Lorimer J.P., James Mason T. (2001).** The extraction rutin from flower buds of *Sophora japonica*. *Ultrasonics Sonochemistry*; 8(3): 299-301.
199. **Pathak, K., Raghuvanshi, S. Middeldorp M. (2015).** Oral Bioavailability: Issues and Solutions via Nanoformulations. *Clin Pharmacokinet*; 54: 325–357
200. **Patel S.S. et Udayabanu M. (2013).** Effect of *Urtica dioica* on memory dysfunction and hypoalgesia in an experimental model of diabetic neuropathy. *Neurosci. Left*. 552: 114-109.
201. **Patel S.S., Mahindroo N., Udayabanu M. (2016).** *Urtica dioica* leaves modulates muscarinic cholinergic system in the hippocampus of streptozotocin-induced diabetic mice. *Metab Brain* 30 (3), 803-8011.
202. **Pietta P.G. (2000).** Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*; 63(7) : 1035-1042.

- 203. Pinelli P., Ieri F., Vignolini P., Bacci L., Baronti S., Romani A. (2008).** Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibers of *Urtica dioica* L. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9127–9132.
- 204. Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Solmajer T., Jerala R. (2003).** Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 306 (2): 530- 536.
- 205. Pompeu D.R., Silva E.M., Rogez H. (2009).** Optimization of solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 100, 6076–6082.
- 206. Posadas I., Bucci M., Roviezzo F., Rossi A. (2004).** Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*; 142 (2): 331-338.
- 207. Pourmorad F., Hosseinimehr S.J., Shahabimajd N. (2006).** Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants *African Journal of Biotechnology.* 5 (11):1142-1145.
- 208. Pradhan S., Manivannan Sand Tamang J. P.(2015).** Proximate, mineral composition and antioxidant properties of some wild leafy vegetables. *J Sci Ind Res*,74:155-159.
- 209. Quayyum R., Qamar H.M., Khan S., Salma U., Shah A.J. (2016).** Mechanisms underlying the antihypertensive properties of *Urtica dioica*. *J. Transl. Med.* 14 :254p.
- 210. Qujeq D., Tatar M. Feizi F., Parsian H. (2013).** Effect of *Urtica dioica* leaf alcoholic and aqueous extract on the number and the diameter of the islets in diabetic rats. *Int J Mol Cell Med* 2 (1): 21-26.
- 211. Radak Z. (2005).** The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 65 (6): 487-493.
- 214. Rauha J.P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Vuorela P. (2000).** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 56(1): 3–12.
- 215. Raut J. S. & Karuppayil S. M. (2014).** A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62: 250–264.

216. **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolour-ization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26: 1231–1237.
217. **Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956.
218. **Rice-Evans C.A., Miller N.J. (1994).** Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol.*; 234: 279-293.
219. **Riehemann K., Behnke B., Schulze-Osthoff K. (1999).** Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-kappa B. *FEBS Lett*, 442: 89-94. 58.
220. **Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4): 401-436.
221. **Robards, K., 2003.** Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1000, 657–691.
222. **Rombi M. et Robert D. (2006).** 120 plantes médicinales : composition, mode d'action et intérêt thérapeutique - de l'Ail à la Vigne rouge. Alpen, France. 528p.
223. **Ronaldo R., Vale M.L., Thomazzi S.M., Paschoalato A.B.P., Poole S., Ferreira S.H., Cunha F.Q. (2000).** Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic in mice. *European Journal of Pharmacology*, 387 (1): 111-118.
224. **Rufino M., Alves R.E., Brito E.S., Pérez-jiménez J., Saura-Calixto F., Mancini-Filho J. (2010).** Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*; 121(4): 996-1002.
225. **Saavedra M.J., Borges A., Dias C., Aires A., Bennett R.N., Rosa E.S., Simoes M. (2010).** Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Med Chem.* 6: 174-183.
226. **Salvatore M.J, King A.B, Graham A.C et al., (1998).** Antibacterial activity of lonchocarpol A. *J Nat Prod*, 61: 640–642.
227. **Sanchez-Moreno C. (2002).** Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8:121-137.

228. **Sanchez-Vioque R., Polissiou M., Astraka K., Mozos-Pascual M., Tarantilis P., Herraiz-Penalver D. & Santana-Meridas O. (2013).** Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Ind. Crops Prod.*, 49: 150–159.
229. **Santos-Buelga, C., Williamson, G., 2003.** *Methods in Polyphenol Analysis*. The Royal Society of Chemistry, United Kingdom, pp. 1–12.
230. **Sawadogo W.R, Boly R., Lompo M. (2006).** Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Dicliptera verticillata*. *Int J Pharmacol* 2(4): 435–8
231. **Sayhan M.B., Kanter M., Oguz S., Erboga M. (2012).** Protective effect of *Urtica dioica* L. on renal ischemia/reperfusion injury in rat. *J. Mol. Histol.* 43(6): 691-698.
232. **Scardovi V. (1986).** Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1418–1434. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
233. **Schaffner W. (1992).** Les plantes médicinales et leurs propriétés. Manuel d'herboristerie. Delachaux et Niestlé. 215p.
234. **Schöttner M., Gansser D., Spitteller G. (1997).** Lignans from the roots of *Urtica dioica* and their metabolites bind to human sex hormone binding globulin (SHBG). *Planta Medica.* 63(6):529-532.
235. **Schulze-Tanzil G, de Souza P, et al. (2002).** Effects of the antirheumatic remedy hox alpha: a new stinging nettle leaf extract - on matrix metalloproteinases in human chondrocytes in vitro. *Histol Histopathol* 17(2): 477–48
236. **Semih O., Buket Y. (2012).** Phenolic Compounds Analysis of Root, Stalk and Leaves of Nettle. *The Scientific World Journal* . Article ID564367 (2012) 1-12.
237. **Sengar N., Joshi A., Prasard S., Hemalatha S. (2015).** Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of standardized root extract of *Jasminum sambac*. *Journal of Ethnopharmacology*; 160: 140-148.
238. **Seyedeh Masoumeh M. (2016).** *Medical Laboratory Journal Sep, Vol 10: No 5.*
239. **Shallangwa G.A., Jibrin G. P., Haliru M., Abdul Hamidu A., Dallatu Y.A., Abba H. Moyosore AA. (2013).** In vitro evaluation of Aloe vera and *Camellia sinensis* aqueous extracts effect on protein denaturation during acute inflammation. *Biointerface research in applied chemistry*, 3(3), 566-572.
240. **Shibata M., Ohkubo T., Takahashi H., Inoki R. (1989).** Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38(3):347-52.

241. **Shinde U.A., Phadke A.S., Nair A.M., Mungantiwar A.A., Dikshit V.J., Sarsf M.N.(1989).** Membrane stabilization activity- a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of Cedrus deodara wood oil. *Fitoterapia*, 70:251–257.
242. **Sidaoui F., BelghithIgueld S., Barth D., TrabelsiAyadi M., Cherif JK. (2015).** Study of Tunisian nettle leaves (*Urtica dioica* L.): mineral composition and antioxidant capacity of their extracts obtained by maceration and supercritical fluid extraction. *Ijppr*. 7:707–713.
243. **Silva E.M., Rogez H., Larondelle Y. (2007).** Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*; 55: 381-387.
244. **Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela Raventos R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
245. **Soni H., Malik J., Singhai A.K., Sharma S. (2013).** Antimicrobial and anti-inflammatory activity of the hydrogels containing rutin delivery. *Asian Journal of Chemistry* 25: 8371-8373.
246. **Sridevi G., Sembulingam K., Muhammed I., Srividya S., Prema S. (2015).** Evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of *Pergularia daemia*. *World Journal of pharmaceutical research*. 4(1): 1100-1108.
247. **Stanojević L., Stanojević M., Nikolić V., Nikolić L., Ristić D., Čanadanovic-Brunet J., Tumbas V. (2009).** Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. J. Extracts. *Sensors*, 9: 5702-5714.
248. **Stevigny C., Rolle L., Valentini N., Zeppal G., 2007.** Optimization of extraction of phenolic content from hazelnut shell using response surface methodology. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2817–2822.
249. **Sujith K., Ronald Darwin C., Suba V. (2011).** Antioxidant Activity of Ethanolic Root Extract of *Anacyclus pyrethrum*. *International Research Journal of Pharmacy*, 2:222-226.
250. **Suresh kumar S.V., Mishra S.H. (2008).** Hepatoprotective activity of extracts from *Pergularia daemia* (Forsk.) against carbon tetrachloride-induced toxicity in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46: 447-452.
251. **Suri C., Fung B.P., Tischler A.S., Chikaraishi D.M.(1993).** Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylaseSV40 T antigenic mice. *J Neurosci.*, 13:1280 -1291.

252. **Swerdlow J. (2000).** Nature et medicine: les plantes qui guérissent. National Geographic. 400p.
253. **Sylvestre M., Legault J., Dufour D., Pichette A. (2005).** Chemical composition and anticancer activity of leaf essential oil of *Myrica gale* L.. *Phytomedicine*, 12: 299-304.
254. **Szewczuk, C., Mazur, M. (2004).** Wpływ zróżnicowanych dawek nawozów azotowych na skład chemiczny pokrzywy zwyczajnej (*Urtica dioica* L.) zbieranej w trzech fazach rozwojowych. *Acta Sci. Pol. Agric.* 3, 229–237.
255. **Tahri A., Yamani S., Legssyer A., Aziz M., Mekhfi H., Bnouham M., Ziyat A. (2000).** Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *J. Ethnopharmacol.* 73: 95–100.
256. **Tayel A. et El- Tras W. (2012).** Plant extracts as potent biopreservatives for salmonella typhimurium control and quality enhancement in ground beef. *Journal of Food Safety*, 32(1), 115–121.
257. **Testai L., Chericoni S., Calderone V. (2002).** Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*) root extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *J Ethnopharmacol*, 81:105-9.
258. **Tissier Y. (2011).** Les vertus de l'ortie. Tredaniel. Paris: Le Courrier du Livre. 160 p.
259. **Tita B., Faccendini P., Bello U., Martinoli L., Bolle P. (1993).** *Urtica dioica* L.: pharmacological effect of ethanol extract. *Pharmacol Res*, 27:21-2.
260. **Toldy A., Stadler K., Sasvari M., Jakus J., Jung K. (2005).** The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 65 (6): 487-493.
261. **Tomaino A., Cimino F., Zimbalatti V., Venuti V., Sulfaro, V., De Pasquale A. & Saija A. (2005).** Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem.*, 89: 549–554.
262. **Tomas- Barberan F.A., Ferreres F., Gil M.I. (2000).** Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Studies in Natural Products Chemistry*, 23: 739-795.
263. **Tripathi K.D., 2008.** Essentials of medical pharmacology. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd. p. 189.
264. **Tsao R., Deng Z.Y., 2004.** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J. Chromatogr. B* 812, 85–99.

265. **Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M et al., (1996).** Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol*, 50: 27–34.
266. **Tura D., Robards K., 2002.** Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *J. Chromatogr. A* 975, 71–93.
267. **Turker A.U., Usta C. (2008).** Biological screening of some Turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. *Nat Prod Res*; 22:136–46.
268. **Turner R. (1965).** Acute toxicity: The determination of LD₅₀. In: *Screening Methods in Pharmacology*. New York: Academic Press; p. 61-3.
269. **Ullah R., Hussain I., Ahmad S. (2013).** Diocanol: one new phenol derivative isolated and characterized from *Urtica dioica*. *Arabian Journal of chemistry*, 7:746-750.
270. **Unten L., Koketsu M., Kim M. (1997).** Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agric. Food Chem.* 45(6): 2009-2012.
271. **Upton R. (2013).** Stinging nettles leaf (*Urtica dioica* L.): Extraordinary vegetable medicine. *Journal of Herbal Medicine.* 3(1):9-38.
272. **Ushikubi F., Segi E., Sugimoto Y., Murata T., Matsuoka T., Kobayashi T., Hizaki H., Tuboi K., Katsuyama M., Ichikawa A., Tanaka T., Yoshida N., Narumiya S. (1998).** Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*, 395:281–284
273. **Vajic U-J., Grujic-Milanovica J., Miloradovic Z., Jovovic D., Ivanov M., Danijela K., Katarina S., Bugarski B., Mihailovic-Stanojevic N. (2018).** *Urtica dioica* L. leaf extract modulates blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Phytomedicine.* 46: 39-45.
274. **Vajic U.J., Grujic-Milanovi J., Zivkovi J., Savikin K., Godevacc D., Miloradovic´ Z., Bugarski B., Mihailovic-Stanojevic N.(2015).** Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 74:912-917.
275. **Valiathan M.S. (1998).** Healing plant. *Curr. Sci.*, 75: 1122-1126.
276. **Van Damme E.J.M., Broekaert W.F., Peumans W.J. (1988).** The *Urtica dioica* Agglutinin Is a Complex Mixture of Isolectins 1. *Plant Physiology.* 86(2):598-601.
277. **Verdinelli M., Fois X., Cossu C.S. (2013).** Le proprietà antinsetto di specie vegetali di interesse tessile e tintorio. In: *Estratti Naturali Da Piante Medicinali E Tessili-Tintorie. Caratterizzazione ed Usi Innovativi Di Ortica, Daphne, Lavanda E Tannini Da Castagno*. ARACNE Editrice, pp. 73–100.

- 278. Vergne P., Bertin P., Trèves R. (2000).** Aspirine, douleurs et inflammation. *La Revue de Médecine Interne*. 21: S89- S96.
- 279. Vinda-Martos M., Riuz-Navajas Y., Fernandez- Lopez J., & Perez-Alvarez J. A. (2011).** Spices as functional foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 56(6), 399–414.
- 280. Vogl C.R., Hartl A. (2003).** Production and processing of organically grown fiber nettle (*Urtica dioica* L.) and its potential use in the natural textile industry: a review. *Am. J. Altern. Agric.* 18, 119–128
- 281. Wagner H., Geiger W.N., Boos G. (1995).** Studies on the binding of *Urtica dioica* agglutinin (UDA) and other lectins in an in vitro epidermal growth factor receptor test. *Phytomedicine*, 1:287-90.
- 282. Wagner H., Willer F., Samtleben R., Boos G. (1994).** Search for the antiprostatic principle of stinging nettle (*Urtica dioica*) roots. *Phytomedicine*. 1994;1(3):213-224.
- 283. Wagner J.G. et Roth A.R.(2000).** Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacology Reviews Online*, 52: 349 – 374.
- 284. Walter C., Shinwari Z. K., Afzal I., Malik R.N.,2011.** Antibacterial activity in herbal products used in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*.43: 155- 162.
- 285. Walum E. (1998).** Acute oral toxicity. *Environ. Health Perspect*, 106:497- 503.
- 286. Weill B. et Batteux F. (2003).** Immunopathologie et réactions inflammatoires. *Science médicales : Série Laennec*, Ed.De Boeck Supérieur. 2003p.
- 287. Weissmann G., Smolen J.E., Korchak H.M. (1980).** Release of inflammatory mediators from stimulated neutrophils. *New England Journal of Medicine*, 303: 24 –27.
- 288. Wichtl M., Anton R. (2003).** Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. *ime* édition française par R. Anton Paris: éd. Tee & Doc; Cachan: éd. Médicales Internationales, 692p.
- 289. Winter C.A., Risley E.A., Nuss G.W. (1962).** Carrageenin-induced œdema in hind paw of the rats as an assay of anti-inflammatory drug. *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 544–547.
- 290. Wolf F (1998).** Gonarthrose: Brennesselblätter-Extrakt IDS 23 in der Langzeitanwendung. *Kassenarzt* 44: 52–54

291. **Wolf F., Gulbin K., Mielke F. (2001).** Aktivierte Arthrose: Brennesselblätter-Extrakt mit Leitsubstanz HOTrE (STRAT 59) hummt tumor-Nekrose-Faktor-a. *Kassenarzt*; 16:42–7
292. **Wu S. J. et Ng L.T. (2010).** Tocotrienols inhibited growth and induced apoptosis in human HeLa cells through the cell cycle signaling pathway, *Integrative Cancer Therapies*, vol.9, 66 –72.
293. **Yam M. L., Abdul H. S.R., Cheng H. M., Nesaretnam K. (2009).**Tocotrienols suppress proinflammatory markers and cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 macrophages. *Lipids*, 44, 787– 797.
294. **Yang J., Guo J., Yuan J. (2008).** In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT* 41:1060–1066.
295. **Yenes Z., Celik I., Ilhan F., Bal R. (2009).** Effects of *Urtica dioica* L. seed on Lipid peroxydation antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *Food Chem Toxicol.* 47 (2): 418-424.
296. **Yıldız, L., Sözgen Baş, kan, K., Tütem, E., Apak, R., 2008.** Combined HPLC–CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta* 77, 304–313.
297. **Yu HH, Liu XG, Xing RE, Liu S, Guo ZY, Wang PB (2006).** In vitro determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Food Chemistry* 95: 123-130.
298. **Zekovic Z., Cvetanovic A., Svarc-Gajic J., Grojanovic S., Suznjevic D., Maskovic P., Savic S., Radojkovic M., Durovic S. (2017).** Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques. *Industrial Crops & Products*; 108: 423-430.
299. **Zenao S, Aires A, Dias C, Saavedra MJ, Fernandes C (2017).** Antibacterial potential of *Urtica dioica* and *Lavandula angustifolia* extracts against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers. *Journal of Herbal Medicine* 10: 53-58.
300. **Zhang H, Li N, Li K, Li P (2014).** Protective effect of *Urtica dioica* methanol extract against experimentally induced urinary calculi in rats. *Molecular Medicine Reports.* 10: 3157-3162.