



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

Dans le cadre d'une formation d'un Master académique en Pharmacologie
et Toxicologie

Sous le thème :

**Valorisation de l'ortie (*urtica dioïca* L)
Phytochimie, Activité antibacterienne, Activité
anti- hémolytique**

Présenté par :

Salah Hafssa Khadidja

Yessead Djamila

Devant la Commission d'Examen :

Mme kribi. S	MCB	Encadreur
Mme Bouabdeli. F	MCB	Examinatrice
Mme Attou. N	MCB	Présidente

Année Universitaire : 2017-2018

Remerciements

Avant tout nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce mémoire.

Nous remercions notre encadreur de son grand aide durant la réalisation de ce travail, elle nous a orienté vers le succès avec ses connaissances et son encouragement. Elle été présente à tout moment qu'on a besoin d'elle M^{me} Kribi Soraya

Nous remercions les membres de jury d'avoir d'accepté d'examiner et de juger notre travail

M^{me} Attou. Nassrine M^{me} Bouabdalli. Fatma

Nos remerciements vont à tous les enseignants du département Des Sciences Biologiques. -

Nous remercions toute l'équipe de laboratoire de biochimie à l'université de Mostaganem ainsi qu'à toute l'équipe de laboratoires de microbiologique l'hôpital Che-Guevara Mostaganem, pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.

Nous tenons à remercier monsieur le responsable de la spécialité pharmacologie toxicologie professeur Djebli. Noureddine

A tous nos collègues de promotion pharmacologie toxicologie.

Liste des abréviations

C° : Degré Celsius

ML : Microlitre

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

ML : millilitre

Mm : Millimètre

min : Minute

nm : Nanomètre

Hcl : chlorure d'hydrogène

L : litre

g : gramme

GR : globule rouge

CO₃N₂ : nitrate de cobalt(II)

MgCl₂ : chlorure de magnésium

H₂SO₄ : l'acide sulfurique

KI : iodure de potassium

H₂Cl₂ : chlorure d'hydrogène

I₂ : le diiode

FeCl₃ : tri chlorure de fer

NH₄OH : ammoniaque

Na OH : hydroxyde de sodium

h : heure

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

Na Cl : chlorure de sodium

Cm : centimètre

V : volume

C : Concentration

PBS : tampon phosphate salé

T/mn : tour par minute

TC° : température degré

M : mole

PA: principe actif

µm : micromètre

g/j : gramme par jour

UV : ultraviolet

RBC : L'exposition des globules rouges

Rpm : tour par minute

SIPF : Les suspensions intégrales de plantes fraîches

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractères morphologique et culturels de <i>Staphylococcus aureus</i>	08
Tableau 2: Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti hémolytique.....	11
Tableau 3: Indication et modes d'emplois d'ortie.....	16
Tableau 4: Tests phytochimiques d' <i>Urtica dioica</i> L (extrait alcoolique et infusion).....	31
Tableau 5: Test d'activité antimicrobienne de l'extrait alcoolique sur <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Tableau 6: Test d'activité antimicrobienne de l'infusé sur <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Tableau 7: Les valeurs de densité optique du test positif de l'hypotonique (A).....	38
Tableau 8: Les valeurs de densité optique du test antihémolyse de l'extrait méthanolique (induction de l'hypotonique (A)).....	39
Tableau 9: Les valeurs de densité optique du test antihémolyse de l'extrait méthanolique (induction de l'hypotonique Na Cl (B))	40
Tableau 10: Les valeurs de DO du test thermo-hémolyse en présence et en absence de l'extrait d'ortie	41
Tableau 11: Les valeurs de DO du test d'hémolyse induite par le H ₂ O ₂ en présence et en absence de l'extrait d'ortie	42

Liste des Figures

Figure 1: Historique d' <i>Urtica dioica</i>	12
Figure 2: <i>Urtica dioica</i> L.....	14
Figure 3: Fleur d' <i>Urtica dioica</i>	15
Figure 4: <i>Urtica dioica</i> L (Université de Mostaganem)	19
Figure 5: Protocole de préparation d'extrait méthanolique par macération.....	21
Figure 6: Protocole de préparation de la solution d'infusion.....	21
Figure 7: Schéma d'activation de la souche bactérienne (<i>Staphylococcus aureus</i>).....	24
Figure 8: schéma de préparation de l'antibiogramme.....	25
Figure 9: Induction de l'hémolyse par Na Cl sur l'hématocrite à 10%.....	27
Figure 10 : Induction de l'hémolyse par l'éthanol sur l'hématocrite à 10%.....	28
Figure 11: Induction de l'hémolyse par la température sur l'hématocrite à 10%.....	28
Figure 12: Induction de l'hémolyse par H ₂ O ₂ sur l'hématocrite à 4%.....	28
Figure 13: Schéma de l'effet anti-hémolytique de l'extrait d' <i>Urticadioica</i>	30
Figure 14: les témoin des extraits	32
Figure 15: Tests phytochimiques	33
Figure 16: Suite tests phytochimiques.....	34
Figure 17 : Effet de l'infusé de <i>U. dioica</i> à différentes concentration sur <i>Staphylococcus aureus</i>	36
Figure 18: Effet de l'extrait méthanoliques de <i>U.dioica</i> à différentes concentration sur <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Figure 19: Effet de l'antibiotique ciprolon « ciprofloxacine »(chlorydrate) 250 mg sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Figure 20: Témoin positif de l'hémolyse induite par l'éthanol.....	38
Figure 21: Effet de l'extrait l'ortie sur l'hémolyse induite par l'éthanol	39
Figure 22: Effet de l'extrait l'ortie sur l'hémolyse hypotonique induite par Na Cl	40
Figure 23: Activité antihémolytique de l'extrait de l'ortie (hémolyse induite par la température).....	41
Figure 24: test anti-hémolyse de l'extrait de l'ortie (hémolyse induite par H ₂ O ₂	42

Résumé

L'Ortie est une plante communément répandue. Tout le monde la connaît pour son contact urticant qui laisse un souvenir désagréable. En fait, c'est une plante médicinale utilisée depuis l'Antiquité pour ses nombreuses propriétés thérapeutiques.

Dans le but de connaître les activités biologiques des plantes médicinales utilisées traditionnellement par la population, notre travail a porté sur l'étude des extraits bruts des feuilles et tiges d'une plante, *Urtica dioica* (Urticaceae) par la méthode d'infusion et alcoolique. Le criblage phytochimique a révélé une richesse en substances bioactives.

L'activité antimicrobienne *in vitro*, vis-à-vis de la souche de bactérie pathogène *Staphylococcus aureus*, en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé a montré que les extraits ont un effet antimicrobien vis-à-vis de la souche testée.

L'activité anti-hémolytique *in vitro* des extraits méthanoliques des parties aériennes a été mesurée par différents types d'inducteurs d'hémolyse. Les extraits ont démontré un effet anti-hémolytique dans les trois cas où l'hémolyse est induite hypotoniquement par la température et par H₂O₂.

Mots clé : *Urtica dioica* L ; Phytochimie ; Activité antimicrobienne ; activité anti-hémolytique

Table des matières.

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie I *Synthèse bibliographique*

Chapitre I: Les plantes médicinales

1. Généralité	4
2. Plantes médicinales.....	4
2.1. La phytothérapie.....	4
2.2. Aromathérapie.....	5
3. Les métabolites secondaires.....	5
3.1 .Les polyphénols.....	5
3.2. Les flavonoïdes.....	5
4. Les extraits des plantes médicinales.....	6
4.1. Les formes des extraits de plante médicinales.....	6
4.1.1. L es extraits aqueux.....	6
À. Les tisanes.....	6
B. La macération.....	6
4.1.2. Les extraits par solvants éthanoïques ou hydroalcooliques	6
À. Les teintures.....	7
B. Les teintures mères.....	7

C. Les alcoolatures.....	7
D.. Les suspensions intégrale de plante fraîche (SIPF).....	7
4.1.3. Extraits glycinés.....	7
4.1.4. Autres formes galénique des extraits.....	7
À. Les extraits secs pulvérulents.....	7
B. La poudre de la plante.....	8
5. La Phytochimie.....	8
6. L'activité antibactérienne.....	8
6.1. La famille de micrococcaceae.....	8
6.2. Staphylococcus aureus.....	8
6.3. L'antibiogramme.....	9
6.4. La méthode d'antibiogramme.....	9
7. Activité anti-hémolytique.....	9
7.1 Généralité sur les hématies.....	9
7.2. Les processus de l'hémolyse.....	10

Chapitre II: Description de l'ortie (*Urtica dioïca*).

1. Historique.....	12
2. Dénomination de l'ortie.....	13
3. Origine et aire de répartition.....	13
4. Classification et caractères botaniques.....	13

5. Description générale.....	13
5.1. Les feuilles.....	14
5.2. La tige.....	14
5.3. Les fleurs.....	14
5.4. La floraison.....	15
6. La Phytochimie d'ortie.....	15
6.1. Partie aérienne.....	15
6.2. Racines.....	16
7. Principales utilisations.....	16
7.1. Traditionnelles.....	16
7.2. Actuelles.....	16
8.Sécurité.....	17
8.1 .Effets indésirables.....	17
8.2. Contre indications.....	17
8.3. Interaction.....	17

Partie II

Matériels et méthodologies

1. Objectif d'étude.....	19
2. Matériel biologique.....	19
3. Matériel de laboratoire utilisé.....	20
4. Méthodologies.....	20

4.5.2. Préparation de suspension erythrocytaire.....	26
4.5.3. Induction de l'hémolyse induite vitro.....	26
4.5.3.1. Tests d'hémolyse hypotonique.....	26
4.5.3.2. Test de thermo-hémolyse.....	28
4.5.3.3. Test d'hémolyse induit par le H ₂ O ₂	28
4.5.4. Evaluation de l'effet anti-hémolytique d'extrait <i>l'Urtica dioïca</i>	29
4.5.4.1.Effet sur l'hémolyse induit par le NaCl.....	29
4.5.4.2.Effet sur l'hémolyse induit par l'éthanol.....	29
4.5.4.3.Effet sur le thermo-hémolyse.....	29
4.5.4.4. Effet sur l'hémolyse induit par le H ₂ O ₂	29

Partie III

Résultats et interprétation

1. Résultats des tests phytochimiques.....	32
1.1 .Interprétation des résultats des tests phytochimiques.....	34
2. Résultats d'activité antibactérienne.....	35
2.1. Interprétation des résultats d'activité antibactérienne.....	37
3. Résultats d'activité anti-hémolytique.....	38
3.1. Résultats du témoin positif hypotonique.....	38
À. Induction par éthanol.....	38.
Interprétation	38.

A-1. Test anti-hémolyse de l'extrait méthanolique de l'ortie.....	39
Interprétation.....	40
B- Induction Par N'a Cl.....	40
Interprétation.....	41
3.2. Résultat du test anti-hémolytique de l'extrait méthanolique de l'ortie en présence de thermo-hémolyse.....	41
Interprétation.....	42
3.3. Résultat du test anti-hémolyse de l'extrait méthanolique de l'ortie hémolyse induite par H2O2.....	42
Interprétation.....	43
Discussions générale.....	44
Conclusion générale.....	47
Références bibliographique.....	49

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les plantes ont servi de pharmacothèque naturelle et pragmatique pour l'Homme. Il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir ou tout au moins soulager un état pathologique ou des troubles organiques (**Schauenburg et Ferdinand, 2006**). L'Organisation Mondiale de la santé (**OMS**) estime environ 80% des habitants de la planète ont recours à la médecine traditionnelle à base de plante en tant que soins de santé primaire (**Berube, 2006**).

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plus riches dans le monde avec un nombre très élevé de plantes qui possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent des applications dans divers domaines, à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture. (**Farombi, 2003**). Parmi ces plantes l'Ortie « *Urtica dioica* L », une plante sauvage présente partout, sur les chemins, les ruines. Elle est une des rares plantes que l'on peut reconnaître les yeux fermés. Qui ne s'est jamais laissé surprendre par son contact irritant ? C'est sans doute ce qui explique que l'ortie est tombée un peu dans l'oubli. C'est une plante aux mille vertus, que nos ancêtres savaient apprécier. Considérée comme une « mauvaise herbe », elle est employée en agriculture, en alimentation, cosmétique, teinturerie, l'industrie du textile et à des fins médicinales (**Bertrand et Jeanne, 2008**). Elle est couramment utilisée comme tonique dépurative, diurétique et anti inflammatoire en plus, fait toujours l'objet de plusieurs travaux de recherches (**Yener et al, 2008**).

On redécouvre actuellement ses qualités ainsi que ses nombreuses applications dans des domaines aussi variés que thérapeutiques. Toutes raisons suffisantes pour l'étudier afin de découvrir ou redécouvrir ce que cette plante sauvage peut nous apporter.

A cet effet et dans le cadre de la valorisation de cette espèce médicinale poussant à l'état spontané dans la région de Mostaganem, nous nous sommes proposé d'explorer ces activités biologiques et anti-hémolytiques dans ce présent travail qui est divisé en trois parties :

- ✓ La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique sur la phytothérapie, les extraits végétaux et la présentation de l'Ortie
- ✓ La deuxième partie traite matériels et méthodologie
- ✓ La troisième partie regroupe l'ensemble des résultats et interprétations.

Notre mémoire se termine par une discussion générale et une conclusion générale et enfin les références bibliographiques

Chapitre I

Les plantes médicinales

1. Généralités

La connaissance rationnelle des plantes médicinales date de l'Antiquité. Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées (**Carillon, 2000**). Le savoir traditionnel ancestral, transmis de génération en génération, est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuses pour les chercheurs d'industrie pharmaceutique (**Fouché et al, 2000**).

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme model pour les composés pharmaceutiquement actifs (**Decaux, 2002**).

2. Plantes médicinales

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française, comme une « drogue végétale au sens de la pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante, utilisée à l'état frais ou sous la forme desséchée (**Fouché et al, 2000**). L'expression drogue végétale ou, plus couramment, drogue, désigne donc une matière première naturelle servant à la fabrication de médicaments (**Mohammedi, 2013**).

2.1. La phytothérapie

La phytothérapie désigne la médecine fondée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels, la phytothérapie est le nom que porte la médecine par les plantes au moyen âge, ne pas confondre avec la phytopharmacie qui désigne l'ensemble des substances utilisées , pour traiter les plantes. On peut distinguer deux types de pratiques :

- Une pratique traditionnelle par fois ancienne basée sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement c'est une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays.

- La pratique basée sur les avancées scientifiques et les recherches des principes actifs des plantes (phytochimies), cette phytothérapie assimilée aux médicaments. **(Mathieu et Fonteneau, 2008).**

2.2. L'aromathérapie

C'est une approche de soins, assez complexe, dont les essences aromatiques des plantes constituent la base **(Shaw, 2007)**. C'est est une « niche » de la phytothérapie utilisant les huiles essentielles pures tirées des plantes appréciées pour leur propriétés thérapeutiques le traitement suppose l'application des huiles essentielles sur le corps pour améliorer la santé physique, mentale ou émotionnelle de l'individu.

Les huiles essentielles sont presque toujours utilisées diluées, et de différentes façon par diffusion dans l'atmosphère, par massage, par inhalation, par voie orale **(Boyrie, 2014)**

3. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires présentent une infinie variété de substances, dont le rôle dans la plante est encore souvent mal connu. Un grand nombre de ces métabolites secondaire présente des propriétés pharmacologique intéressantes par fois exploitées dans un but thérapeutiques, soit après extraction à partir de la plante, (morphine du pavot, quinine de quinquina...etc) soit directement, on utilise alors la plante ou une préparation simple issue de la plante (poudre, teinture, extrait...etc). **(Bénédicte, 2007)**

3.1. Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal. Ils sont caractérisés comme l'indique le nom par la présence des plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire. Ces composés sont les produits de métabolisme secondaires des plantes. **(Tapiero et al., 2002)**. Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturel suscite de plus en plus d'intérêt pour prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires, et neuro-dégénératives

3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui contribuent entre autres à colorer les fleurs et les fruits en blanc. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales antioxydants, ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne

circulation. Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes, et antivirales (Iserin, 2001)

4. Les extraits de plantes médicinales

Les extraits de plantes sont des substances de consistance fluide, semi-solide, ou solide, résultant de l'évaporation soit d'un suc de plante, soit d'une solution extractive obtenue en traitant les matières premières végétales par un solvant approprié.

Chaque extrait est défini par son mode de préparation, la composants, la teneur éventuelle en principes actifs, la perte à la dessiccation ou le résidu sec.

Un extrait se prépare donc en deux temps :

- * La préparation du liquide extractif.
- * La concentration des solutions extractives effectuées par évaporation. (Fouché et al, 2000)

4.1. Les formes des extraits de plantes médicinales

4.1.1. Les extraits aqueux

A. Les tisanes : regroupent les infusions et les décoctions

***Infusion :** L'infusion consiste à recouvrir d'eau bouillante les parties végétales fragmentées. Elle convient aux parties de la plante les plus fragiles et à celle riches en huiles essentielles. Le temps d'infusion est variable selon les plantes (de quelques minutes à 1 heure) (Nogaret-Ehrhart, 2003).

* **La décoction :** convient aux parties ligneuses de la plante comme les tiges, les racines et l'écorce. Il s'agit ici de plonger les parties de plante sèche à froid dans de l'eau et de porter le tout à ébullition pendant 10 minutes à 1h en fonction des plantes (Potel, 2002).

B. La macération : Il s'agit d'un processus d'extraction à température ambiante (15-20C°) le liquide employé peut être l'eau, alcool, parfois le vin le temps de macération dépend des propriétés intrinsèques de la plante la macération à l'eau ne doit pas se prolonger trop long temps pour éviter tout risque de fermentation ou de moisissure (Potel, 2002).

4.1.2. Extrait par solvant éthanoïques ou hydroalcooliques

A. Les teintures : Sont des préparations alcooliques résultant d'un traitement extractif exercé par alcool éthylique sur les drogues sèches. On les prépare par macération (drogue+ solvant à froid) ; par lixiviation (passage plus ou moins rapide du solvant froid ou chaud à travers la poudre végétale).

Les teintures correspondent au 1/5^e de leur poids de drogue sèche (sauf les teintures héroïques qui sont au 1/10^e). (Odile , 2011)

B. Les teintures mères : Actuellement, sont utilisés les teintures mères homéopathiques préparées à partir de drogues fraîches par macération 10 jours minimum (selon la pharmacopée européenne) dans de l'éthanol de titre différent selon les plantes (45 à 65° en général). Elles correspondent au 1/10^e de leur poids de plante sèche (il faut donc tenir compte du degré de déshydratation de la plante).

C. Les alcoolatures : Ce sont des préparations résultant de l'épuisement par l'alcool des drogues fraîches. Les proportions employées sont à parties égales en poids de plantes fraîches et d'alcool à titre élevé. Les plantes fraîches sont mises à macérer pendant huit jours avec l'alcool dans un récipient clos. Après une compression on passe à une filtration. (Fouchet et al, 2000)

D. Les suspensions intégrales de plantes fraîches (SIPF) : Sont des cryobroyats composés de drogue fraîche suspension dans une solution hydro alcoolique. Elles sont obtenues à partir de la totalité de la drogue fraîche par un procédé original qui permet le blocage des réactions enzymatiques évitant ainsi tout risque de modification, ou dégradation des principes actifs. Il est indispensable de les diluer afin de débloquent les réactions enzymatiques et de diminuer le titre alcoolique (Fouchet et al, 2000)

4.1.3. Extraits glycinés

La plante fraîche est cryobroyée puis les principes actifs hydrosolubles isolés par extractions successives dans l'eau et l'alcool de degré croissant. L'alcool est évaporé sous vide puis le résidu sec est mis en suspension dans le glycérol (Bertrand, 2010).

4.1.4. Autres formes galéniques des extraits

Selon Cazau-Beyret Nelly (2013) plusieurs formes de préparations d'extraits peuvent être mises en œuvre pour l'obtention d'effet thérapeutique à partir d'une plante dont parmi :

A. Les extraits secs pulvérulents : Leur préparation se fait en trois phases : l'extraction des principes actifs (PA) par macération ou lixiviation dans l'eau ou l'alcool, La filtration et la concentration et en fin l'élimination du solvant par séchage.

B. La poudre de plante : Obtenue par simple broyage de la plante sèche, elle conserve le *totum* de la plante. Des gélules peuvent être fabriquées avec cette poudre

5. La phytochimie

Appelée aussi chimie des végétaux, est la science qui étudie la structure, le métabolisme et la fonction ainsi que les méthodes d'analyses de purification et d'extraction des substances naturelles issues des plantes. Elle est indissociable à d'autres disciplines telles que la pharmacognosie, traitant des matières premières et des substances à potentialité médicamenteuse d'origine biologique (**Benedicte, 2007**)

6. L'activité antibactérienne

C'est un organisme vivant unicellulaire procaryote caractérisé par une absence de noyau et d'organites. La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique, le peptidoglycane. Le plus gros mesurent plus de 2 μ m et les plus petites mesuraient 0,2 μ m (**Hahm et al, 2003**). Elles présentent de nombreuses formes sphérique (coques), allongées ou en bâtonnets (bacilles), des formes plus ou moins spiralées. L'étude des bactéries est la bactériologie, une branche de la microbiologie.

6.1. La famille de micrococcacea

Une famille de bactéries contenant des cellules Gram-positif sphérique qui se produisent seuls ou en couples, tétrades, les paquets, les chaînes de masses irrégulières.

Ces organismes sont rarement mobiles, espèces vivant en liberté, saprophytes, parasites, et pathogènes, le genre de type est micrococcus. (**Lippincollet, 2006**)

6.2. Staphylococcus aureus

Les caractéristiques de la bactérie sont résumées dans le tableau (1)

Tableau 1: Caractères morphologique et culturaux de Staphylococcus aureus (**Azele , 1999**)

La bactérie	Caractères microscopiques	Gram	Caractère culturaux
Staphylococcus aureus	Cocci en chainettes courtes de 0,5025 μ m regroupées de raisin immobiles	positif	Colonies jaunes dorées sur milieu Chapman

6.3. L'antibiogramme

Dans l'étude des agents de contrôle antimicrobienne, il ne fut mentionné que de produits pouvant être néfastes pour l'être vivant dans le but de surmonter ce problème de toxicité, plusieurs chercheurs Ehrlich, Fleming, Domagle, (1979) ont découvert des agents chimiques agissant sur

une population microbienne sans affecter l'hôte. Parmi ces agents chimio-thérapeutiques, on trouve les sulfamides, les antibiotiques naturels et les agents de synthèse afin d'évaluer l'efficacité de ces agents, leur activité bactéricide ou bactériostatique se limitait à certains microorganismes.

Le test de sensibilité aux antibiotiques s'appelle communément l'antibiogramme, il consiste à éprouver *in vitro* la capacité d'un antibiotique d'inhiber la croissance d'un germe.

6.4. La méthode de l'antibiogramme

Utilisant des petits disques de papier imbibés d'antibiotiques et disposés sur une gélose pré-ensemencée, est la plus populaire et celle qui nous intéresse ici.

Il suffira de noter après 18-24h d'incubation, s'il y a une zone d'inhibition de croissance autour de l'antibiotique pour en apprendre son efficacité. (**Raymond, 1979**)

7. Activité anti-hémolytique

7.1. Généralités sur les hématies

L'hématie normale est une cellule anucléée arrondie en forme de disque biconcave de taille qui varie de 4 à 7 μ l selon les espèces animales. Chez les mammifères, les globules rouges sont de formes discoïdes biconcaves en milieu isotonique. Dans un milieu hypotonique, quand la concentration de Na Cl dans le plasma diminue par rapport à celle des globules rouges (GR), l'hémolyse se déclenche et l'hémoglobine est libérée. Par contre, dans un milieu hypertonique où la pression osmotique extérieure est supérieure à celle des globules rouges, les cellules gonflent et prennent un aspect crénelé. Les globules rouges sont élastiques et déformables, ce qui leur permet de traverser les capillaires les plus étroits. Chez les animaux, le nombre des globules rouges varie en fonction de l'âge, sexe et l'altitude. (**Gwalter, 1992**). Quand l'âge de l'animale augmente, le nombre des érythrocytes diminuent. (**Hayrvey et al, 1984**). Chez les nouveaux nés, dont l'organisme s'est adapté pendant la vie fœtale aux échanges d'oxygène à travers le placenta, le nombre de globules rouges est très élevé. Les GR sont plus nombreux chez les femelles que chez les males.

7.2. Processus de l'hémolyse

Le processus d'hémolyse est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leur contenu. Des facteurs proprement corpusculaires, comme l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine, règlent le degré de l'hémolyse. Des facteurs extra-corpusculaires sont également importants dans le processus d'hémolyse citant, le plasma, l'état anatomique de l'appareil circulatoire et l'état

fonctionnel du système mononuclée phagocytaire. (Aguilar, 2007). L'hémolyse physiologique doit être différenciée de l'hémolyse pathologique ou l'hyperhémolyse liée à la modification des trois facteurs vitaux pour le GR. En l'occurrence, la membrane érythrocytaire ; le métabolisme énergétique (intégrité des enzymes impliqués) et le contenu hémoglobinique. (Dahmani et al, 2016).

Le traitement des anémies hémolytiques passe inexorablement par le traitement des causes de cette anémie. Il y a donc presque autant de traitements qu'il y a de causes. Un certain nombre de médicaments anti-hémolytiques, substances qui présentent la capacité à retarder ou à inhiber la lyse des globules rouges, sont disponibles. L'acide folique, un complément de fer, des corticoïdes et des suppléments de vitamine B peuvent être utilisés pour traiter les anémies hémolytiques. Les dernières années, le domaine de la recherche de nouvelles substances anti-hémolytiques d'origine végétale est en plein essor. Des investigations dans ce sens sont entrepris par de nombreux laboratoires de recherches à travers le monde. Le tableau ci-dessous (Tableau 2) représente quelques exemples de plantes testés à cet effet

Tableau 2 : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique.

Matrice végétale	Tests utilisés	Effets	Références
Feuilles de <i>piper betel</i> (inde)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Activité antihémolique 40.6% pour une concentration de 5mg/ml.	Devjani chakraborty shah 2011
Feuilles et tiges de <i>ammoides verticillata</i> (algerie)	Hémolyse provoquée par l'eau distillée	Effet hémolytique (IC ₅₀ = 0,0422 mg/ml, 35%)	Mémoire haoulia amina, 2015
Les feuilles et fleurs de <i>Gymnema sylvestre</i> (Nigeria)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Activité antihémolique IC ₅₀ =29.83	Omalejames et idris mordecai alewa 2014
Les feuilles <i>Sintenisii</i> (Iran)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Antioxydant et activité antihémolytique IC ₅₀ =1.108=0.048	Ebrahim zadeh et al 2009
Partie aérienne de <i>mentha longifolia</i> (Iran)	Hémolyse induite par H ₂ O ₂	Effet anti hémolytique IC ₅₀ = 951.4 = 36µg/ml	Ebrahim zadeh M.A et al, 2010
L'écorce des racines <i>Berberis vulgaris</i> (L) (Algerie)	Hémolyse provoquée par l'eau distillée	activité hémolytique et toxique	Mémoire elalaoui rachida 2015

Chapitre II

Description de l'Ortie « *Urtica Dioica L* »

1. Historique

Vénérée par les anciens peuples indo-européens des milliers d'années avant l'ère Chrétienne, mais souvent méprisée par le citadin, cette plante pourtant exceptionnelle de par la qualité de ses protéines, de sa richesse en vitamines et en minéraux, a été largement utilisée dans le monde rural et principalement dans les pays froids tels que la Scandinavie, l'Ecosse, la Prusse. Elle occupe une place particulière dans la culture allemande, notamment au nord de l'Allemagne où on l'a cultivée jusqu'à la seconde guerre mondiale et commercialisée comme n'importe quel légume. En ce XXI^e siècle, la tendance est le retour au « naturel » plutôt que de produire des substances de synthèse. (Bertrand, 2010). Le résumé de l'historique de l'ortie est illustré dans la figure (1)

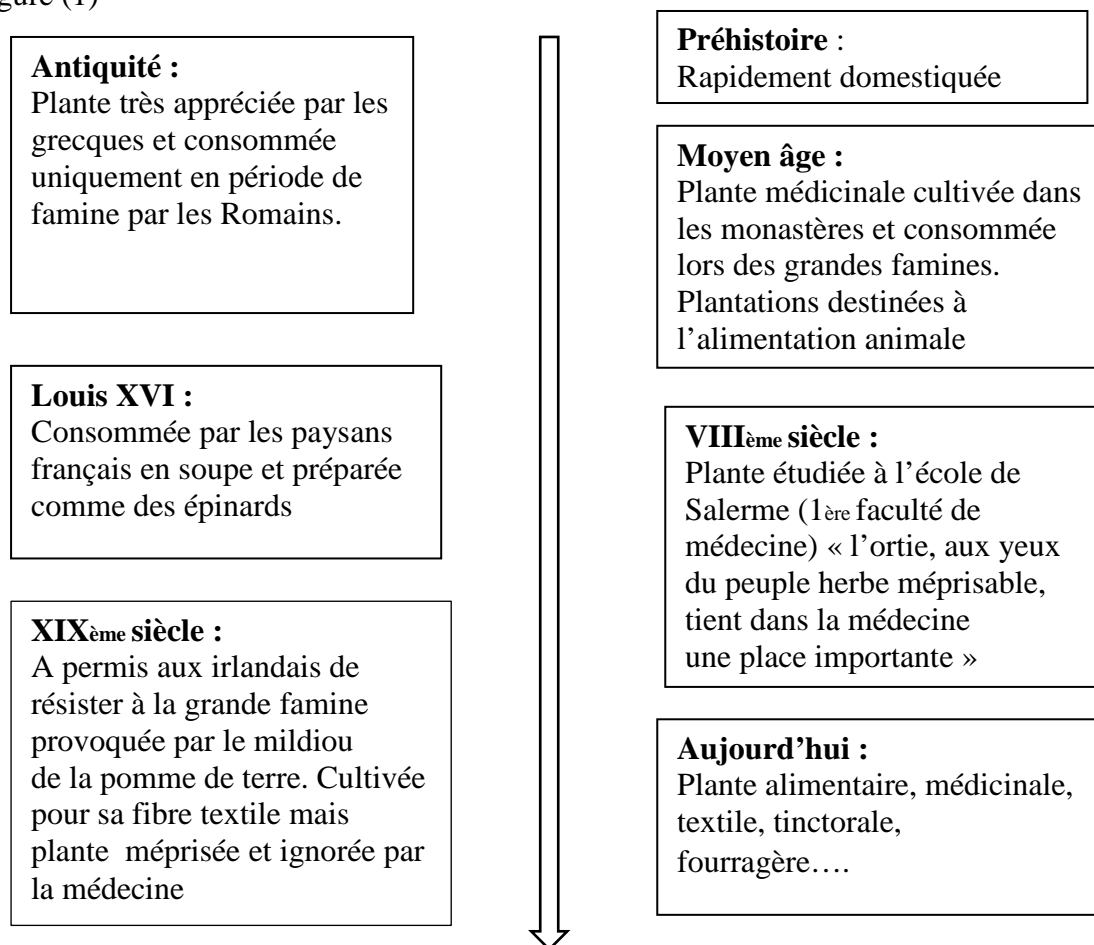


Figure 1 : Historique d'*Urtica dioica* (Bertrand, 2010)

2. Dénomination de l'ortie

a. nom vernaculaire arabe : -Horaig - Bent en nar -Bou Zegdouf (**Beloued, 2001**)

b. nom targui ou berbère : -Rimezrit - azekdouf - harrous (**Beloued, 2001**)

3. Origine et aire de répartition

Originnaire d'Eurasie, l'ortie s'est répandue dans toutes les régions tempérées du monde. On la rencontre plus en Europe du sud, en Afrique du nord, en Asie et largement distribuée en Amérique du nord et du sud (**Brisse et al, 2003**). Préférant un sol riche en azote, elle peut s'élever jusqu'à un mètre, et sa floraison, peu spectaculaire, se produit de juin à septembre. Elle colonise volontiers les abords des lieux habités qui sont négligés. (**Baba-Aissa , 1991**)

4. Classification et caractère botanique

Le genre *Urtica* espèce *dioica* L, appartient à la famille des Urticacées. Cette famille comprend près d'une cinquantaine de genres et plus de 700 espèces, elle est présente partout dans le monde. On distingue les Urticacées avec poils urticants (genre *urtica*) ou sans (genres *Parietaria* et *Boehmeria*) (**Apgil, 2003**). Une trentaine d'espèces présentes dans le monde sauf à Madagascar et en Afrique du Sud où l'ortie est absente. (**Bombardelli, 1997**).

* Classification cronquist 1981

Règne : plantae

Classe : magnoliopsida

Ordre : urticales

Famille : urticaceae

Genre : urtica

Nom botanique : *Urtica Dioica* L

Nom arabe : harrigua

5. Description générale

Herbacée vivace de 60 à 120 cm de haut. D'un vert sombre à tiges robustes dressés à feuilles opposées ovoïdes et acuminées (Figure 2), recouvertes de poiles urticants et hérissées.

La plante de ces poiles dures et coniques se brise lors d'un contact et injecte les substances urticantes. Contenus dans un massif cellulaire situe à leur base. Ce bord de feuille est pourvu de dents aigues les fleurs unisexuées, verdâtres, portées par des pieds différents forment de longues grappes dressées, rameuses à l'aisselle des fleurs. Odeur faible, peu caractéristique, avec une saveur aigrelette et astringente à l'état frais peu caractéristique à l'état sec (Caliskani Z et al, 2004)



Figure 2 : *Urtica dioica* L

5.1. La feuille :

Feuille simple charnue, tombantes dentelées, et la tige sont recouverts de poils urticants blanc. Les feuilles simples à long pétiole sont opposées deux à deux, de couleur vert foncé en raison de leur richesse en chlorophylle (Moutsie, 2008).

5.2. la tige

Dressée, velue, non ramifiée et quadrangulaire portant des poils urticants et des poils courts, très fibreuse porte des feuilles opposées (Schaffner, 1992).

5.3. Les fleurs

Sont déposées en grappes ramifiées, allongées et pendantes (figure 3), les grappes se situent à l'aisselle des feuilles comme déjà dit, la grande ortie et dioïque car elle porte les fleurs femelles et male sur des plants différents, alors que l'ortie brulante est monoïque (Fleurentin, 2008).

* **Fleurs femelles** : Elles ont 4 sépales et un ovaire velu de couleur verdâtre, les grappes

qui les portent pendent, en particulier lorsque les graines se forment, elles sont dépourvues de nectar (**Moutsie, 2008**).

* **Fleurs male** : Elles ont 4 sépales et 4 étamines, elles sont portées par longues grappes serrées très rameuses, développées par paires, à l'aisselle des feuilles. Chaque étamine libère environ 15000 graines de pollen jaune, à la réputation allergisante (**Moutsie, 2008**).

5.4. La floraison est estivale, soit du printemps jusqu'au début d'automne (**Fletcher, 2007**).



Figure 3 : Fleur d'*Urtica dioica* (**Moutsie, 2008**).

6. La phytochimie de l'ortie

6.1. Partie aérienne

- Vitamines B2 (riboflavine), B5 (acide pantothénique), C (acide ascorbique), E (tocophérol), de l'acide folique et de la vitamine K.
- Oligo-éléments : cuivre, fer, soufre, magnésium, zinc, manganèse, nickel.
- Chlorophylle (10-60%). (**Bertrand et al., 2010**)
- Acides organiques et amines : histamine, choline, acétyl choline, sérotonine.
- Tanins, du formate de sodium

- Composés azotés naturels : sa richesse en protéines végétales est grande, elles représentent de 5 à 9 % du poids frais de la plante

6.2. Racines

Phytostérols (Bertrand *et al*, 2010)

7. Principales utilisations

7.1. Traditionnelles

L'ortie est utilisée pour traiter plusieurs pathologies (Tableau 3)

Tableau 3 : Indication et modes d'emplois d'ortie (Cherif, 2000)

Indication	Mode d'emploi
Eczéma	Décoction tige et feuilles 20g de tige et feuilles pour 1l d'eau bouillie à réduction des 2-3 boire par journée
Lotion	Bouillir pendant 10min 30g d'ortie dans un ½ litre d'eau, filtrer
Pour les saignement de nez	Suc d'ortie : introduire dans le nez un petit tampon de coton imbibé de suc l'y maintenir quelques minutes.
La favorisation de lactation et purification du sang	Infusion de 50g de feuilles et de racines dans 1l d'eau bouillante, infuser 20min boire à volonté.
Fatigue, faiblesse trouble de ménopause	Un sirop : 250g d'ortie (suc) + 250g sucre, cuire jusqu'à consistance du sirop prendre 30 à 60g/j
Frigidité	1cuillère a café (5g) de semences d'ortie par jour avec la confiture ou miel
Inflammation de bouche	Bain de bouche Une poignée de plante entière pour ½ litre d'eau, bouillir 30min, laisser, rincer et rejeter

7.2. Actuelles

- a) Elle est utilisée pour traiter des maladies comme la goutte, asthme, les rhumatismes ou les problèmes de la prostate.
- b) Elle est également fortement hémostatique, elle traite les hémorragies.

- c) Soulage les problèmes de miction reliés à l'hypertrophie bénigne de la prostate, irrigue les reins, la vessie et les voies urinaires en cas des inflammations.
- d) Un traitement ou prévient la formation des calculs rénaux.
- e) L'utilisation des feuilles d'ortie contre l'anémie parce qu'elles contiennent de fer et zinc. (Vincent , 2000)

8. Sécurité d'utilisation de l'ortie

8. 1. Effet indésirable

De rares cas de réactions allergiques (démangeaisons, exanthèmes, urticaires, œdèmes, oligurie) et de troubles gastro-intestinaux (nausées, vomissements, diarrhées) ont été décrits. La fréquence d'apparition de ces effets indésirables n'est pas connue. (Rombi et Robert 2006)

8.2. Les contre-indications

L'ortie ne doit pas être consommée en cas :

- d'œdème par rétention due à une insuffisance cardiaque ou rénale. Tout comme le millepertuis,
- l'ortie est incompatible avec un certain nombre de traitements médicamenteux, dont elle entrave ou au contraire accentue l'action. En particulier les diurétiques, les anti-inflammatoires, les anticoagulants, les sédatifs, de même que la digitaline et les traitements contre l'hypertension.
- Pour ce qui concerne le diabète, si la tradition considérait l'ortie comme l'un de ses remèdes, les études cliniques sont divergentes.
- Il n'est pas conseillé aux femmes enceintes ou qui allaitent, ainsi qu'aux enfants de moins de 12 ans.

8.3. Interaction

Aucune n'est recensée. Mais il convient quand même de faire attention aux patients sous anticoagulants oraux à cause de la richesse de la plante en vitamine K. la prise d'un traitement complémentaire à base d'ortie chez ces patients doit se faire après avis d'un médecin.

De même, un traitement concomitant avec des diurétiques de synthèse n'est pas recommandé. (Ghedira et al. 2009 ; Bertrand 2010)

Matériels et méthodologie

Notre travail a été fractionné en trois parties d'études : les deux parties qui traitent la phytochimie et l'activité anti- hémolytique ont été effectuées au laboratoire de biochimie (1 et 2) à l'université Abdel Hamid Ibn Badis de Mostaganem et la partie de l'activité antimicrobienne a été faite au laboratoire de microbiologie à l'hôpital de **Che Guevara** à Mostaganem

1. Objectifs d'étude

L'intérêt de ce travail est la valorisation d'une plante médicinale très connue par la population Algérienne et qui est l'Ortie dioïque (*Urtica dioica* L) poussant à l'état spontané dans la région de Mostaganem. Cette valorisation vient dans le but de mettre en évidence son activité anti-hémolytique comme étude originale sur cette plante ainsi que de confirmer son activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* sachant que l'aspect anti microbien testé par *U. dioica* est largement étudié sur une gamme importante de microorganisme

2. Matériels biologique

***Le matériel végétal** utilisé est constitué des feuilles et des tiges d'*Urtica dioica* récoltées de l'université Abdel Hamid Ibn Badis (Mostaganem) au cours du mois de fin Février début Mars.



* Classification cronquist 1981

Règne : plantae

Classe : magnoliopsida

Ordre : urticales

Famille : urticaceae

Genre : urtica

Nom botanique : *Urtica Dioica* L

Figure 4 : *Urtica dioica* L (Université de Mostaganem)

* **Matériel bactérien** : Le germe *utilisé* est *Staphylococcus aureus*, souche identifiée et disponible au laboratoire de Nutrition à l'INES de chimie

* **Le sang** a été obtenu du centre de transfusion sanguine à l'hôpital de Che Guevara prélevé dans des tubes héparinés la veille du démarrage de la manipulation.

3. Matériels de laboratoire utilisés

Les réactifs	Verreries et appareils	Matériel microbien
Méthanol - Ethanol- FeCl ₃ - Folin – CO ₃ N ₂ – HCl - Mgcl ₂ Chloroforme- Réactif de Mayer H ₂ cl ₂ - KI- Réactif de Wagner-I ₂ - NH ₂ OH- Andhydre acétique- H ₂ SO ₄ - Na OH-Liqueur de Fehling A et B - Eau distillé.	Tubes à essai- éprouvette graduée- flacons- bécher- entonnoir-papier filtre- balance, bain marie- centrifugeuse-UV- spectrophotométrie- micropipette- agitateur, rotavapeur.	Suspension bactérienne de Staphylococcus aureus de Concentration de une colonie / 1ml de l'eau physiologique

4. Méthodologies

4.1. Préparation de l'extrait brute d'*Urtica dioica*

- Préparer la macération alcoolique avec le méthanol 96%, 20g de la poudre végétale (*Urtica dioica*) ont été mises à macérer dans 200 ml de méthanol à température ambiante pendant 48h.

- Après filtration la solution est introduite dans le rotavapeur pendant 20 min à 45- 50 C°

- L'extrait brute est récupéré dans des flacons stérilisés et opaques ensuite conservé dans le réfrigérateur jusqu'au moment de l'utilisation

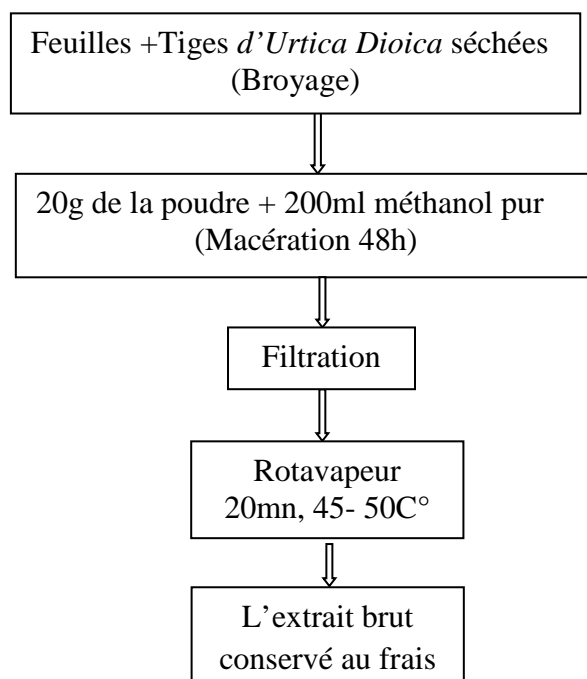


Figure 5 : Protocole de préparation d'extrait méthanolique par macération

4.2. Préparation de tisane par infusion

- Introduire 5g de poudre végétale dans 50ml de l'eau distillé bouillie
- Laisser infuser pendant 15 mn ensuite filtrer la préparation et conserver dans des flacons propres au réfrigérateur

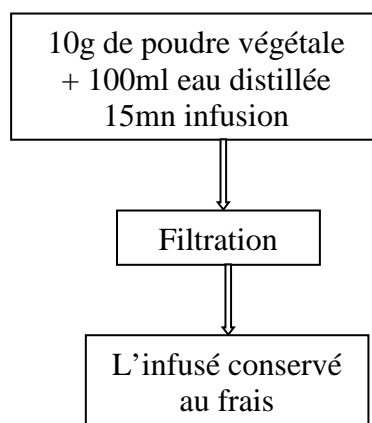


Figure 6 : Protocole de préparation de la solution d'infusion

4.3. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont réalisés sur l'extrait méthanolique et l'infusé des tiges et des feuilles d'*urtica dioica*

A) Les flavonoïdes

- Ajouter à 2ml d'extrait de plante, quelques gouttes de Hcl 37% et 0,5g de Mgcl₂.

Le test positif est marqué par l'apparition d'une couleur rouge ou orange qui caractérise les flavonoïdes. (Karumi et al, 2004)

B) Les terpénoïdes

-Mélanger 1 ml de chloroforme et 1.5 ml de H₂SO₄ avec 2.5 ml d'extrait. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

C) Les alcaloïdes

2.5 ml d'HCl à 1 %, sont ajoutés à 1 ml d'extrait puis incubés au bain- marie pendant 10 min.

*** Réactif de Mayer**

- Prendre 1,4ml de H₂cl₂ dans 60 ml d'eau distillé puis ajouter à 5g de KI 10ml d'eau distillé. Mélanger les deux préparations et ajuster le volume total à 100ml.

***Réactif de Wagner**

- Dans 75ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1.27g de I₂. Le volume obtenu est ajusté à 100 ml avec l'eau distillée.

La solution d'extrait déjà préparée est divisée en deux parties.

-Ajoute le réactif de Mayer à une partie et le réactif de Wagner à l'autre partie

L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

D) Les tanins

15 gouttes de Fe Cl₃ 1% sont ajoutées à 5 ml d'extrait. Après 2mn d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue noirdeative ou verte

E) Les coumarines

- Préparer une solution avec 1ml de la solution d'extrait avec 1 ml d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont la première représente un témoin et la deuxième est traitée avec 0.5 ml de NH₄OH à 10%.

- L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette (lecture réalisé au laboratoire de physique). L'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence des coumarines. (Bruneton, 1999).

F) Les stérols

- Ajouter à 1 ml d'extrait 2.5 ml d'anhydre acétique et 10 gouttes d'H₂SO₄ concentrée.

Les stérols sont révélés par une coloration violacée virant au vert.

G) Les quinones

- Quelques gouttes de Na OH à 1% sont ajoutées à 1ml de l'extrait

L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des

quinones libres (**Oloyede, 2005**).

H) Les saponines

- Ajouter 1 ml d'eau distillée à 2 ml de solution d'extrait
- Agitation pendant 1 minute

L'apparition d'une mousse qui persiste durant 15 minutes et dont l'épaisseur égale ou dépasse 1 cm. indique la présence des saponines

D) Les composés réducteurs

1 ml de l'extraits est mis au contact avec 0.5 ml de Liqueur de Fehling (A et B) le mélange est porté chauffé au bain marie à 100°C.

Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique (**Trease et Evans, 1987**)

J) les polyphénols

- 5ml de solution de folin sont ajoutés à 1ml solution d'extrait ①
 - 2g de CO₃N₂ sont diluée dans 20 ml d'eau distillée ②
 - Mélanger 14 ml de la solution ② avec 6 ml de la solution ① Pour obtenir les 20ml de la préparation ③
 - La préparation ③ est portée au bain marie pondant 20 mn
- Lecture des résultats est effectuée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm

4.4 Activité antibactérienne

4.4.1. Méthode de diffusion sur milieu gélosé

A- Principe

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide. Cela consiste à mettre la substance inhibitrice dans un disque imbibé ou un puits tracé sur la gélose inoculée par la souche cible au préalable. La substance inhibitrice diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du disque. Ainsi, la bactérie se développera si la concentration en antibiotique est inférieure à la concentration minimale inhibitrice ; ce qui se matérialisera par l'apparition d'une zone circulaire d'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque, et, en fonction du diamètre d'inhibition, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante (**Nicolas & Daniel, 1998**).

B-Activation de souche bactérienne

A l'aide d'une pipette Pasteur, la souche bactérienne a été ensemencée dans 10ml de bouillon nutritif à partir du milieu de conservation. Après 3h d'incubation à 37°C, 1ml de la solution est ensemencé sur gélose spécifique (Muller- Hinton) puis incubé pendant 24h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune et de colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum (Ait Chabane, 2008)

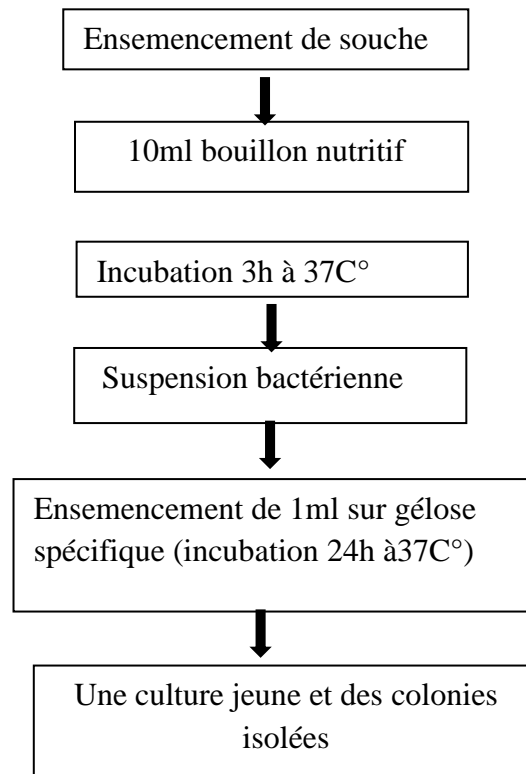


Figure 7 : Schéma d'activation de la souche bactérienne (*Staphylococcus aureus*)

C-Préparation de l'inoculum

- Préparer 1 tube contenant 5ml de bouillon nutritif qui est ensemencé avec la bactérie (*Staphylococcus aureus*)
- Laisser incuber 3 à 5h à 37°C pour obtenir une pré-culture
- Prélever 1ml de bouillon de pré-culture

D- Les étapes de l'antibiogramme

* Préparation de la gélose :

- Prendre la gélose de Muller Hinton en vérifiant l'absence de l'eau à la surface s'il y en a il faut laisser sécher

-Ensemencer la gélose par 1ml de suspension et étaler le volume du centre vers les bords et laisser sécher 3à5mn.

-Déposer les disques imbibés de diverses substances (Antibiotique- Extraits méthalonique

–Infusé de l'ortie). La préparation est incubée de 16 à 18h à 35C°

*Lecture des résultats

$$X \% = \frac{\text{Diamètre d'inhibition de l'extrait végétal}}{\text{Diamètre d'inhibition de l'antibiotique}} \times 100 \%$$

FIGURE 8

4.5. Activité anti-hémolytique induite in vitro

4.5.1. Principe

L'effet anti hémolytique d'extraits d'*Urtica dioica* est évalué in vitro par l'utilisation de modèle érythrocytaire qui est facile à isoler du sang et que sa membrane présente une similitude avec d'autres membranes cellulaire (**Shobana et Vidhya, 2016**).

L'exposition des globules rouges (RBC) à certains paramètres physicochimiques telles que le milieu hypotonique, l'utilisation d'un perturbateur membranaire comme les détergents ou les espèces réactives oxygénées, les températures élevée provoque une rupture de sa membrane

cytoplasmique et par conséquent la libération de l'hémoglobine qui sera alors doser par spectrophotométrie d'absorbance visible.

4.5.2. Préparation de la suspension des érythrocytes

La suspension érythrocytaire a été préparée suivant les étapes décrites par **Hebbani et al, (2014)**

- Du sang fraîchement prélevé à l'aide d'une seringue graduée a été mis dans des tubes héparinés ensuite centrifugé à 3000T/Mn pendant 5 min pour séparer les globules rouges des autres éléments constitutifs du sang.

- Après élimination du surnageant, le culot a été récupéré et lavé 3 fois avec une solution d'eau physiologique à 0,9% à température ambiante.

- Chaque lavage consiste en une centrifugation à 3000 t/mn (5min) et une suspension du culot dans l'eau physiologique à 0,9%.

- Après la dernière centrifugation le culot est resuspendu à nouveau dans une solution constituée de tampon phosphate salé (PBS) à 0,2M, PH= 7,4. A raison d'un volume du culot et 9 volumes de PBS, permettant ainsi d'obtenir un hématocrite à 10%.

4.5.3. Induction de l'hémolyse in vitro

Pour tester l'effet anti hémolytique de notre extrait de l'ortie, des tests d'hémolyse induits sur le modèle érythrocytaire par une création d'un milieu hypotonique, la température élevée, l'éthanol et par l' H_2O_2 ont été mis aux points. Ces tests correspondent aux témoins positifs de l'hémolyse.

4.5.3.1. Test de l'hémolyse hypotonique

La solution hypotonique provoque une accumulation excessive de liquide dans la cellule (**Habibur et al, 2015**)

➤ Effet de concentration du NaCl

- 1,8 ml de NaCl à différentes concentrations (1,8% 0,9%, 0,75%, 0,5%) est ajoutés à 200µl du culot d'une suspension de GR à 10% d'hématocrite

La préparation a été mélangée, homogénéisée, incubée à température ambiante pendant 10min, ensuite centrifugée à 3000T/mn pendant 5min

La densité optique du surnageant a été mesurée à 541nm.

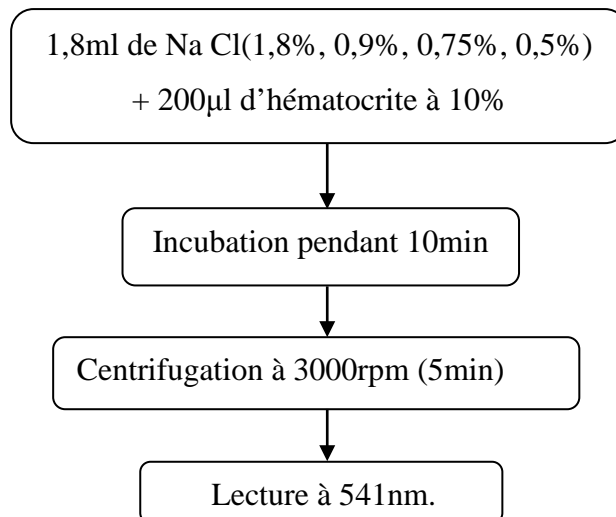


Figure 9 : Induction de l'hémolyse par Na Cl sur l'hématocrite à 10%

➤ **Effet de concentration de l'éthanol**

-1,8 ml de NaCl à différentes concentrations (0,9%, 0,75%, 0,5%) à été mélangé avec de l'éthanol à des concentrations de 2,5%, 5% et 10%

- Le mélange a été homogénéisé avec 200µl de l'hématocrite à 10% puis incubé à température ambiante pendant 10min, ensuite centrifugé à 3000 T/mn (5mn). Mesure de l'absorbance.

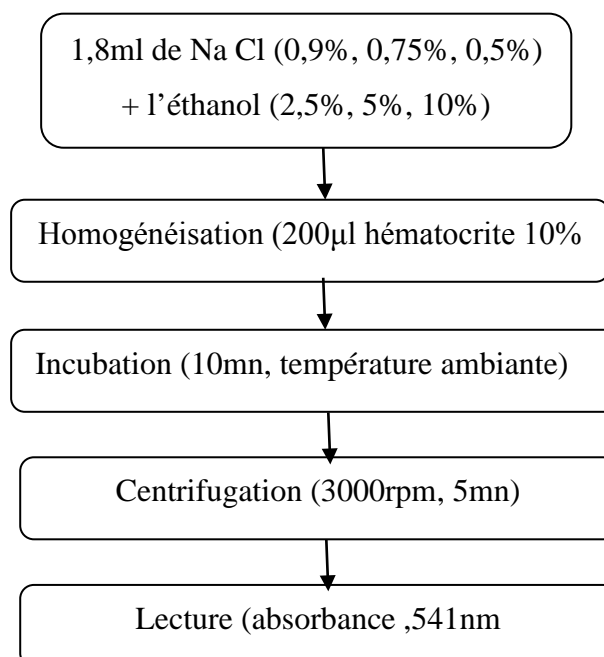


Figure 10 : Induction de l'hémolyse par l'éthanol sur l'hématocrite à 10%

4.5.3.2. Test de la thermo-hémolyse

- 500µl de la suspension érythrocytaire à 10% ont été mélangés avec 4,5ml de NaCl à 9%
- Le mélange est incubé pendant 10 et 20 mn à différentes températures (30°C, 50°C, 60°C),
- Après la centrifugation, les absorbances sont mesurées à 541nm.

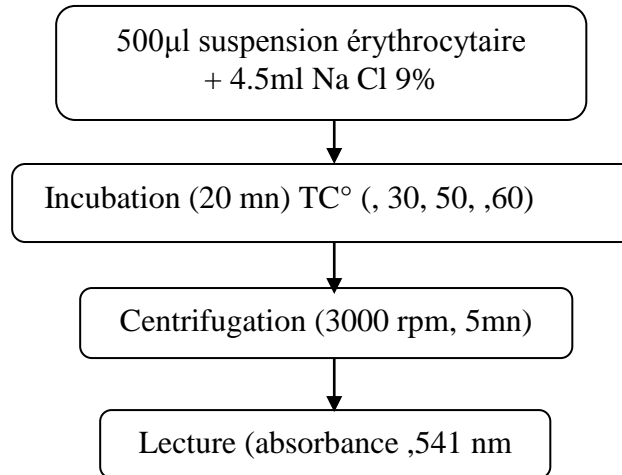


Figure 11 : Induction de l'hémolyse par la température sur l'hématocrite à 10%

4.5.3.3. Test d'hémolyse par le H₂O₂

- Selon le protocole décrit par **James et Alewo (2014)**, 2ml de suspension érythrocytaire (4%) ont été mélangés avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2M, PH=7,4) contenant du NaCl 9%
- 500µl de H₂O₂ (10V) ont été ajoutés.
- Le mélange a été incubé pendant 4 heures à 37°C
- Après centrifugation à 3000 rpm (10min), l'absorbance du surnageant a été mesurée par spectrophotométrie à 541nm.

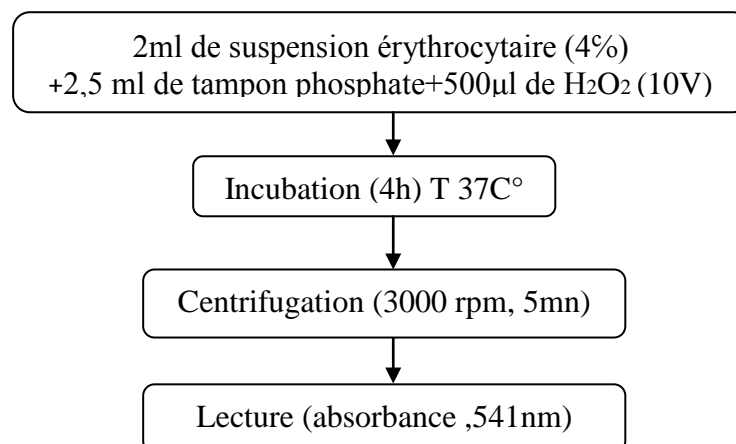


Figure 12 : Induction de l'hémolyse par H₂O₂ sur l'hématocrite à 4%

4.5.4. Evaluation de l'effet anti-hémolytique de l'extrait d'*Urtica dioica*

Cette partie d'étude consiste à traiter la suspension érythrocytaire par l'extrait d'*Urtica dioica* avant l'induction de l'hémolyse et d'évaluer l'activité anti hémolytique au spectrophotomètre. Le taux d'hémolyse de l'extrait végétal est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale, après 10 min d'incubation

Les contrôles négatif et positif ont été préparés dans les mêmes conditions expérimentales en absence de la suspension érythrocytaire pour le premier et absence de l'extrait végétale pour le deuxième

4.5.4.1. Effet sur l'hémolyse induite par le NaCl

- Un mélange de 1.8 ml de l'extrait d'*Urtica dioica* est 200 µl de suspension érythrocytaire pré-incubé pendant 1mn

- Ajoute 1,8ml de NaCl à différentes concentrations (1,8%, 0,9%, 0,75%, 0,5%) et la préparation est incubé à la température ambiante pendant 10mn

Après centrifugation, l'absorbance du surnageant a été mesurée à 541nm

4.5.4.2. Effet sur l'hémolyse induite par l'éthanol

200 µl de de suspension érythrocytaire (10%) traités par 1.8 de l'extrait végétal. Le mélange pré-incubé pendant 1min (température ambiante), ajouter le NaCl et l'éthanol à des différentes concentrations déjà citées dans la partie du témoin positif de l'hémolyse. Ce protocole opératoire s'est achevé par une centrifugation et une lecture au spectrophotomètre.

4.5.4.3. Effet sur l'hémolyse induite par la température

- 500 µl de suspension érythrocytaire traités par 4,5 ml d'extrait. Le mélange est incubé 1mn 4,5ml de NaCl à 9% sont ajoutés puis l'incubation pendant 20min à différentes températures (30C°, 50C°, 60C°) a été réalisée.

- Après centrifugation 3000T/mn pendant 5min, l'absorbance du surnageant a été mesurée à 541nm

4.5.4.4. Effet sur l'hémolyse induite par H₂O₂

Ajouter à 500µl de l'extrait 2ml de suspension érythrocytaire (4%) puis incubé 1mn à la température ambiante

- Ajouter 2,5ml de tampon phosphate et 500µl de H₂O₂ (10V)

Le protocole expérimental de l'effet anti-hémolytique de l'extrait d'*Urtica dioica* est résumé dans le schéma suivant (figure 13)

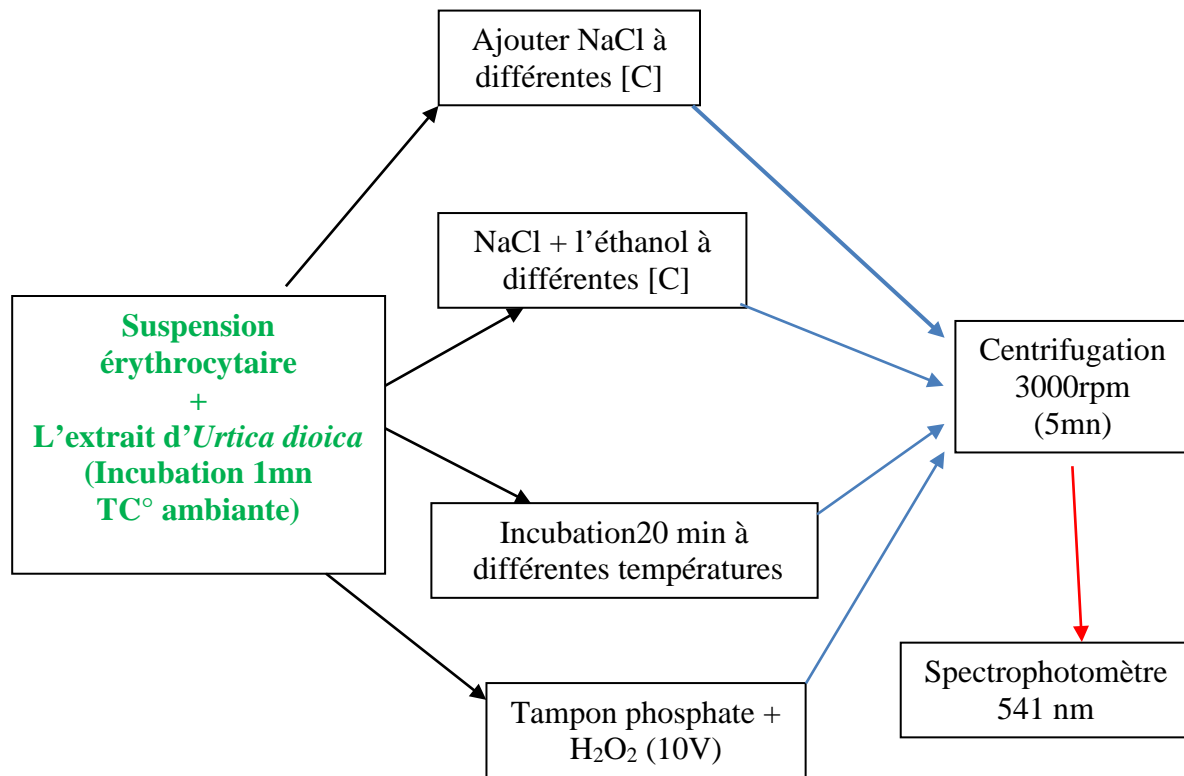


Figure 13 : Schéma de l'effet anti-hémolytique de l'extrait d'*Urtica dioica*

Résultats et Interprétations

1. Résultats et interprétations des tests photochimiques

Dans le but de mettre en évidence la composante phytochimique de l'ortie, des tests phytochimiques ont été effectués sur les extraits méthanolique et tisane par infusion de « *Urtica dioica* ». Le tableau (4) et les figure (14 et 15) regroupent l'ensemble de ces résultats

Tableau 4 : Tests phytochimiques de *Urtica dioica* L (Extrait alcoolique et infusion)

Tests	Résultats
Les polyphénols	40%
Les flavonoïdes *	+++
Les terpénoïdes	+++
Les alcaloïdes	---
Les tanins	+++
Les coumarines*	+++
Les stérols	+++
Les quinones	+++
Les saponines	-
Les composés réducteurs	+

* : infusé

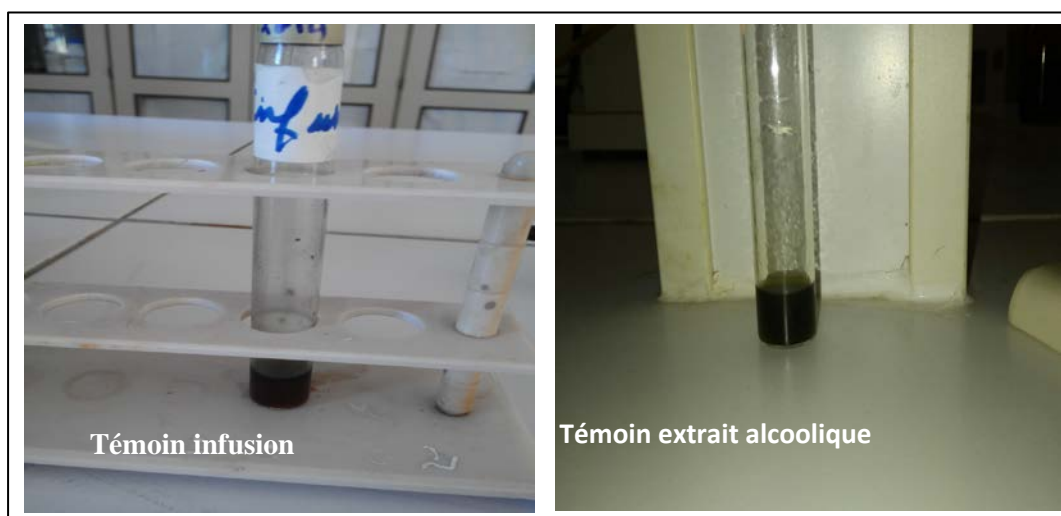


Figure 14 : les témoins des extraits

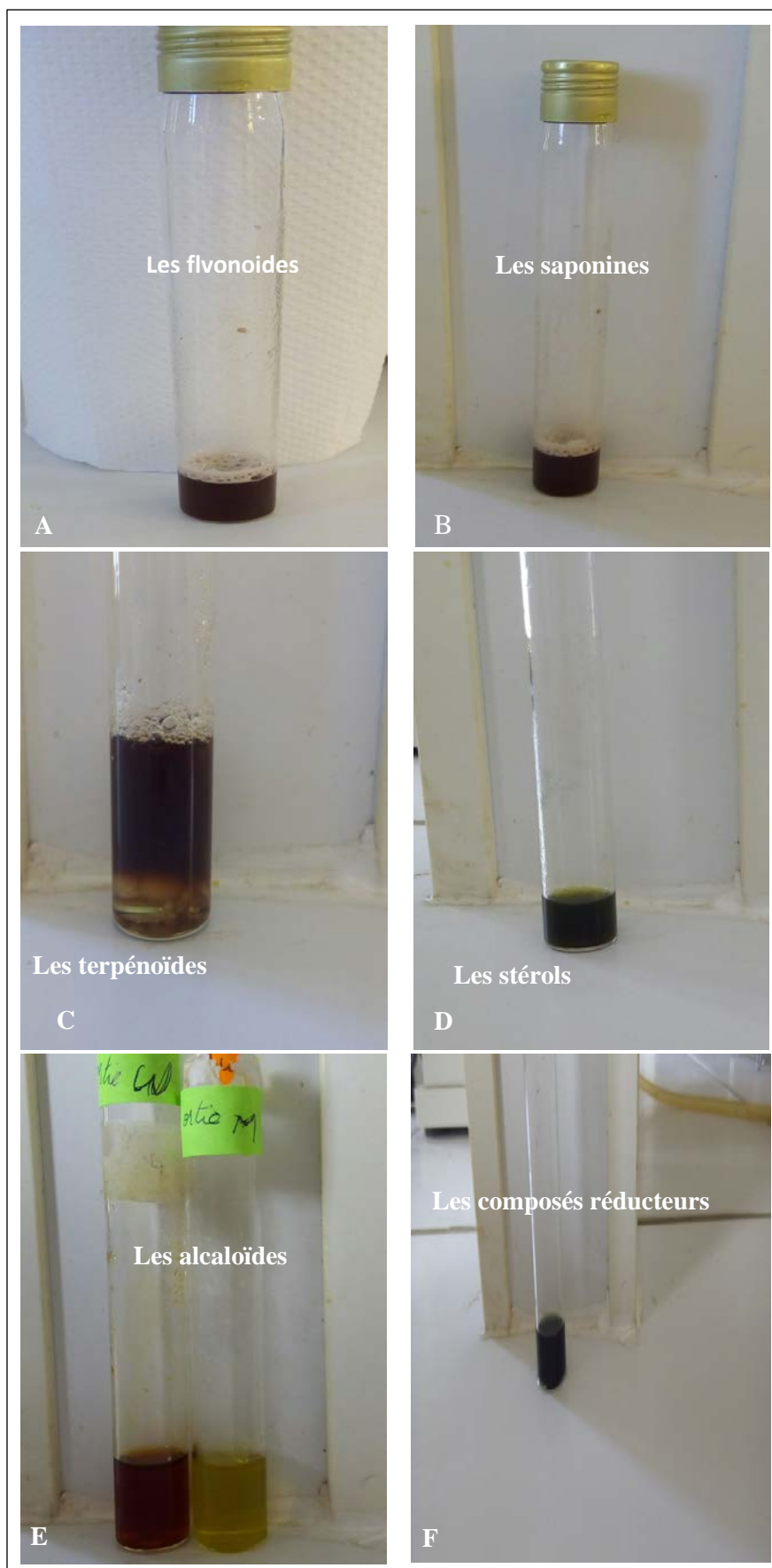


Figure 15 : Tests phytochimiques

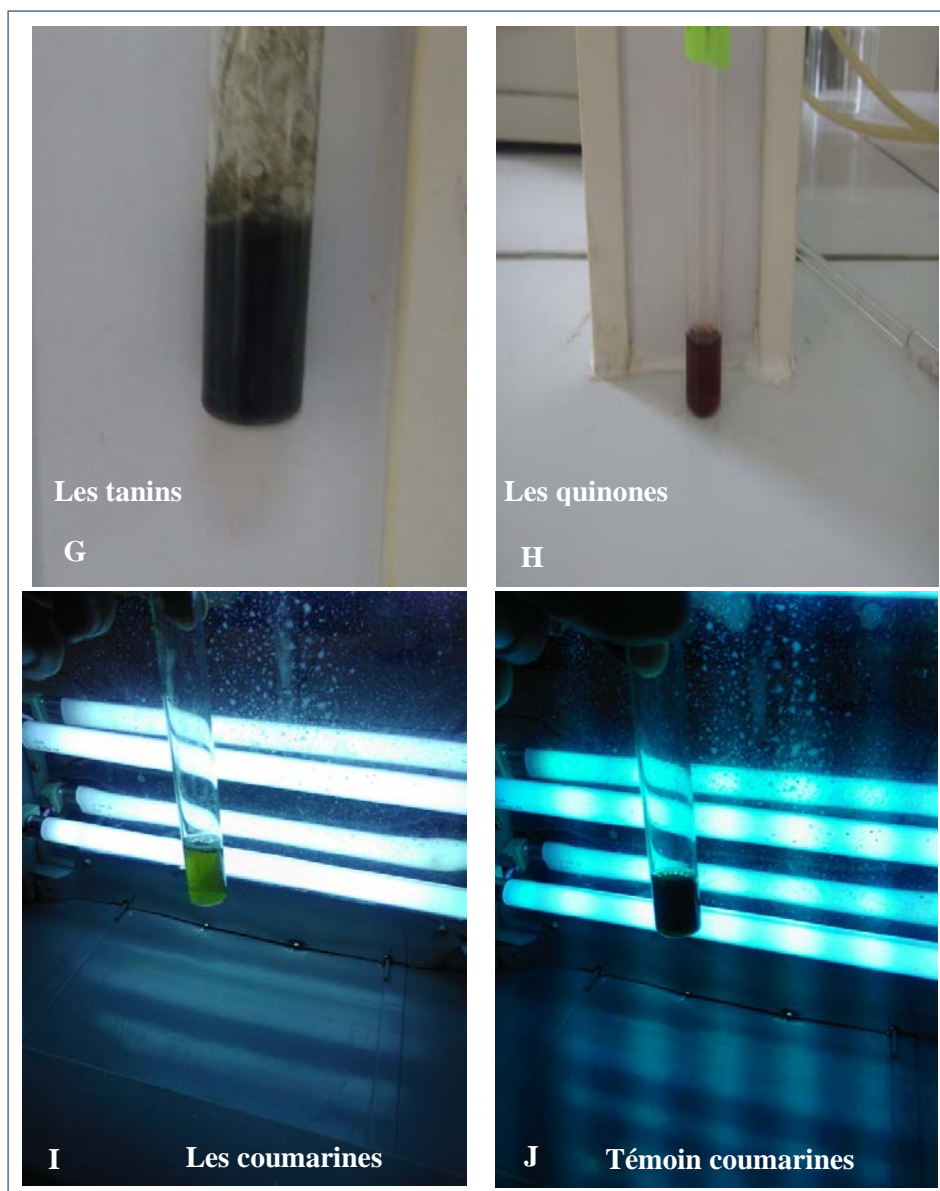


Figure 16 : suite des tests phytochimiques

1.1. Interprétation

D'après les résultats obtenus des tests phytochimiques d'*Urtica dioica*, nous remarquons que les métabolites secondaires : les flavonoïdes, les terpénoïdes, les tanins, les coumarines, les stérols et les quinones sont présents plus positivement que les composés réducteurs (tableau4) tandis-que les alcaloïdes sont absents pour les saponines ils sont considérés comme absents à cause du volume de la mousse qui est inférieur à 1 cm. (tableau 4). Ces résultats sont basés sur la révélation de l'intensité de la coloration pour chaque test vis à vis des extraits utilisés (figure 15 et 16)

2. Résultat de l'activité antibactérienne

Le test antibactérien de *Urtica dioica* a été réalisé avec l'extrait alcoolique et la solution de l'infusé sur *Staphylococcus aureus*. Les tableaux (5 et 6) récapitulent l'ensemble des résultats

Tableau 5: Test d'activité antimicrobienne de l'extrait alcoolique sur *Staphylococcus aureus*

[C] d'extrait Diamètre de Zone d'inhibition (mm)	100% (brute)	75%	50%
Disque 1	20mm	12mm	20mm
Disque 2	19mm	16mm	22mm
Disque 3	22mm	12mm	27mm
Moyenne	20mm	10mm	20mm
Témoin	34mm		
X%	60%	30%	60%

Tableau 6: Test d'activité antimicrobienne de l'infusé sur *staphylococcus aureus*

[C] d'infusé	100% (brute)	75%	50%
Diamètre de Zone d'inhibition (mm)			
Disque 1	27 mm	10 mm	26 mm
Disque 2	19 mm	10 mm	25 mm
Disque 3	10 mm	10 mm	19 mm
Moyenne	19 mm	10 mm	23 mm
Témoin	34mm		
X%	56 %	30 %	68 %

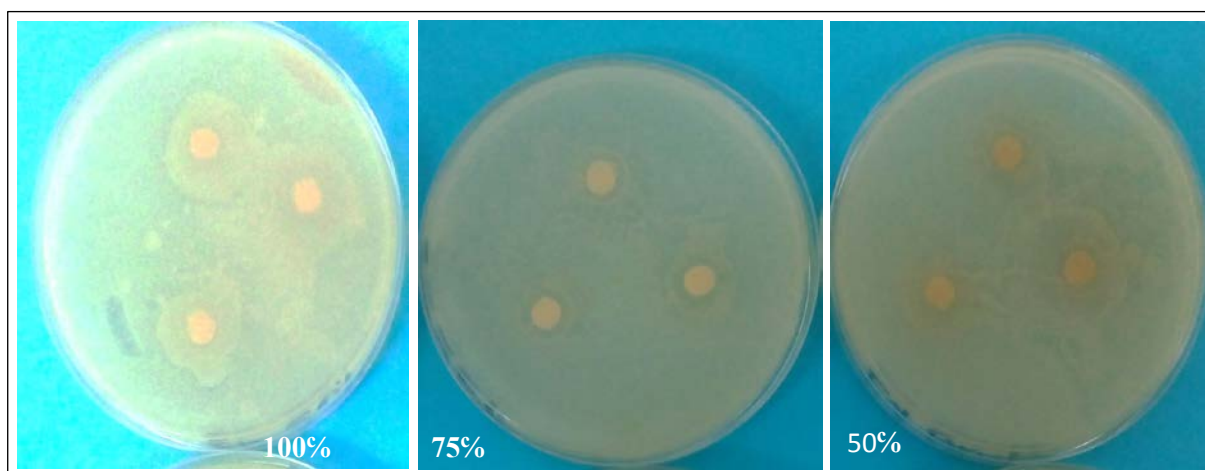
Figure 17: Effet de l'ufusé de *U. dioica* à différentes concentrations sur *Staphylococcus aureus*



Figure 18: Effet de l'extrait méthanolique de *U. dioica* à différentes concentrations sur *Staphylococcus aureus*



Figure 19: Effet de l'antibiotique ciprolon "Ciprofloxacine" (chlorhydrate) 250 mg sur la croissance de *Staphylococcus aureus*

2.1. Interprétation des résultats d'antibiogramme

L'observation de l'antibiogramme de l'extrait alcoolique montre que les extraits brute et à 50% ont donné les diamètres d'inhibition les plus élevés dont le pourcentage d'inhibition de l'activité antimicrobienne est de 60% par rapport à l'antibiotique. Pour la solution de l'infusé le pourcentage de l'activité antimicrobienne est enregistré à 50% dont le diamètre moyen est de 23 mm. Nous constatons que la dilution des extrais à un impact sur l'effet du principe actif positivement ou négativement cela est lié probablement à la nature chimique de la substance végétale et à l'interaction entre les différents principes actifs au niveau de la même plante

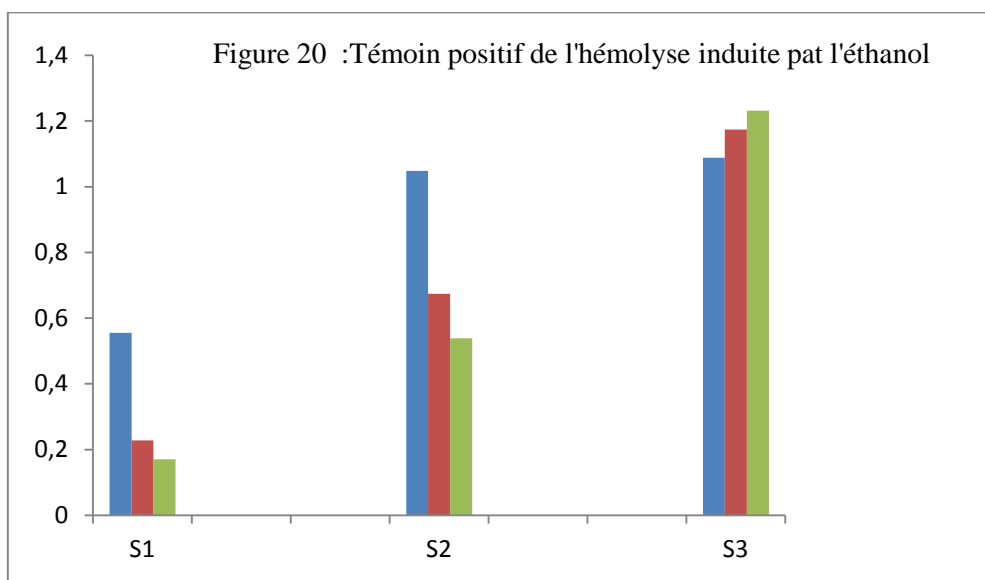
3. Résultats d'activité anti-hémolytique

3.1. Résultats du témoin positif hypotonique

A- Induction à l'éthanol : ce test était réalisé par l'utilisation de l'éthanol comme hémolysant qui provoque l'hypotension cellulaire a une température ambiante durant 10 min en fonction des différentes concentrations d'éthanol et de Na Cl. La figure (20) et le tableau 7 résument les résultats de l'hémolyse induite par l'éthanol

Tableau 7 : Les valeurs de densité optique du test positif de l'hypotonie (A)

Na Cl \ Ethanol	Ethanol		
	2,5	5	10
0,9	0,555	0,228	0,170
0,75	1,048	0,674	0,539
0,5	1,088	1,174	1,2 31



Interprétation

La figure (20) et le tableau (7) illustrent l'évaluation de l'activité hémolytique à différentes concentrations de Na Cl de 0,9 % 0,75 % 0,5% en présence de l'éthanol à des concentrations qui varient de 2,5 %, 5%, 10% .

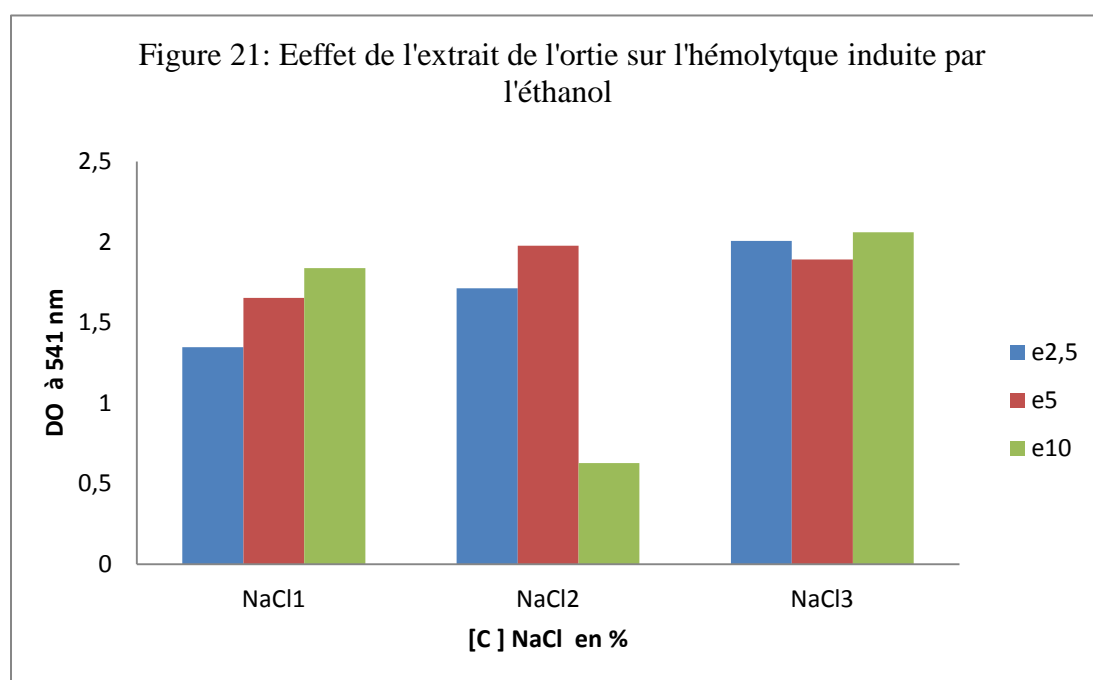
Nous remarquons que pour la majorité des résultats, quel que soit la concentration du Na Cl, les variations des valeurs de la DO et en relation avec les concentrations de l'éthanol au niveau du mélange hypotonique. Ce qui signifie que l'éthanol conditionne l'effet hémolytique induit hypotoniquement. La valeur maximale mesurée par la densité optique de l'hémolyse est observée pour le mélange de Na Cl à 0.5% et de l'éthanol à 10 % (Tableau 7) ce qui correspond à une hémolyse minimale tandis que la valeur minimale mesurée de la DO est enregistrée pour le mélange Na Cl, éthanol de 0.9% et 10% respectivement ce qui correspond à une hémolyse maximale

A-1. Test anti-hémolytique de l'extrait méthalonique de l'ortie

L'extrait méthalonique d'*U. dioica* a été utilisé dans le but d'évaluer l'activité anti-hémolytique induite par l'éthanol. Les résultats de la densité optique sont regroupés dans le tableau (8) et la figure 21

Tableau 8 : Les valeurs de densité optique du test antihémolyse de l'extrait méthalonique (induction de l'hypotonie (A))

Ethanol % \ Na Cl %	2.5	5	10
0.9	1.348	1.654	1.837
0.75	1.712	1.976	0.628
0.5	2.006	1.891	2.061



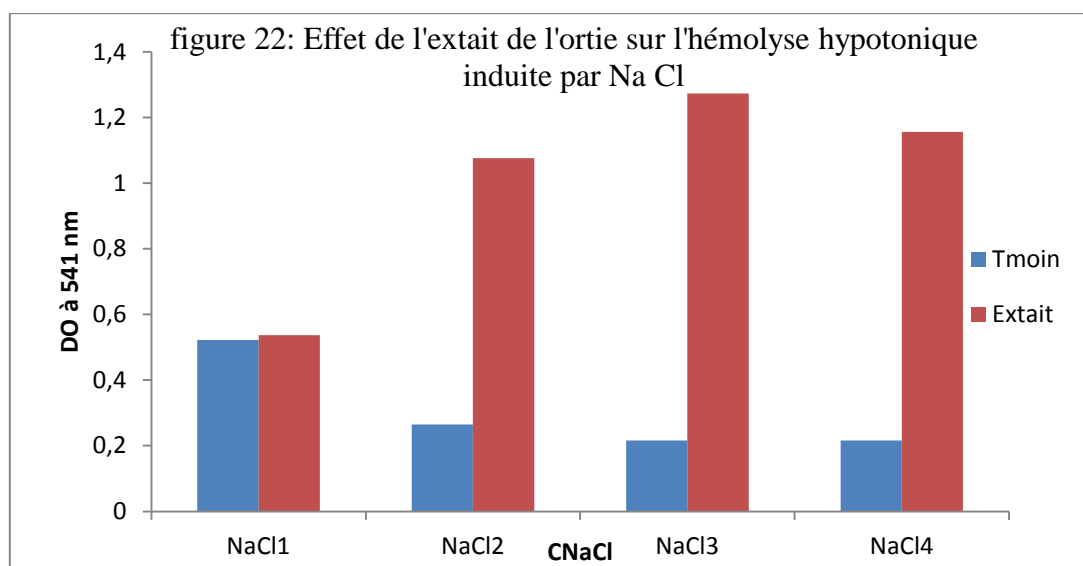
Interprétation

D'après les résultats (Tableau 8) (figure 21) nous remarquons que l'extrait a diminué le phénomène de l'hémolyse. Il existe une variation de la DO en fonction des différentes concentrations du mélange de la solution Na Cl-Ethanol. Nous remarquons que quel que soit le mélange des concentrations (Na Cl, Ethanol) les valeurs de la densité optique sont supérieures aux valeurs du test positif de l'hémolyse. La valeur minimale de la DO est enregistrée pour la solution, Ethanol (10%) et Na Cl (0,75%) et la valeur maximale de la DO est enregistrée pour la solution, Ethanol (10%) et Na Cl (0,5%). En comparant ces résultats aux valeurs de la densité optique enregistrées pour le témoin positif, Nous constatons que l'extrait de l'ortie a effet anti-hémolytique

B- induction au Na Cl : Ce test a été réalisé par l'utilisation de Na Cl comme hémolysant avec des différentes concentrations en absence et présence de l'extrait. Le tableau (9) et la figure (22) présentent l'ensemble des résultats

Tableau 9 : Les valeurs de densité optique du test antihémolyse de l'extrait méthalonique (induction de l'hypotonie Na Cl (B))

Concentration de Na Cl	Témoin	extrait
1,8	0,522	0,537
0,9	0,265	1,076
0,75	0,216	1,273
0,5	0,216	1,156



Interprétation

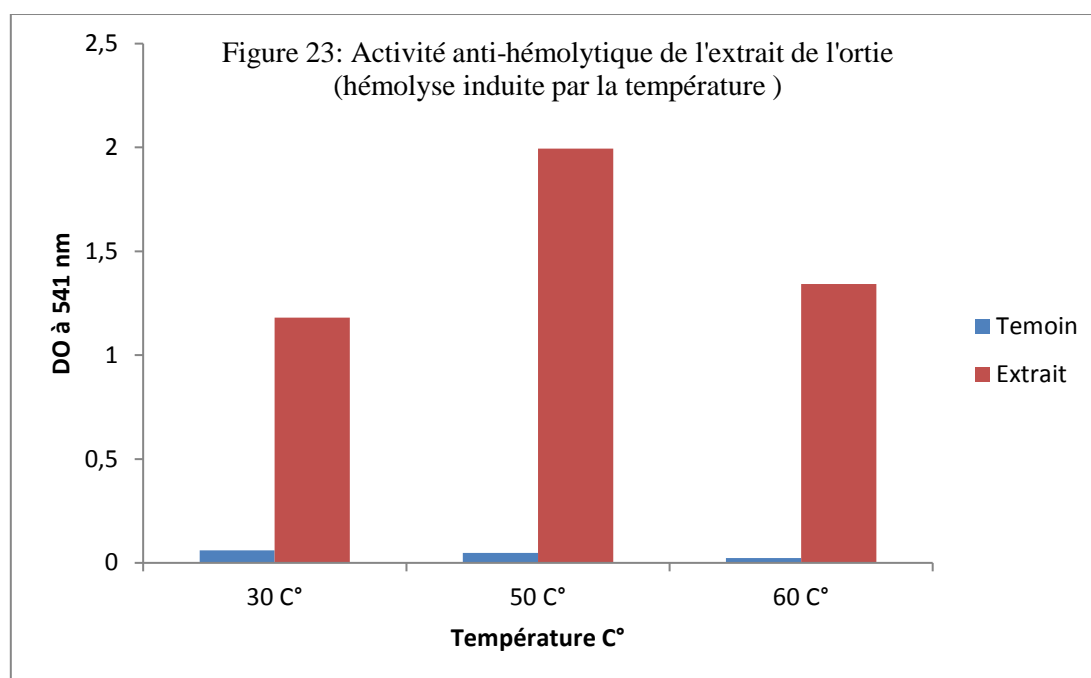
La figure 22 présente l'évaluation du pouvoir anti hémolytique de l'extrait d'ortie (*Urtica dioica*) à différentes concentration de Na Cl .Nous remarquons que l'extrait a révélé une activité anti hémolytique remarquable contre l'hémolyse induite par le Na Cl. L'activité anti-hémolytique est maximale à une concentration de Na Cl de 0.75% (DO=1.273) contre le témoin positif (DO= 0.216))

3.2. Résultat du Test anti-hémolytique de l'extrait méthalonique de l'ortie en présence de thermo-hémolyse

Dans ce test l'effet hémolysant est induit par exposition de l'échantillon érythrocytaire contenant l'extrait végétal a des différentes températures (30C°, 50C°, 60C°).Un témoin sans extrait est préparé. Les résultats sont regroupés dans le tableau (10) et la figure (23)

Tableau 10 : Les valeurs de la DO du test thermo-hémolyse en présence et en absence de l'extrait d'ortie

Température C°	Témoin	Extrait
30C°	0,061	1,180
50C°	0,048	1,994
60C°	0,023	1,342



Interprétation

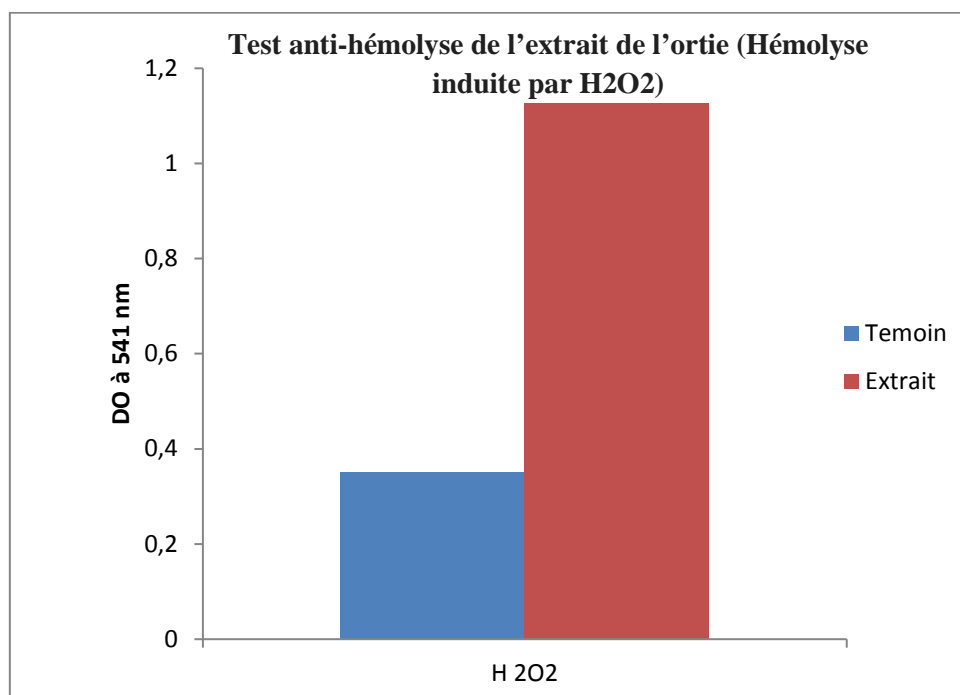
La thermo-hémolyse est autant plus élevée que la température augmente (de 30C°, 50C°, 60C°). En présence de l'extrait végétal l'hémolyse a diminué. En effet les valeurs de l'absorbance enregistrées en présence de l'extrait sont largement élevées (DO max à 50C°) par rapport au témoin positif induit par la température. Cela révèle un effet protecteur de l'extrait contre la thermo-hémolyse.

3.3. Résultat du Test anti-hémolytique de l'extrait méthalonique de l'ortie hémolyse induite par le H₂O₂

Dans ce test, nous avons provoqué l'hémolyse par le H₂O₂. Cette étape a été réalisé sur la suspension érythrocytaire en présence et en absence d'extrait d'ortie.

Tableau 11 : Les valeurs de la DO du test d'hémolyse induit par le H₂O₂ en présence et en absence de l'extrait d'ortie

Suspension	DO
Témoin	0,350
Extrait	1,026



Interprétation

Le H₂O₂ est un hémolysant très fort par rapport aux autres paramètres utilisés .D'après ces résultats nous remarquons que l'extrait végétale a montré une activité anti hémolytique franchement significative avec une DO très élevée (anti-hémolyse proche de 100%) par rapport au témoin.

Conclusion générale

D'après l'enquête ethnopharmacologie effectuée par plusieurs chercheurs sur les plantes médicinales, *Urtica dioica* reste parmi les moins utilisées dans la médecine alternative Algérienne. Pour cela l'objectif assigné à cette étude est de valoriser cette espèce en évaluant sa composante phytochimique et son intérêt dans plusieurs vertus thérapeutiques

✚ Dans un premier volet de ce travail, nous avons procédé à l'extraction des molécules bioactives par la méthode d'extraction méthanolique et par infusion ainsi que la révélation du criblage phytochimique de l'ortie récolté de la région de Mostaganem

✚ Dans un deuxième volet, nous avons mis en évidence et évalué quelques propriétés biologiques de ces extraits *in vivo*.

✚ L'analyse du criblage phytochimique a mis en évidence une richesse en molécules bioactives notamment les flavonoïdes, les terpénoïdes, les tanins, les coumarines, les stérols et les quinones ainsi que les polyphénols

✚ Les résultats relatifs à l'évaluation du pouvoir antibactérien des deux types extraits sur la souche testée de *Staphylococcus aureus* par la méthode, de diffusion en milieu solide sont révélés positifs

✚ Le traitement de l'hémolyse induite par la réaction hypotonique (NaCl.), H₂O₂ et la température en appliquant les extraits de *Urtica dioica* a donné des résultats positifs cela confirme le pouvoir anti-hémolytique de cette espèce végétale

Cette étude avait pour but de valoriser l'ortie, et donner des résultats satisfaisants pour pouvoir l'utiliser à des coûts réduits par des méthodes simples (décoction, infusion, macération,....etc.).

En perspective, il serait fort intéressant d'approfondir les études *in vitro* par une expérience *In vivo* et de s'en assurer de l'innocuité totale chez un modèle animal de choix, à même capable de vérifier les autres propriétés biologiques des autres types d'extraits à savoir la macération et les extraits par les solvants organiques.

Il serait, également, très instructif d'explorer la composition chimique de l'extrait et de tester l'effet isolé et synergique des différents constituants des différents extraits de cette espèce végétale

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Afif -Chaouche T.(2015)-Etude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de quelques plantes médicinales de la région deTiziOuzou–Algérie.Thèse de Doctorat 189p Tlemcen

Apgil. (2003)-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

Aydos OS., Acivi A., Ozcan T., Karadag A., Gurleyik E., Altinok B., Sunguruglu A.(2011)- Antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of wheatgrass (*Triticumaestivum* L.) extract on CML (K562) cell line. *Turkish journal of Medical Science.* 41(4):657-663

Azele F.(1999)-Bacteriologie medicale à l'usage d'étudiants en médecine ,Ed CetR 14eme ed, Paris : 116 p.

Baba Aissa F.(1991)-Les plantes médicinales en Algerie.EdBouchien et AD. DiwanAlger.71:119-173 p.

Beloued A. (2001)-Plantesmedicinalesd'Algerie. *Office des publications universitaires. Alger* : 124 p.

Benedicte P. (2007)-Recherche bioguide de molecules antipaludiques d'une plante guyamaise Piper hostmannianum .Université Paul Sabatier, Toulouse. Spécialité : chimie biologie santé :22 p.

Bertrand B., Jeanne A. (2008) - “Les secrets de l'Ortie”,10 eme Ed. duTerran : 45-95 p.

Bertrand B. (2010) -Les secrets de l'Ortie.- 7ème édition. Editions de Terran (Collection Le Compagnon Végétal; N : 01) : 12 p.

Berube-Gagnon J. (2006) -Isolation et identification de composés antibiotique des écorces de *Picea Mariana*, mémoire de l'université de Québec

Bombardelli E., Morazzani P. (1997)-*Urtica dioica*L.*Fitoterapia*, 1997, 68,(5) :387-402 p.

Bouayed Debbagh L. (2016)- Contribution à l'étude de l'effet antibactérien et antioxydant de l'extrait aqueuxd'*Urtica dioica* (l'Ortie). Thèse En Technologie des industries Agro- Alimentaire .Algérie

Boudjouref M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris*L. P-51.

Bourgaud F. (2010). Plantes à parfum, aromatiques et médicinales. *Phytomedicine* 17: 548-550

Boyrief . (2014), Les plantes médicinales. Ed Sylvie Désormière : 48 p.

Brisse H., Grandjouan G., Hoff M., De Ruffray P et Garbolino E. (2003) « Répartition de *Urtica Dioica* ». *Sophy-banque de données phytosociologiques* : 122-131p.

Bruneton J. (1999)-Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales. Technique et documentation. Lavoisier 3ème édition 17(5): 54-61 p.

Caleno C.J .L., Ospina, C.C., Arango, M.W., Arteaga M.JJ., et Perea M.E. (2016). Application of essential oils from two species of the *Rutaceae* family as cellular oxidation controller agent and trypanocidal capacity. *Asian J Pharm Clin Res*, 9 (2): 213-21

Caliskani Z. (2004)- In Delahaye J : Utilisation de l'ortie *Urtica dioica* L. Thèse de Doctorat en pharmacie 227 p. France

Carillon A. (2000)-Enseignement de physiologie intégrative et de phytothérapie clinique. Société Internationale de Médecine Endobiogénique et de Physiologie Intégrative

Cazau-Beyret N. (2013)-Prise en charges des douleurs articulaires par aromathérapie et phytothérapie:195 p.

Chahardehi A.M., Ibranim D., Sulaimani S.F.& Mousavi L. (2012)- Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Int J Trop Biol*, 60 (4): 1567-1576

Dahmani F, Saoud B, Jafaar K, Woumki A. (2016)- Etude de l'hémogramme dans la drépanocytose homozygote à propos de 87 patients. *Pan African Medical Journal*, 25: 240 p. doi:10.11604

Decaux I. (2002) - Phytothérapie: mode d'emploi. Ed Le Bien Public : 6-7 p.

Dejan O. (2014)- in Afif -Chaouche T (2015)-Etude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de quelques plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou- Algérie. Thèse de Doctorat 189 p. Tlemcen

Farombi D. (2003)- African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agent. *African journal of biotechnology*. 2 (12) : 662 – 671 p.

Fletcher N. (2007) Guide nature, reconnaître la nature comestible et savoureuse sans peine, Edition Nathan : 26-27 p.

- Fleurentin J.,(2008)**-Plantes médicinales tradition et thérapeutique, éditions Ouest-France,FranceB.U.Santé Nantes : 104-105 p.
- Fouché JG, Marquet A, Hambuckers. (2000)** - Les plantes au médicament observation du monde des plantes .Sart-Tiliman.
- Francine D. (2005)** - L'ORTIE DIOIQUE (*Urtica dioica* L.) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE. Th7se de doctorat d'état en Pharmacie. UNIVERSITE HENRI POINCARÉ NANCY 1. 90 p
- Guedira K, Goetz P, Le June R. (2009)**- *Urtica dioica* L : *phytothérapie*. Spinger.DOI 10. 1007/s 10298-009- 04 08-5
- Gulcin, I, U'guz, M.T., Oktay M., Beydemir S., Kufrevio'glu O.'I. (2003)** .- Antioxidant and antimicrobial activities of *Teucriumpolium* L. Journal of Food Technology 1, 9–17.
- Gwalter RH. (1992)**- Examens de Laboratoire. Dans : Pratique de la Clinique Canine. Editée par : Niemand. H. G et Suter. P. F. Edition Vigot, France : 45-56 p.
- Hahn M W, Lansdrof H, Wu Q, Schauer M, Holfe MG, Boenigle J et Stadler P.(2003)**-Isolation of novel ultramicrobacteria classified as actinobacteria from five fresh water habitats in Europe and Asia;Appl Environ-Microbiol,69(3):p 1442-1451
- Habibur Rahman, M., Eswaraiah, C.et Dutta, A.M. (2015).** In - vitro anti-inflammatory and anti-arthritis activity of *Oryza sativa*. Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam), *American-Eurasian J. Agric. & Environ*, 15 (1): 115-121.
- Harvey J W, Asquith R L, Mcnuty P K, Kivipelto J, and Bauer J E.(1984)**-Hematology of the Foals Up to One Year old *Equine, Vet. J*, 16: 347-353,
- Hebbani, AV, Reddy D V, Nallanchakra varthula V. (2014)**-In vitro anti-hemolytic activity of *Terminaliaarjuna*(Roxb.) Wt. &Arn. Bark Powder Aqueous Extract *IndianJournal of Advances in Chemical Science* 3: 102-108 p.
- James O etAlewo I M. (2014).** In vitro anti-hemolytic activity of *Gymnema Sylvester* extracts against hydrogen Peroxide (H₂O₂) induced hémolysis in Human erythrocytes, 2 (7):1-9p.
- Karumi Y, Onyeyili P A, Ogugbuaja V O, (2004)**- Identification des principes actifs de l'extrait de feuilles de *M. balsamia* (baume du pomme).Journal of medecine and scientific.4(3) :179-182 p.Nigeria. ISSN 1682-4474.

Khan A.M., Qureshi R.A., Ullah F., Gilani S.A., Nosheen A., Sahreen S., Laghary M.K., Laghari M.Y., Ruhman S.U., Hussain I., Murad W. (2011)- Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 (25): 6017-6023.

Kose, K et Dogan,P. (1995)-Lipoperoxidation induced by hydrogen peroxide in human erythrocyte membrane. Protective effect of Ginkgo Bio labo Extract (EGB761). *The Journal of International Medical Research*, 23: 1-8.

Krystofova O., Adam V., Babula P., Zehnalek J., Beklova M., Havel L. (2010)- Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *International Journal of Environmental Health Research*.7: 3804-15.

Majester-Savornin, B et al. (1991)- Saponines of the plant. *Hedera helix* and their leishmanicidal activity. *Planta Med.* p 260-262.

Marino M., Berrami C., Comi R. (2011)- Impedance measurement to study the antimicrobial activity of essential oils from *Luminaeae* and *Compositae*. *Int J Food Microbiol*, 67: 187-195

Martinez A. (2007)- H2-Erythrocytes_MB7 : Hématologie H2_ Faculté de médecine Montelieu_Nîmes.

Mohammedi Z. (2013) - Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. Thèse de doctorat en Biologie. Tlemcen :170 p.

Moutsie, (2008)-L'ortie, une amie qui vous veut du bien , l'encyclopédie d'utovie, Edition d'utovie

Nicolas M., Daniel C. (1998). Activités technologiques en microbiologie I –Techniques de base et méthodologie. *Editeurs CRDP D'Aquitaine-Bordeaux*, 152 pages.

Nogaret-Ehrhart A.S. (2003)-La phytothérapie Se soigner par les plantes., Edition Eyrolles :19-36 p

Oloyede O I. (2005)-Chemical Profile of unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition* ; 4 (6):379-381p.

Potel A M.(2002)- Les plantes médicinales au Sénégal (commune de Nguékokh, zone de la Petite Côte) Extraits du rapport du stage, sciences naturelles, effectué à Nguékokh : 22 p.

Raymonds R. (1979)-Travaux pratiques de microbiologie 2eme ed : 100-101 p.

Rombi M, Dominique R. (2006)- 120 plantes médicinales : composition mode d'action et intérêt thérapeutique de l'Ail à la vigne rouge. Alpen. Ed, France

Schaffner W. (1992)- Les plantes médicinales et leurs propriétés. Manuel d'herboristerie Delachaux et Niestlé : 215p.

Shaw N. (2007)- Phytothérapie. Édition Véga, coll. Guide illustré du bien-être, N.Y :129-134 p.

Shobana Set Vidhya R. (2016)- Evaluation of *in vitro* hemolytic activity of different parts of abutilon indicum (Linn.). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(5):1182–1196 p.

Schoeneberger - (2006). Guide des plantes médicinales, de lacaux et niestlé. S.A .neuchatel (suisse) :317-318 p.

Tapiero H, Tew K D, Nguyen BG, and Mathé G. (2002)- Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies? *Biomed. pharmacother.* **56**: 200-207 p.(cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

Trease E, Evans WC, (1987)- Pharmacognosy. Billiaire Tindali. London 13th edition. :61 -62p.

Vincent C, Panneton B, Fleurat- Lessard F.(2000)- La lute physique en phyto protection: 356 p.

Yener Z, Celik I, lhan F, Bal R.(2008)- Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *Food and Chemical Toxicology* **47**: 418–424 p.