

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés

Mémoire de fin de cycle

**En vue de l'obtention du diplôme de Master
en génie des procédés**

Option : Science et technologie du médicament

Thème

**Evaluation de l'activité antioxydante des
extraits des plantes : *Urtica dioica*, *Urtica
pilulifera* et *Globularia alypum L.***

Réalisé par :

◆ *FEDALA GHANIA*

Encadré par :

◆ *Mr. K. BELHAMEL*

Examiné par :

➤ *M^{me}. H. BELKACEMI*

➤ *M^{me} HATTOU*

Promotion 2014-2015



REMERCIEMENT

Au terme de ce travail, je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

J'exprime mes vifs remerciements en particulier à mon promoteurs Pr. K. BELHAMEL qui a accepté de m'encadrer et pour son orientation et soutien et M^{lle} R. TOUATI pour le temps qu'elle m'a accordé et pour m'avoir suivis dans ma démarche, pour m'avoir transmis les renseignements nécessaires à la réalisation de ce projet.

Mes sincères considérations et remerciement sont également exprimés aux membres de jury: madame H. Belkacemi, qui nous a fait l'honneur par sa présence en qualité de présidente de jury. Madame Hattou pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie profondément tous les enseignants du département de génie des procédés qui nous ont donné de leurs savoir et nous ont soutenu tout au long de notre cursus.

Je tiens également à remercier toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.





Dédicaces

Je remercie en premier lieu le bon Dieu qui m'a fait venir dans ce monde.

Je dédie ce mémoire à tous ceux qui me sont chers et pour tout l'amour qu'ils me portent :

Ma plus profonde gratitude et tout mon amour je les adresse à mes chers parents, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances.

Merci beaucoup pour votre amour et votre patience. Que Dieu le tout puissant vous garde pour moi.

A mes très chers frères pour avoir cru en moi et pour leur soutien. A ma sœur.

A toute ma famille, à mes oncles et à leurs femmes, à mes tantes paternelles et maternelles, mes cousins et mes cousines.

A mes très chères amies de A à Z. Je leurs souhaite à toutes bonne continuation et beaucoup de réussite. A tous ceux et à celles qui m'ont aidé d'une façon ou d'une autre dans la réalisation de ce travail.

GHANIA



Liste des figures :

Figure 1 : voies de biosynthèse des composés phénoliques	5
Figure 2 : Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques.....	6
Figure 3: Quelques exemples des acides hydroxycinnamiques	7
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.....	8
Figure 5: Des exemples des structures chimiques des flavonols.....	8
Figure 6 : Des exemples des structures chimiques des flavones	9
Figure 7 : Des exemples des structures chimiques des flavanones	10
Figure 8 : Deux exemples des structures chimiques des flavanols	10
Figure 9: Deux exemples des structures chimiques des isoflavones	11
Figure 10: Deux exemples des structures chimiques des anthocyanes.....	11
Figure 11 : Quelques exemples des structures chimiques des coumarines.....	12
Figure 12: Exemple des tanins hydrolysables.....	13
Figure 13: Exemple des tanins condensés	14
Figure 14 : Formes mésomères du phénol	14
Figure 15 : Les Antioxydants Synthétiques	19
Figure 16: photos d'Urtica dioica.....	21
Figure 17: photos d'Urtica pilulifera	22
Figure 18 : Globularia alypum L	23
Figure.19 : L'appareil de Soxhlet	25
Figure 20 : Structure chimique du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)	29
Figure 21: Teneur en phénols totaux dans les différents extraits des feuilles des Urtica dioica, Urtica pilulifera, Globularia alypum L.....	32
Figure 22: Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des feuilles des Urtica dioica, Urtica pilulifera, Globularia alypum L.....	33
Figure 23 : Teneur en flavonols dans les différents extraits des feuilles des Urtica dioica, Urtica pilulifera, Globularia alypum L.....	35

Figure 24 : Réduction du radical DPPH par un antioxydant	36
Figure 25 : Activité anti-radicalaire des extraits des feuilles des <i>Urtica dioica</i> , <i>Urtica pilulifera</i> , <i>Globularia alypum</i> L	36
Figure 26 : Activité scavenging du radical ABTS ⁺ des extraits des feuilles des <i>Urtica dioica</i> , <i>Urtica pilulifera</i> , <i>Globularia alypum</i> L.....	37
Figure 27 : Activité antioxydante utilisant le phosphomolybdate des extraits des feuilles des <i>Urtica dioica</i> , <i>Urtica pilulifera</i> , <i>Globularia alypum</i> L.....	38

Liste des abréviations :

Abs : Absorbance.

BHA :butylhydroxyanisole .

BHT : butylhydroxytoluene .

PG:gallate propylée.

NADH :déshydrogénase.

TBHQ : tetrabutylhydroquinone.

DPPH : 2,2-DiPhényl-1-Picryl-Hydrazyl.

EAA : Equivalent d'acide ascorbique.

EAG : Equivalent d'acide Gallique.

EQ : Equivalent de la quercétine.

ERO : Espèce réactive d'oxygène.

ET : Equivalent de trolox

Liste lexicque :

Lead compounds : substances naturelles.

Biotique : biologique (vivant).

Abiotique : physique.

Stress biotique : c'est une maladie engendrée par les espèces nuisibles (les germes et les microorganismes).

Stress abiotique : c'est une maladie comme la sécheresse liée à l'état de dégradation physique de l'organisme.

Sommaire.

Introduction	1
--------------------	---

Synthèse bibliographique.

Chapitre I : Les composés phénoliques :

I. Définitions.....	3
I.1. Les métabolites primaires	3
I.2. Les métabolites secondaires.....	3
II. Les composés phénoliques	3
II.1. Généralités	3
II.2. Biosynthèse des composés phénoliques	3
II.2.1. La voie de Shikimate	4
II.2.2. La voie de l'acétate	4
II.3. Classification des composés phénoliques.....	6
II.3.1. Les acides phénoliques	6
II.3.1.1. Acides hydroxybenzoïques C6-C1	6
II.3.1.2. Acides hydroxycinnamiques C6-C3	7
II.3.2. Les flavonoïdes.....	7
II.3.2.1. Flavonols	8
II.3.2.2. Les flavones	9
II.3.2.3. Les flavanones	9
II.3.2.4. Les flavanols.....	10
II.3.2.5. Les isoflavones	10
II.3.2.6. Anthocyanes	11
II.3.3. Les coumarines	11
II.3.4. Tanins	12

II.3.4.1. Tanins hydrolysables	13
II.3.3.2. Tanins condensés	13
II.4. Propriétés chimiques des polyphénols	14

Chapitre II : Activité antioxydante et stress oxydatif.

I. Stress oxydatif.....	15
I.1. Origine du stress	15
II. Radicaux libres	15
II.1. Les espèces réactives de l'oxygène	16
II.1.1. Radical superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)	16
II.1.2. Peroxyde d'hydrogène H_2O_2	16
II.1.3. Radical hydroxyl.....	16
II.1.4.D'autres espèces réactives de l'oxygène	17
III. Antioxydants	17
III.1.Définition	17
III.2. Classification des antioxydants	17
III.2.1. Selon leur action.....	18
III.2.2.Selon leur source	18
III.3. Mécanisme d'action	19
III.4. Utilisation des antioxydants	20

Partie expérimentale.

Chapitre I : Matériels et méthodes.

I.1. Matériel végétal	21
I.1.1.Urtica dioica.....	21
I.1.2. Urtica pilulifera.....	22
I.1.3. Globularia alypum L.....	23

I.2.Récolte	24
I.3. Séchage, Broyage et tamisage.....	24
I.4. Méthode d'extraction par Soxhlet.....	24
I.5. Spectrophotométrie UV-visible	26
I.6. Dosage des Composés phénoliques	27
I.6.1.Dosage des phénols totaux.....	27
I.6.2.Dosage des flavonoïdes.....	28
I.6.3. Dosage des flavonols	28
I.7.Activité anti-oxydante des extraits phénoliques	28
I.7.1.Activité anti-radicalaire	28
I.7.2.Activité scavenger du radical ABTS ⁺	29
I.7.3. Méthode utilisant le phosphomolybdate	29
Chapitre II : Résultats et discussions.	
II.1. Dosages des composés phénoliques	31
II.1.1.Dosage des phénols totaux	31
II.1.2.Dosage des Flavonoïdes	33
II.1.3.Dosage des flavonols	34
II.2.Activité anti-oxydante des extraits phénoliques	35
III.2.1.Activité anti-radicalaire.....	35
II.2.2.Activité scavenger du radical ABTS ⁺	37
II.2.3.Méthode utilisant le phosphomolybdate.....	38
Conclusion.....	39
Références bibliographiques	39

Annexe 50

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites [1]. Dans ce but, l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances ou de nouveaux "lead compounds", si l'on considère que chacune de ces plantes peut contenir des centaines, voire des milliers de métabolites secondaires [2]. Ces derniers sont par la suite accumulés dans différents organes et parfois dans des cellules spécifiques de la plante.

Actuellement, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques et la toxicité des antioxydants synthétiques ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires, en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. De nombreuses études ont mis en évidence la présence de métabolites secondaires doués d'activités biologiques, telles que les polyphénols, alcaloïdes, terpènes ...etc [3].

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plus riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies.

Malgré la nature hétérogène d'une biodiversité immense du continent africain en général et de l'Algérie en particulier, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier les plantes *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, *Globularia alypum L*, parmi les plantes médicinales qui sont le moins fréquemment employés dans notre pays, à cause de l'ignorance de leurs valeurs nutritionnelles et médicales.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance de ces plantes médicinales de la région de Tazmalt wilaya de Bejaia et de découvrir certains constituants chimiques, les composés phénoliques totaux et les flavonoïdes, ainsi que l'étude de l'activité antioxydante de leurs extraits. Ce travail comporte deux parties:

-La première partie consiste en une étude théorique sur les composés phénoliques et les Antioxydants :

- Le premier chapitre intitulé les composés phénoliques.

- Le deuxième chapitre intitulé Les antioxydants.
- La deuxième partie c'est la partie pratique du mémoire: elle comporte deux chapitres :
- Le troisième chapitre contient les méthodes expérimentales.
 - Le quatrième chapitre contient les résultats de notre travail.

I. Définitions :

I.1. Les métabolites primaires :

Un métabolite primaire est un type de métabolite qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule. Ce composé a généralement une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque. Un métabolite primaire est typiquement présent dans de nombreux organismes taxonomiquement éloignés. Il est également désigné par métabolite central, qui prend même le sens plus restrictif de métabolite présent dans tous les organismes ou cellules en croissance autonome.

I.2. Les métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes [4,5].

II. Les composés phénoliques :

II.1. Généralités :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique, portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec des glucides.

Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) ; et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogénèse, la germination des graines et la maturation des fruits.

Les composants phénoliques sont des molécules biologiquement actives, ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antiradicalaires, antimicrobiens [6].

Plus de 8000 structures phénoliques sont connues, allant de molécules simples de faibles poids moléculaires (acides phénoliques), aux composés hautement polymérisés comme les tanins. [7]

II.2. Biosynthèse des composés phénoliques :

Les polyphénols sont synthétisés par de deux voies biosynthétiques :

II.2.1. La voie de Shikimate :

C'est une voie qui conduit après transamination et désamination, aux acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques ou les phénols simples [8].

II.2.2. La voie de l'acétate :

Cette voie conduit à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les dihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphthoquinones [9,10]. De plus la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des deux voies dans l'élaboration de composés d'origine mixte, les flavonoïdes [11].

II.3. Classification des composés phénoliques:

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées). Ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) [13, 15].

II.3.1. Les acides phénoliques :

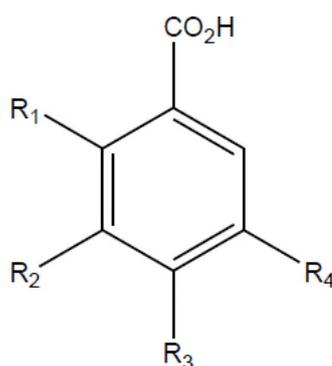
Ce sont des composés phénoliques possédant une fonction acide en plus de la fonction phénol [16,17]. Ils sont solubles dans les solvants organiques [18].

Deux groupes d'acides phénoliques sont définis selon le nombre d'atome de carbone.

II.3.1.1. Acides hydroxybenzoïques C6-C1 :

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6-C1. Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal.

Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides, [19]. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides phydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques et syringiques [20].

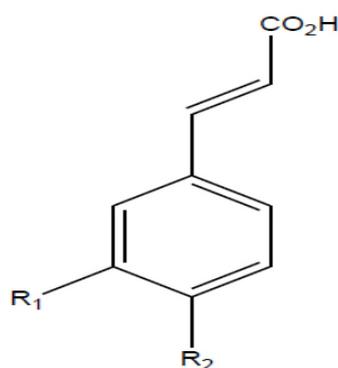


$R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
$R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$	Acide protocatéchique
$R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$	Acide vanillique
$R_1=H, R_2=R_3= R_4=OH$	Acide gallique
$R_1=OH, R_2=R_3= R_4=H$	Acide salicylique

Figure 2 : Quelques exemples des acides hydroxybenzoïques.

II.3.1.2. Acides hydroxycinnamiques C6-C3 :

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont un des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. De plus, l'existence d'une double liaison dans la chaîne latérale conduit à deux séries isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Les formes *trans* sont cependant naturellement prépondérantes et il est possible que les formes *cis* ne correspondent qu'à des artefactes d'extraction [19].



$R_1=R_2=H$	Acide cinnamique (non phénolique)
$R_1=H, R_2=OH$	Acide <i>p</i> -coumarique
$R_1=R_2=OH$	Acide caféique
$R_1=OCH_3, R_2=OH$	Acide férulique

Figure 3: Quelques exemples des acides hydroxycinnamiques.

II .3.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux [21]. Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (C6-C3-C6), ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (**figure 4**) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C [22].

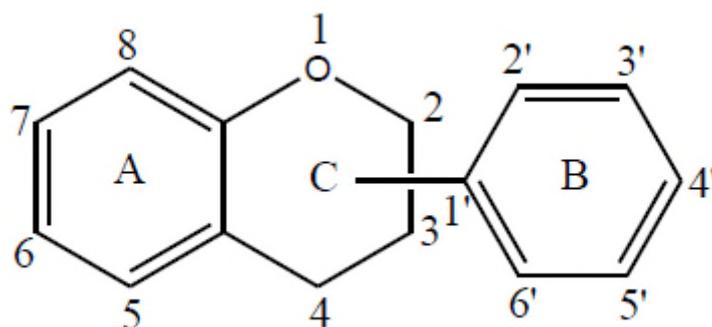
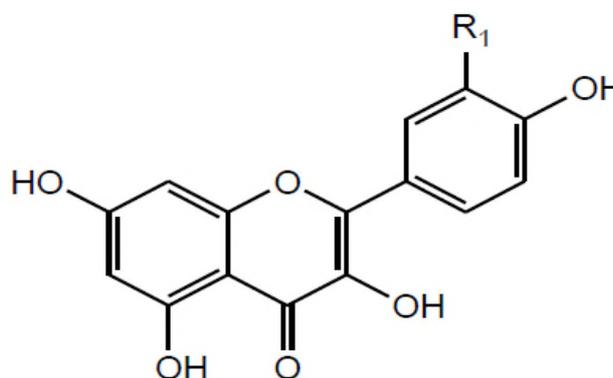


Figure 4: Structure de base des flavonoïdes.

Plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés dans les plantes, et la liste ne cesse de croître. C'est à cause de l'apparition de nombreux modèles de substitution ; les substituants primaires (groupe hydroxyle) peuvent eux-mêmes être substitués (glycosylés ou acylés) donnant parfois des structures très complexes [23]. Les principales classes des flavonoïdes sont : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes [24], ils varient dans leurs caractéristiques structurales par la diversité fonctionnelle autour de l'oxygénation de l'hétérocycle.

II.3.2.1. Flavonols :

Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3 (**figure 5**). Elles sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur couleur varie du blanc au jaune, elles sont essentiellement représentées par la quercétine, le kaempférol et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjugués glycosylés [25].



$R_1=H$	Kaempférol
$R_1=OH$	Quercétine
$R_1=OCH_3$	Isorhamnétine

Figure 5: Des exemples des structures chimiques des flavonols.

II.3.2.2. Les flavones :

Les flavones sont structurellement très similaires aux flavonols et ne diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C (**figure 6**). Elles sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent, leur apport alimentaire est très faible [25].

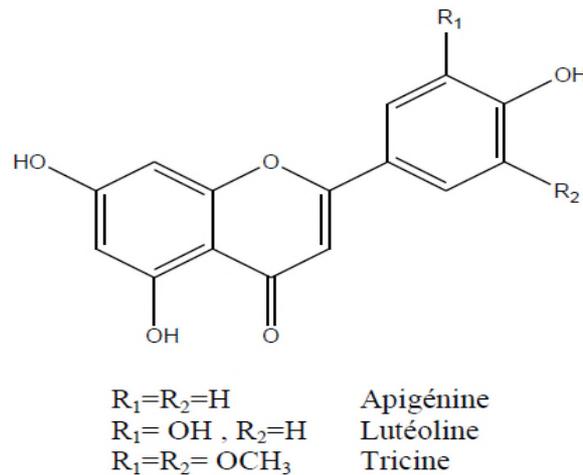
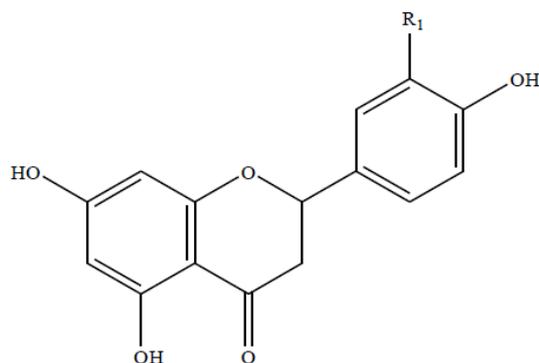


Figure 6 : Des exemples des structures chimiques des flavones.

II.3.2.3. Les flavanones :

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2 (**figure 7**). Chez les flavanones naturelles, le carbone 2 est normalement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée [25].



$R_1=H$ Naringénine

$R_1=OH$ Eriodictyol

$R_1=OCH_3$ Héspéridine

Figure 7 : Des exemples des structures chimiques des flavanones.

II.3.2.4. Les flavanols :

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4 (**figure 8**). Elles sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. Les flavan-3-ols sont très abondant dans les fruits comme les abricots, les cerises, les raisins,... etc [26].

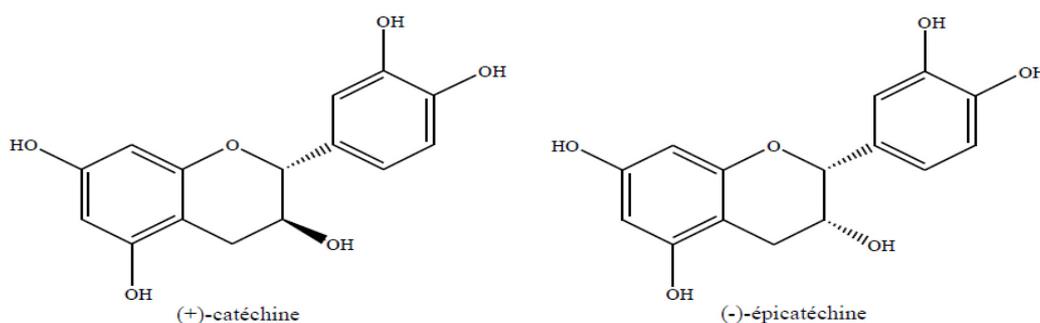


Figure 8 : Deux exemples des structures chimiques des flavanols.

Les flavanols sont largement répandus dans les fruits et légumes, mais la source la plus riche de flavanols au sein de l'alimentation humaine est certainement le thé [27].

II.3.2.5. Les isoflavones

Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes [28]. Contrairement à la plupart

des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt que la position C2 (**figure 9**). Ils ont une distribution très limitée dans le règne végétal [25].

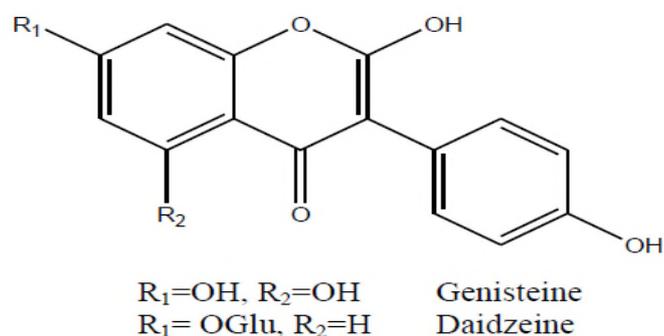


Figure 9: Deux exemples des structures chimiques des isoflavones.

II.3.2.6. Anthocyanes :

Les anthocyanes (en grec Anthos signifie fleur, et kyanos signifie bleu) sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces [29]. Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylum (**figure 10**). Ils sont accumulés dans les vacuoles cellulaires [30] et ils sont responsable des couleurs rouges, violettes et bleues dans les fruits, les légumes, les fleurs et les graines, mais aussi jouent un rôle important dans la physiologie végétale comme attracteurs des insectes et dans la dispersion des graines [31].

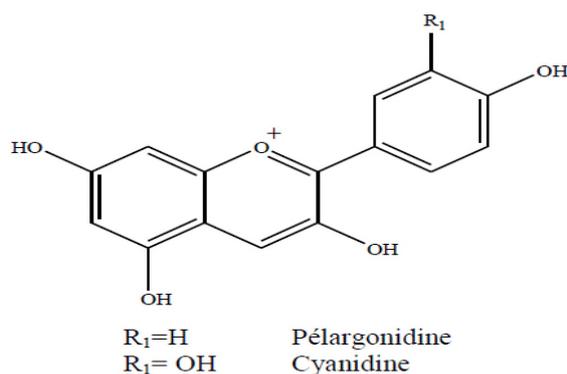


Figure 10: Deux exemples des structures chimiques des anthocyanes.

II.3.3. Les coumarines

Les coumarines viennent du mot « coumarou » non vernaculaire de la fève de Tonka [32]. Isolées la première fois de *Coumarouna odorata* par Vogel en 1820, aujourd'hui, près de

1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. [33]

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et les solvants organiques tels que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Elles ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituant. [34]

Les coumarines ont des effets différents sur le développement des plantes suivant leur concentration mais aussi suivant l'espèce. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance des plantes. Certaines d'entre elles sont induites par des stress abiotiques et biotiques et possèdent une activité antimicrobienne telles les furanocoumarines de persil [35].

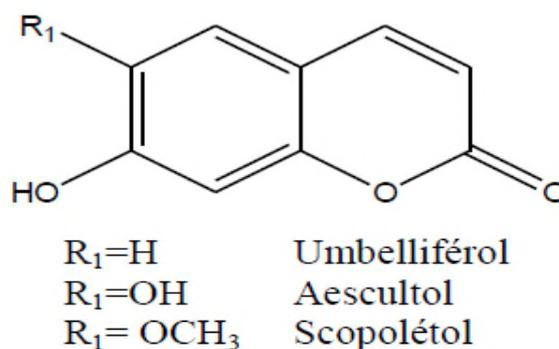


Figure 11 : Quelques exemples des structures chimiques des coumarines.

II.3.4. Tanins :

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandu dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue: les tanins hydrolysables et les tanins condensés [36].

Les tanins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tanins sont le vin et le thé [37].

II.3.4.1. Tanins hydrolysables :

Les tanins hydrolysables (**figure 12**) ou acides tanniques sont des polymères de l'acide gallique ou de son produit de condensation ; l'acide éllagique. Ils ont un poids moléculaire plus faible et précipitent beaucoup moins les protéines que les tanins condensés. Ils peuvent diminuer la dégradation des parois dans le rumen et être hydrolysés dans l'intestin en libérant des produits toxiques pour le foie et le rein [38]. Ils sont divisés en éllagitannins et gallotannins, Les gallotannins libèrent par hydrolyse acide, hydrolyse basique, à l'eau chaude ou par action enzymatique de l'acide gallique [39].

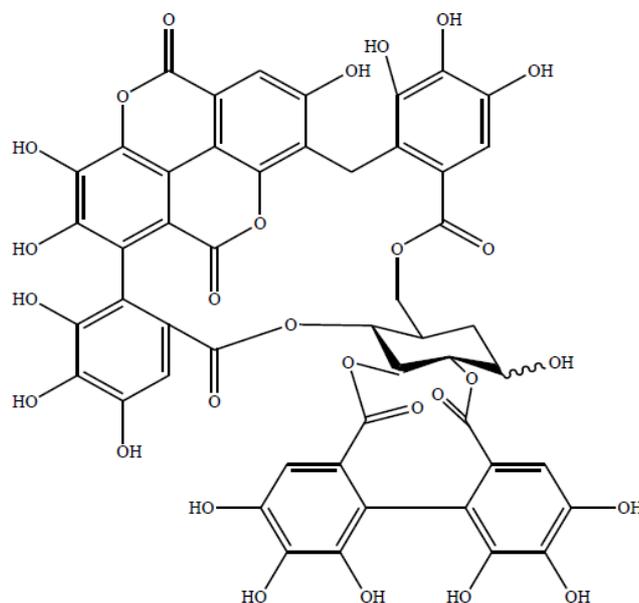


Figure 12: Exemple des tanins hydrolysables.

II.3.4.2. Tanins condensés :

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines. Les tanins condensés (**figure 13**) sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto-oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de types A [40,41].

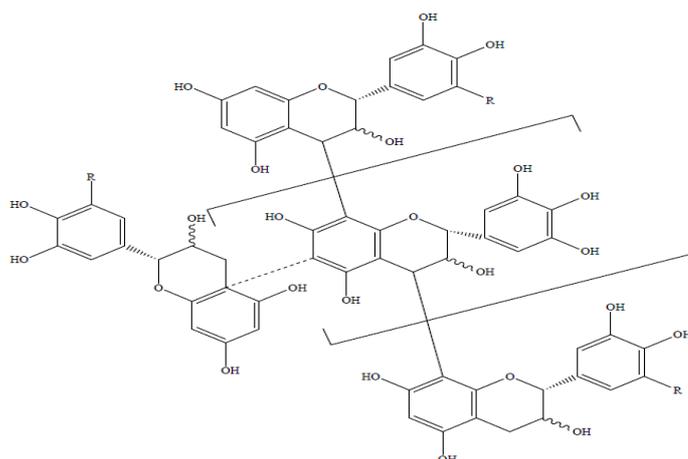


Figure 13: Exemple des tanins condensés.

II.4. Propriétés chimiques des polyphénols :

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques, particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (-M) et substituants à effet mésomère donneur (+M). La conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome oxygène avec le cycle traduit l'effet (+M) du groupe OH. Ce phénomène augmente la délocalisation électronique et produit une charge négative partielle sur les atomes C2, C4, C6 (**figure 13**) [42].

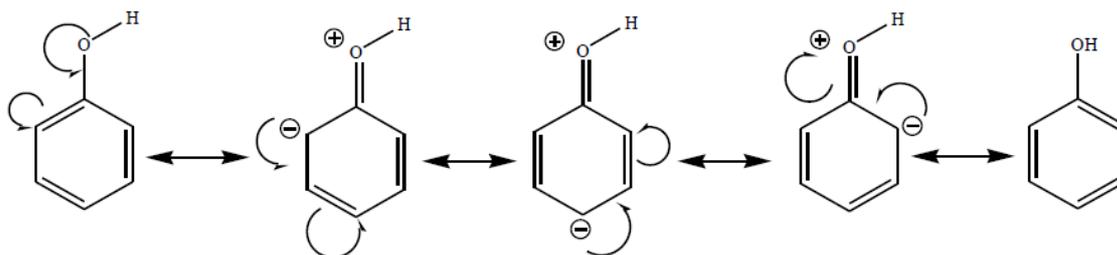


Figure 14 : Formes mésomères du phénol.

On constate qu'une charge négative apparaît en position *ortho* et *para* du phénol (**figure14**), ce sont donc les positions susceptibles de recevoir un électrophile [43]. De ces caractères de base découlent les différentes propriétés physico-chimiques.

Les radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et les antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public [44]. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles. Depuis le début du 20^{ème} siècle, les chimistes ont étudié les antioxydants, caractérisés par leur capacité à s'oxyder à la place d'autres molécules. Leur impact sur la santé n'a été étudié par les biologistes que dans les années 60 grâce aux travaux effectués sur les vitamines et les flavonoïdes, suivies par les travaux sur l'acide ascorbique à la fin des années 70 [45]. Ces dernières années ont vu apparaître un débordement d'informations sur le rôle du stress oxydatif dans le déclenchement d'un certain nombre de maladies graves, telles que certains cancers, les maladies cardiovasculaires et les maladies dégénératives liées au vieillissement, ainsi que sur le rôle thérapeutique possible des antioxydants dans ces maladies [46].

I. Stress oxydatif :

En situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production d'ERO et les systèmes de défenses antioxydants [47].

Le stress oxydant est communément défini comme un déséquilibre entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes d'un organisme, d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire [48].

I.1. Origine du stress :

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, la balance antioxydants/oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès est appelé « stress oxydant » [49, 50].

II. Radicaux libres :

Un radical libre se définit comme tout atome, groupe d'atomes ou molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés dits célibataires sur l'orbitale externe. Cette caractéristique rend les radicaux libres très électrophiles car ils vont tenter de ré-apparier leur électron célibataire en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron; leur durée de vie est ainsi très courte. [51]

Ils sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres composants, en essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir une stabilité [52].

Les radicaux libres sont produits au cours de nombreuses réactions engagées dans les mécanismes physiologiques, (respiration mitochondriale), dans les mécanismes pathologiques (inflammation, infection, toute pathologie dégénérative et vieillissement accéléré) [53].

II.1. Les espèces réactives de l'oxygène :

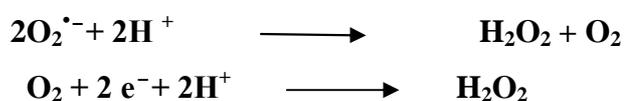
Parmi les espèces radicalaires les plus intéressantes se trouvent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont des radicaux libres qui dérivent de la molécule d'oxygène, par addition d'un électron. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont: le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxynitrite ($ONOO^-$). [54, 55]

II.1.1. Radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$):

Dans l'organisme une partie de l'oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors à la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives : l'anion superoxyde ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$) [56,57].

II.1.2. Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :

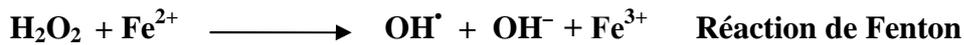
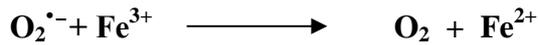
Le Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui n'est pas un radical libre peut être formé secondairement à la dismutation de ($O_2^{\bullet-}$) par la superoxyde-dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases, notamment l'acyl CoA déshydrogénase, la NADH déshydrogénase, la xanthine oxydase, l'uricase, la mono-amine-oxydase...etc [58].



Le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) est également un agent oxydant très réactif ; c'est pour cela qu'on l'utilise souvent comme désinfectant et comme agent de blanchiment. S'il n'est pas rapidement détruit, il peut se décomposer et produire des radicaux hydroxyles qui s'attaquent aux macromolécules de la cellule [59].

II.1.3. Radical hydroxyl :

Il produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferriques, au cours de la réaction d'Haber-Weiss :



Le radical hydroxyle possède une très grande réactivité dans les milieux biologiques, pouvant se « combiner » avec de nombreuses molécules avec une constante de vitesse de l'ordre de 10^9 à 10^{10} M.s⁻¹. Il est capable de réagir avec presque tous les composants cellulaires par échange d'électron, addition sur les doubles liaisons ou arrachement d'un atome d'hydrogène, c'est un oxydant très puissant, constituant certainement le radical libre le plus toxique en biologie, et serait à l'origine de la production des radicaux libres « secondaires », suite à sa réaction avec différents composés cellulaires [60].

II.1.4. D'autres espèces réactives de l'oxygène :

Les espèces réactives de l'oxygène comprennent non seulement les radicaux libres oxygénés mais aussi les radicaux libres dérivant d'autres espèces que l'oxygène par exemple : l'acide hypochloreux (HClO), le monoxyde d'azote NO[•] qui se combine aisément avec le O₂^{•-} pour former le peroxyne (ONOO⁻) [61], agent non radicalaire à la fois oxydant et nitrosant [62,63].

III. Antioxydants :

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydo-réduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ou de retarder ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux libres et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les thiols et des phénols. [64]

III.1. Définition :

Les antioxydants sont des composés chimiques capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielle et nutritionnelle du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit.

En outre, l'antioxydant alimentaire idéal, doit être soluble dans les graisses, efficace à faible dose, et non toxique, n'entraîne ni coloration, ni d'odeur, ni saveur indésirable, résistant aux processus technologiques, il est stable dans le produit fini. [65]

III.2. Classification des antioxydants :

La classification de tous les antioxydants connus est difficile, ils sont classés généralement par leur mécanisme d'action ou par leur nature chimique

III.2.1. Selon leur action :**➤ Antioxydants de type I:**

Il s'agit de substances capables d'interrompre la chaîne radicalaire en cédant un radical d'hydrogène (H^\bullet) à un radical libre lipidique présent.



AH : antioxydant et A^\bullet : radical de l'antioxydant.

Les radicaux A^\bullet qui se forment sont relativement stables et ne possèdent pas d'énergie suffisante pour arracher un hydrogène aux lipides. Ils subissent une réaction d'arrêt aboutissant à la formation des produits non radicalaires. [66]

➤ Antioxydants de type II:

Les antioxydants de cette catégorie sont les composés qui agissent en empêchant ou en diminuant la formation des radicaux libres. Les plus utilisés sont des agents complexant les ions métalliques, réduisant l'effet prooxydant des ions, c'est le cas de l'acide phosphorique, citrique et les ascorbates. Ils agissent en stabilisant la forme bivalente du métal dont l'action catalysante est plus faible que celle de la forme trivalente [67].

➤ Antioxydants de type III:

Ils regroupent les facteurs de l'environnement qui ont une action antioxydante, en agissant sur le potentiel redox du milieu, la température, la pression en oxygène, la lumière [67].

III.2.2. Selon leur source :**➤ Les antioxydants synthétiques :**

Dans l'industrie alimentaire, les antioxydants synthétiques, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT), gallate propylée (PG) et le tetrabutylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matières de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture [68].

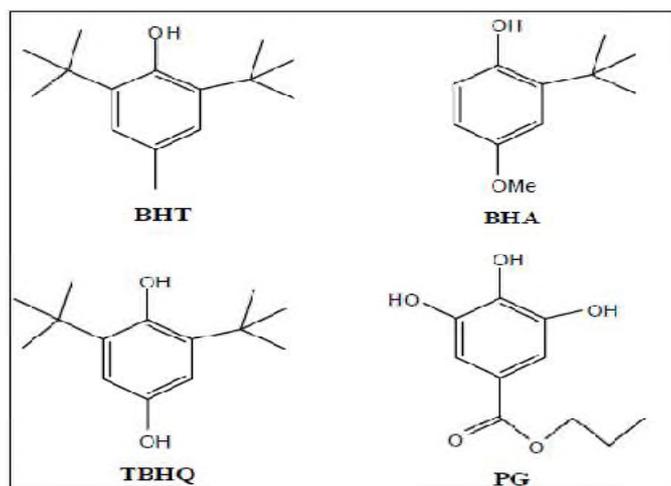


Figure 15 : Les Antioxydants Synthétiques.

➤ **Antioxydants naturels :**

Les antioxydants sont naturellement présents dans presque toutes les plantes, tous les micro-organismes, les champignons et même dans les tissus animaux [69]. Elles incluent le bêta-carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine c, etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres [70].

III.3. Mécanisme d'action :

D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. Un tel effet résultant d'une structure de donneur d'atome d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques cas de dérivés du phénol. En plus leurs radicaux intermédiaires sont relativement stables du fait de la délocalisation par résonance et par manque de positions appropriées pour être attaqué par l'oxygène moléculaire [66].

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires. D'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras. Tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulier pour la transformer en chaleur [51].

III.4. Utilisation des antioxydants :

- En médecine en tant que médicament pour l'homme ; exemple : les maladies du stress, des activités antioxydantes.
- Dans l'industrie chimique : pour éviter le durcissement du caoutchouc ou en métallurgie pour protéger les métaux de l'oxydation.
- Dans l'industrie agro-alimentaire : pour éviter le rancissement des corps gras.
- Dans l'industrie teinturerie : pour éviter l'oxydation des colorants au soufre ou des colorants de cuve lors de la teinture [71].

I.1. Matériel végétal :

I.1.1. *Urtica dioica*:



Figure 16: photos d'*Urtica dioica*.

➤ Description botanique :

L'Ortie dioïque est aussi appelée « Grande Ortie », « Ortie commune » ou « Ortie vivace ».

L'Ortie est une plante élancée, mesurant de 60 à 90 cm de haut et pouvant dépasser 1 m 50. Elle se caractérise par ses feuilles opposées et ses petites fleurs en grappes ou en « boulettes » de couleur verdâtre. Vivace, elle se propage rapidement grâce à ses organes souterrains constitués par des rhizomes cylindriques de 3 à 10 mm d'épaisseur et de longues racines de 1 à 5 mm d'épaisseur pourvues d'un chevelu de fines racines.

Les feuilles sont grandes et opposées deux par deux, de forme ovale, bien plus longues que larges, terminées en pointe et à fortes dents triangulaires. Elles répandent une faible odeur herbacée; leur saveur est aigrelette et astringente.

Les tiges sont fortes, dressées, non ramifiées et à section carrée.

Le limbe et le pétiole sont couverts de trois sortes de poils: poils urticants, poils tecteurs non urticants, longs, coniques, unicellulaires, dont la partie basilaire fortement renflée contient des cristaux de carbonate de calcium et poils glandulaires courts, constitués par un court pédicelle supportant une glande quadricellulaire. Ces poils tecteurs et glandulaires sont surtout localisés à la face supérieure du limbe [72].

➤ **Classification de la plante :**

Nom binominal : *Urtica dioica*

Règne : Plante

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Urticales

Famille : Urticacée

Genre : *Urtica*.

Type: plante herbacée vivace haute de cm 40 à tige adressée quadrangulaire portant des poils urticants et des poils court Période de floraison: avril – septembre [73].

➤ **Usages médicaux :**

Bref historique des utilisations médicinales de l'ortie en occident, depuis l'antiquité, l'ortie est considérée comme un hémostatique puissant. En Grèce, Discorde (Ier siècle) prescrivait l'utilisation de feuilles fraîches pour les métrorragies, les blessures infectées et l'application de son jus pour les saignements de nez. Au XVIIIe siècle, Chonel la considérait comme « l'un des plus assurés des remèdes pour le crachement de sang, et pour les hémorragies». Elle était reconnue pour ses propriétés astringentes, anti-diarrhéiques, et dépuratives. Elle fut inscrite au Codex de la Pharmacopée française en 1818. Jusqu'au XIXe siècle, on considérait que les flagellations du corps avec une botte d'ortie étaient un moyen efficace de lutter contre les douleurs rhumatismales [73].

I.1.2. *Urtica pilulifera*:



Figure 17: photos d'*Urtica pilulifera*.

➤ **Description et classification botanique :**

L'ortie à pilules (*Urtica pilulifera*), appelée aussi *ortie algérienne* ou *ortie romaine*, est une plante de la famille des Urticacées poussant sur le pourtour méditerranéen, d'une hauteur de 30 cm à 1 m, à tiges quadrangulaires, ascendantes à érigées.

C'est une plante monoïque, qui doit son nom à ses fleurs femelles ressemblant à des pilules hérissées de poils urticants. Les feuilles opposées et longuement pétiolées sont ovales ou en forme de cœur, à limbe généralement très denté et apex acuminé.

Toutes les parties de la plante sont très urticantes.

➤ **Usages médicaux :**

D'après les études ethnobotaniques, on relève que les espèces étudiées du genre *Urtica* ont le même nom vernaculaire «hurriga», d'où la difficulté de savoir les usages thérapeutiques de chacune des espèces. Aussi, les différentes parties des orties sont indiquées en thérapie traditionnelle ; leur utilisation locale y est surtout liée aux usages locaux contre l'anémie, le rhumatisme, l'eczéma, la rhinite allergique et rhumatoïde et les racines, en particulier sont utilisées pour le traitement de l'hyperplasie bénigne de la prostate. En Turquie, les populations utilisent l'ortie à pilule et l'ortie brûlante pour le traitement des maladies gastro-intestinales, le diabète, les problèmes rénaux [74].

I.1.3. *Globularia alypum* L:



Figure 18: *Globularia alypum* L.

➤ **Description et classification botanique :**

Globularia alypum L. (Globulariacées) « *Ain arneb* », est un arbuste d'environ 60cm de haut, pérenne, de feuilles coriaces, glauques de forme ovale, ses fleurs sont réunies en capitules au sommet des tiges, de couleur bleue violacée, ses fruits sont akènes. C'est une plante très répandue dans le territoire méditerranéen [75].

Le genre *Globularia* (les globulaires) regroupe des plantes classées dans la famille des *Plantaginacées* et dans la sous famille des *Globulariaceae*. Elle appartenait autrefois à la famille des *Globulariaceae*. Son nom, *Alypun*, signifie littéralement « qui calme la douleur », signe que cette plante a été autrefois utilisée dans la médecine populaire [76].

➤ **Utilisation thérapeutique:**

La plante est connue en pharmacopées traditionnelle pour ses propriétés curatives; antidiabétique, laxative, cholagogue, stomachique, sudorifique et purgative [75].

I.2.Récolte :

Les feuilles *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, *Globularia alypum L* ont été récoltées durant la période de mois d'avril 2015 dans la région de Tazmalt, wilaya de Bejaia.

I.3. Séchage, Broyage et tamisage :

Les feuilles récoltées ont été séchées à l'air libre et à température ambiante dans un endroit aéré et ombragé.

Après séchage, à l'aide d'un broyeur électrique les feuilles ont été broyées jusqu'à l'obtention des poudres fines. Ces dernières ont été tamisées, à l'aide d'un tamis de granulométrie de 63µm, pour récupérer des poudre très fines, afin d'optimiser l'extraction.

La poudre a été conservée dans des flacons en verre fermé et stockés à l'abri de la lumière.

I.4. Méthode d'extraction par Soxhlet:

Un extracteur de Soxhlet (ou appareil de Soxhlet) est une pièce de verrerie qui permet de faire l'extraction par solvant continue d'une substance contenue dans une poudre solide. Cet appareil porte le nom de son inventeur : Franz Von Soxhlet en 1879 [77].



Figure.19:L'appareil de Soxhlet.

➤ **Avantages :**

- Le cycle se répète indéfiniment. On peut ainsi épuiser complètement le solide en quelques cycles sans intervention. Le résultat est équivalent à une série de macérations successives, mais cette technique ne nécessite pas un grand nombre d'opérations.
- Ainsi, on a un net gain de temps de manipulation (à condition de laisser l'appareil fonctionner un certain temps) : une fois mis en route, le montage n'a pas besoin d'être manipulé ni même surveillé jusqu'à son démontage. De plus, cette méthode requiert nettement moins de solvant que la méthode des macérations successives pour une même efficacité d'extraction. L'intérêt est donc également économique.
- Le solvant est constamment distillé, de sorte qu'il ne se sature jamais. Même si la substance extraite est en trop grande quantité par rapport au solvant et qu'elle dépasse sa solubilité maximale, c'est toujours du solvant pur qui retombe de l'évaporateur.
- Aucune filtration n'est nécessaire après lixiviation de l'échantillon.
- L'équipement de base est peu coûteux.) [77,78].
- L'extraction au Soxhlet est une méthode très simple qui nécessite peu de formation [79].

➤ **Inconvénients :**

L'extraction par Soxhlet peut présenter quelques inconvénients :

- La taille de la cartouche étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives avec plusieurs cartouches, ce qui peut prendre un temps considérable.
- L'extraction au Soxhlet nécessite beaucoup de temps et une quantité relativement importante de solvant qui est non seulement coûteux à éliminer mais aussi est une source supplémentaire des problèmes environnementaux.
- L'extraction se fait au point d'ébullition du solvant au cours de longs périodes, ce qui peut entraîner la décomposition thermique des substances cibles. [77, 80].

L'extraction est effectuée par épuisement successif du matériel végétal, en utilisant le méthanol. La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale dont nous disposons (dans notre cas nous avons utilisé 10 g de poudre pour 250 ml de solvant organique).

Le Soxhlet est composé d'un corps en verre, dans lequel est placée une cartouche en papier-filtre épais (matière pénétrable pour le solvant), d'un tube siphon et d'un tube de distillation. Dans le montage l'extracteur est placé sur un ballon contenant le solvant d'extraction. Le solvant est chauffé à ébullition. Les vapeurs ainsi produites passent par la cartouche contenant le matériel végétal à extraire. Le réfrigérant placé au dessus du dispositif servira à condenser les vapeurs du solvant.

Ensuite, le condensat retombe dans le corps de l'extracteur sur la cartouche, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant.

Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'au niveau du sommet du tube-siphon, suivi par le retour dans le ballon du liquide de l'extracteur accompagné de substances extraites. Ainsi le solvant dans le ballon s'enrichit progressivement en composants solubles. L'extraction continue jusqu'à l'épuisement de la matière solide chargée dans la cartouche. L'extraction est complète lorsque le solvant d'extraction devient limpide.

L'extrait méthanolique est centrifugé à 6000 tr/min pendant 10 minutes et conservé dans des flacons à 4°C et à l'abri de la lumière.

I.5. spectrophotométrie UV-visible :

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier. Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . L'absorbance de la solution est définie comme suit :

$$A = \log_{10} (I_0/I)$$

$$A = -\log T$$

Avec T : la transmittance, elle est égale à :

$$T = I/I_0$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible. Les méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour évaluer la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale [81].

I.6. Dosage des Composés phénoliques :

I.6.1. Dosage des phénols totaux :

Le réactif de Folin- Ciocalteu, mélange d'acides phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit en présence de polyphénols en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle aux taux des composés phénoliques présents dans la solution [82].

La teneur en composés phénoliques est évaluée selon la méthode décrite par [83]. 100 μ l de la solution d'extrait (extrait de chaque plante) sont mélangés avec 100 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (50%), puis 2ml de la solution de carbonate de sodium (2%) sont ajoutés au mélange réactionnel. Ce dernier est laissé pendant 30min à l'abri de la lumière puis l'absorbance est mesurée à 760nm par rapport à un blanc sans extrait.

La quantification des polyphénols à été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisé par un extrait d'étalon acide gallique à différentes concentrations (0,04-0,2mg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par 100 g d'extrait (mg EAG 100 g⁻¹).

I.6.2. Dosage des flavonoïdes :

La teneur en flavonoïdes est déterminée selon la méthode décrite par [84]. La méthode repose sur la capacité des flavonoïdes à chélater des métaux (chlorure d'aluminium) et de former un complexe de coloration jaunâtre. Ils contiennent des groupements hydroxyles (OH) libre, en position 3 et 5, ces groupements sont susceptibles de former des complexes avec le groupement CO, en présence de chlorure d'aluminium. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de complexes formés [85].

Une quantité de 500µl d'extrait de la plante est mélangée avec 500µl de chlorure d'aluminium (2%). L'absorbance du mélange est mesurée à 413 nm, après 10min d'incubation. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la quercétine à différentes concentrations (0,01 – 0,05 mg /ml). La teneur en flavonoïdes a été exprimé en mg équivalent en quercétine par 100g d'échantillon (mg EQ/100g).

I.6.3. Dosage des flavonols:

Le dosage des flavonols est déterminé selon le procédé décrit par [86]. Il consiste à ajouter 500µl de la solution de trichlorure d'aluminium (AlCl₃, 2%) et 750µl de la solution d'acétate de sodium à 250µl d'extrait. Après incubation 2h et 30 minutes à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 440nm. Les concentrations en flavonols sont déterminées en ce référent à une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercétine et les résultats sont exprimées en mg équivalent la quercétine par 100 g d'extrait (mgEQ/100g).

I.7. Activité anti-oxydante des extraits phénoliques :

I.7.1. Activité anti-radicalaire :

Le DPPH (2,2-Diphényl-1- picrylHydrazyl) est un radical libre stable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, de couleur violacée qui absorbe à 517nm [87]. (Figure 19). Il fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydante des composés phénoliques [88].

En présence d'antioxydant l'électron célibataire devient apparié, ce qui conduit à la décoloration de DPPH du violet (forme radicalaire DPPH) au jaune (forme réduite DPPH-H) [88]. Cette décoloration représente donc la capacité d'échantillon de piéger ce radical.

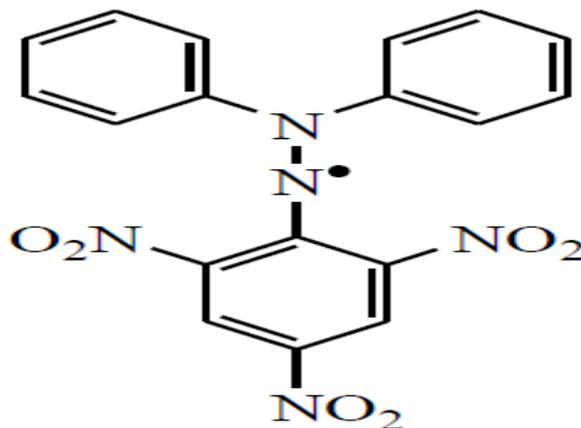


Figure 20 : Structure chimique du radical libre DPPH
(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle).

Le protocole utilisé est celui décrit par [89]. 1000 μ l de la solution de DPPH sont ajoutés à 100 μ l de l'extrait, l'absorbance est mesurée à 517nm après 10 minutes d'incubation à température ambiante. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par 100g d'échantillon.

I.7.2. Activité scavenger du radical ABTS⁺:

L'activité antioxydante des extraits est déterminée selon, la méthode de [90]. Dans ce test, le cation radicalaire l'ABTS⁺ est généré en mélangeant 7 mM d'ABTS et 2,45 mM de persulfate de potassium. Le mélange est ensuite conservé à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 16 h. avant l'utilisation, la solution d'ABTS⁺ est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,02$ à 734 nm. Un volume de 100 μ l de chaque extrait est mélangé avec 1 ml de la solution d'ABTS et l'absorbance est mesurée à 734 nm. Les résultats sont exprimés en mg équivalent de trolox par 100 g de l'échantillon (mg ET/100 g).

I.7.3. Méthode utilisant le phosphomolybdate :

La capacité antioxydante des extraits utilisant la méthode du phosphomolybdate est basée sur l'oxydation de molybdate-IV (Mo IV) en molybdate-V (Mo V) par ces extraits (phosphate/Mo V) de couleur verte au pH acide [91].

L'activité antioxydante avec le phosphomolybdate est déterminée selon le protocole décrit par [92]. Il consiste à ajouter 1ml du réactif de phosphomolybdate (0.6M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4mM de molybdate d'ammonium) à 100 μ l

d'extrait. Après 90 minutes d'incubation dans le bain-marie à 95°C, l'absorbance est mesurée à 695nm. L'activité antioxydante mesurée par le phosphomolybdate est exprimée en mg équivalent d'acide ascorbique par 100g d'échantillon.

II.1. Dosages des composés phénoliques :

L'étude quantitative des extraits préparés à partir des feuilles de *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, et *Globularia alypum L*, au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur des composés phénoliques. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués.

II.1.1. Dosage des phénols totaux :

La teneur en polyphénols est estimée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la teneur en polyphénols des plantes médicinales et des aliments [93].

La méthode au Folin-Ciocalteu utilisée est choisie pour les raisons suivantes :

- C'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité.
- La grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permis de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré.
- C'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants naturels à travers le monde [94].
- C'est une méthode très sensible mais malheureusement peu spécifique car beaucoup de composés réducteurs non phénoliques peuvent interférer. Cependant, elle reste la méthode la plus utilisée pour déterminer la concentration des polyphénols totaux [95].

Les teneurs en phénols totaux exprimées en milligramme d'équivalent acide gallique par 100 g d'extrait (mg EAG 100 g⁻¹) sont représentées dans la figure suivante :

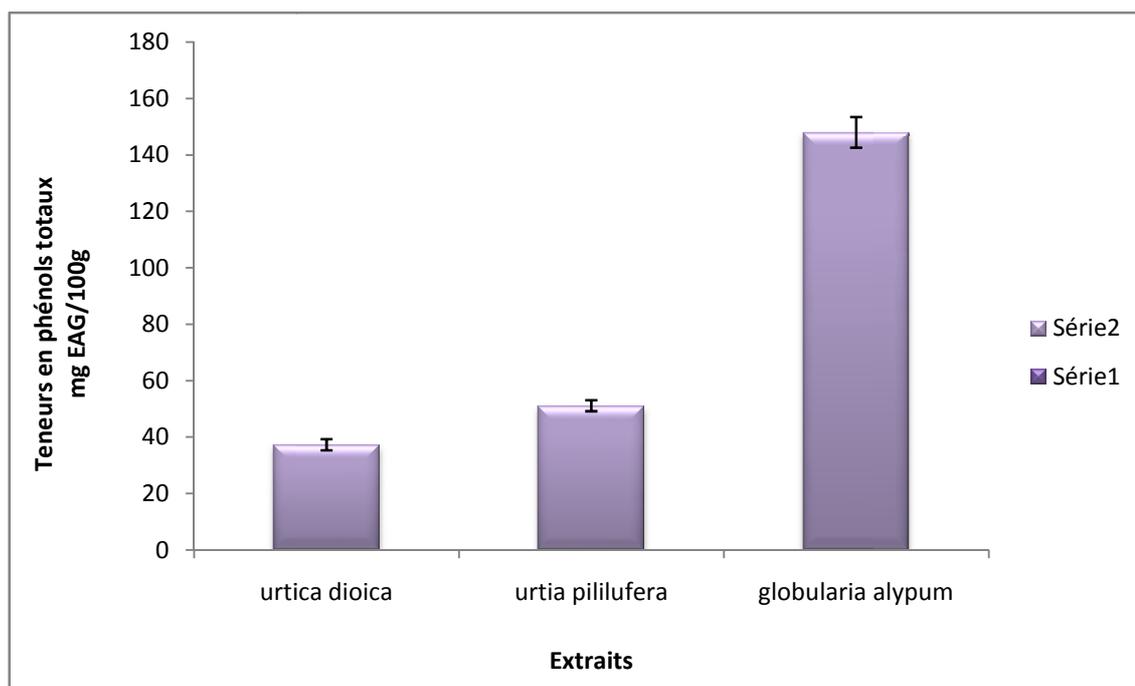


Figure 21 : Teneur en phénols totaux dans les différents extraits des feuilles des *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, *Globularia alypum L*.

Selon les résultats illustrés ci-dessus, on s'aperçoit clairement que la plus forte teneur en polyphénols revient à, *Globularia alypum L* (148,03 mg EAG/100g), suivi par *Urtica pilulifera* (51,19 mg EAG/ 100g). *Urtica dioica* possède la plus faible teneur en polyphénols (37,35 mg EAG/ 100g).

En effet, la teneur des phénols totaux n'est pas stable, et se diffère d'une plante à une autre et entre les espèces du même genre, ce qui est le cas dans notre étude concernant les deux espèces d'*Urtica*. Daoudi et ses collaborateurs (2015) [74] ont trouvé des teneurs différentes pour 3 espèces de *Urtica*, dont les valeurs sont : *Urtica piluliferae* (2,313±0,3mg EAG/30g MS), *Urtica membranacea* (1,498±0,09 mg EAG/30g MS) et *Urtica urens* présente un taux très faible par rapport aux deux autres (0,06±0,029mgEAG /30g MS). Le même cas est signalé par Djeridane et ses collaborateurs (2006) [84], lors d'une étude effectuée sur 11 plantes médicinales algériens de différentes familles.

Une étude menée par Khelifi et ses collaborateurs (2011) [97] montre que l'extrait méthanolique de, *Globularia alypum L* enregistre une valeur de (139,95± 3.4 g GAE/Kg) Suivi par l'extrait de l'acétone avec une concentration de 109.46 ± 1.14 g GAE/Kg qui sont largement supérieur à celle enregistré par notre étude, Djeridane et ses collaborateurs (2006) [84], ont obtenus une concentration en composés phénoliques sur l'extrait éthanolique de *Globularia alypum L* supérieurs (21,54±0,81 mg GAE/g), Le même cas est signalé par

Djeridane et ses collaborateurs (2007) [98] dont les concentrations en phénols totaux sont de (46 mg GAE/g).

Les résultats de la présente étude sont différents de ceux obtenus par Mekhibi et Boudria (2013) [73], sur les extraits de *Urtica dioica* de la région de jijel utilisant des solvants de polarité croissante dont les valeurs sont : l'extrait de n- butanolique (14,23 mg EAG/g) suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (0,92 mg EAG/g) et l'extrait de Chloroforme (0,79mg EAG/g).

Le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à autre, cela peut être attribué à plusieurs facteurs :

- Facteurs climatiques et environnementaux : la zone géographique, sécheresse, sol, agressions et maladies...etc. [99].
- Le patrimoine génétique, la période de la récolte et le stade de développement de la plante [100].
- La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des phénols totaux [101].

II.1.2. Dosage des Flavonoïdes:

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus répandu des composés phénoliques. Les teneurs en flavonoïdes exprimées en milligramme d'équivalent en quercétine par 100 g d'extrait ($\text{mg EQ } 100 \text{ g}^{-1}$) sont représentées dans la figure suivante :

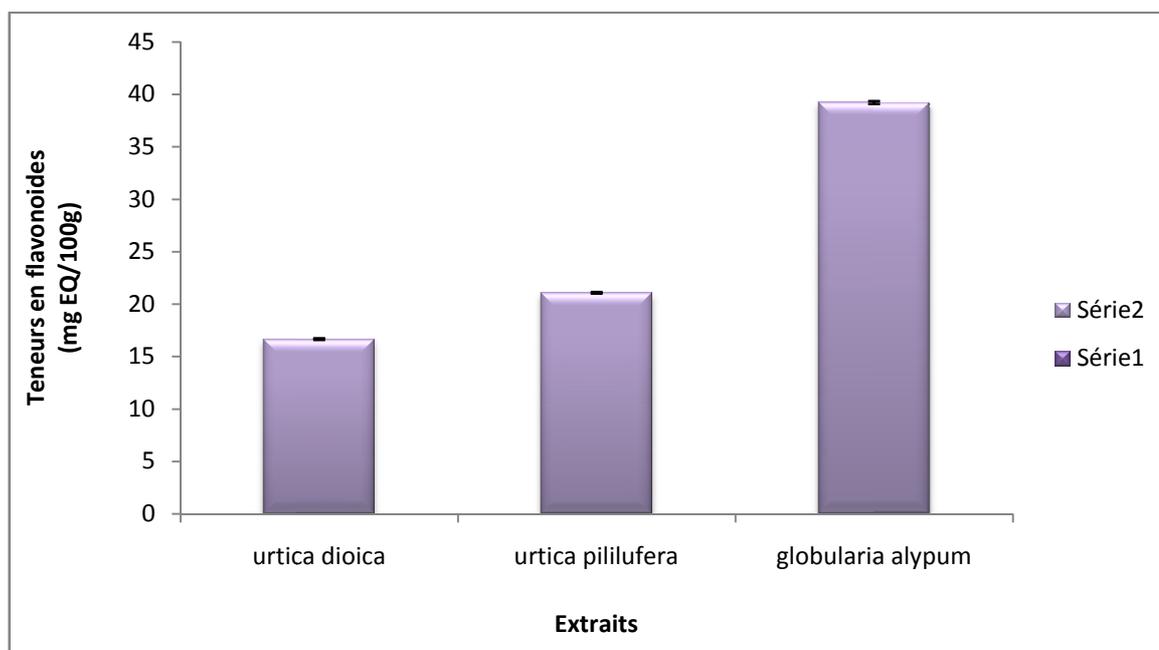


Figure 22 : Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits des feuilles des *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, *Globularia alypum* L.

Les résultats illustrés ci-dessus indiquent que le *Globularia alypum L* présente la teneur la plus élevée en flavonoïdes qui est de (39,21 mg EQ/100g) en le comparant avec *Urtica pilulifera* et *Urtica dioica* dont leurs extraits contiennent respectivement (21,08 mg EQ/100g) et (16,66 mg EQ/100g).

L'analyse réalisée par Djeridane et ses collaborateurs (2006) [84] sur quelques plantes médicinales algériens a révélé des teneurs en flavonoïdes dans *Globularia alypum L* ($4,54 \pm 0,09$ mg EQ/g) supérieures à celles enregistrées par notre étude. Le même cas est signalé par Djeridane et ses collaborateurs (2007) [99] dont la concentration en flavonoïdes est (3mg EQ/g).

L'étude réalisée par Khlifi et ses collaborateurs (2011) [97] montre que les teneurs en flavonoïdes dans les extraits méthanoliques ($19,29 \pm 0,04$ g EQ/kg) supérieurs à celles des extraits de l'acétone et l'eau dont les taux sont respectivement ($17,08 \pm 0,35$ g EQ/kg) et ($1,33 \pm 0,02$ g EQ/kg).

Quant aux extraits de *Urtica pilulifera*, une étude menée par Daoudi et ses collaborateurs (2015) [74] sur trois espèces de *Urtica* montre que les flavonoïdes se concentrent principalement au niveau de l'extrait de *Urtica pilulifera* ($0,337 \pm 0,037$ mg EQ/30g), suivi par l'extrait de *Urtica membranacea* ($0,05 \pm 0,002$ mg EQ/30g), tandis que l'extrait de *Urtica urens* détient une très faible quantité ($0,005 \pm 0,0002$ mg EQ/30 g).

L'étude de Mekhibi et Boudria (2013) [73] montre que la teneur en flavonoïdes totaux dans la phase butanolique de la plante *Urtica dioica* de la région de jijel (4,31mg EQ/g) est la plus riches que l'extrait d'acetate d'ethyle (0,278mg EQ/g) et de chloroforme (0,24mg EQ/g).

II.1.3. Dosage des flavonols:

Les teneurs en flavonols exprimées en milligramme d'équivalent de quercétine par 100 g d'extrait (mg EQ/ 100 g) sont représentées dans la figure suivante :

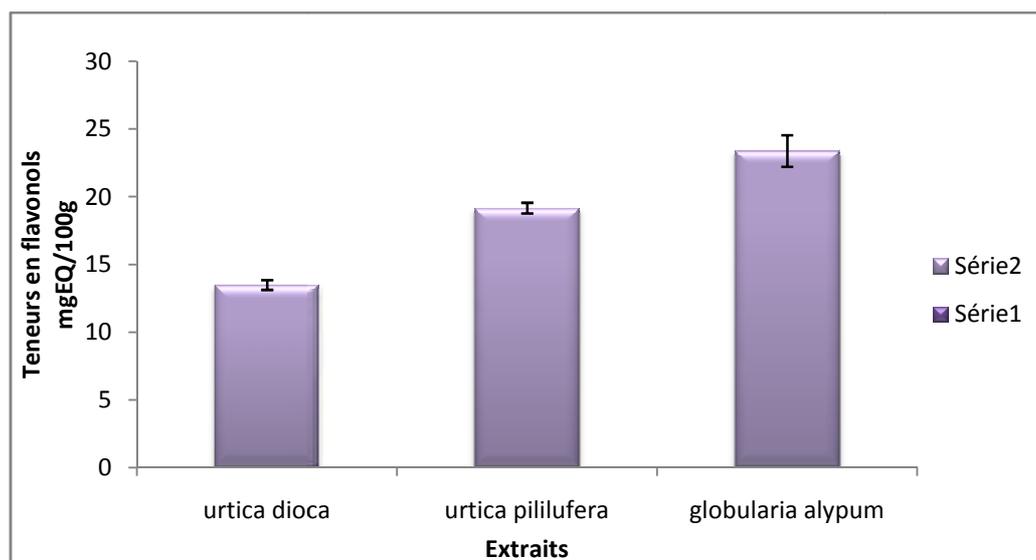


Figure 23 : Teneur en flavonols dans les différents extraits des feuilles des *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, *Globularia alypum* L.

Les résultats obtenus montrent que le *Globularia alypum* L présente la teneur la plus élevée en flavonols (23,38 mg EQ/100g), suivi par *Urtica pilulifera* (19,17 mg EQ/100g) et en fin *Urtica dioica* qui possède la plus faible teneur en flavonols (13,49 mg EQ/100g).

II.2. Activité anti-oxydante des extraits phénoliques :

Les antioxydants naturels sont considérés comme une solution intéressante pour remplacer les antioxydants synthétiques et qui peuvent être employés pour empêcher les maladies et l'oxydation des systèmes complexes des aliments.

Les résultats de détermination de la capacité antioxydante d'un extrait dépend considérablement de la méthodologie utilisée, de l'oxydant et du substrat oxydable utilisé dans la mesure [102]. Par conséquent, il est important de comparer différentes méthodes analytiques variantes dans leur cible d'oxydation afin de comprendre l'activité biologique d'un antioxydant et obtenir des données précises pour une meilleure comparaison avec d'autres données de la littérature [103].

III.2.1. Activité anti-radicalaire :

Le radical DPPH est largement utilisé pour l'évaluation de l'activité antioxydante des molécules biologiques. Ce test n'est pas quantitatif, il permet de comparer différents extraits entre eux selon leur capacité à piéger le DPPH. Il est réduit en présence d'antioxydant qui entraîne sa décoloration par transfert de proton [104]. (Figure 23).

présente le pouvoir anti radicalaire le plus intéressant, suivi par l'extrait de *Urtica pilulifera* (1,47 mg EAG/100g) et *Urtica dioica* (0,47mg EAG/100g).

L'étude menée par Khlifi et ses collaborateurs (2011) [97] montre que l'activité anti radicalaire des extraits méthanoliques de *Globularia alypum L* était supérieure à celle d'acétone, d'autre part les extraits de l'éther et dichlorométhane a présenté une faible activité anti radicalaire. Safi et ces collaborateurs (2007) [105] dans l'étude de l'activité antioxydante de *Globularia alypum L* ont trouvé que l'extrait eau/méthanol démontre une remarquable activité antioxydante.

Mekhibi et Boudria (2013) [73] dans l'étude sur les extraits bruts de la plante *Urtica dioica* montre que l'extrait de n-butanol révèle la plus grande efficacité de piéger le radical libre suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle.

II.2.2. Activité scavenger du radical ABTS⁺:

L'activité des extraits est exprimée par mg équivalent de trolox par 100 g d'échantillon (mg ET/100g). (Figure 25).

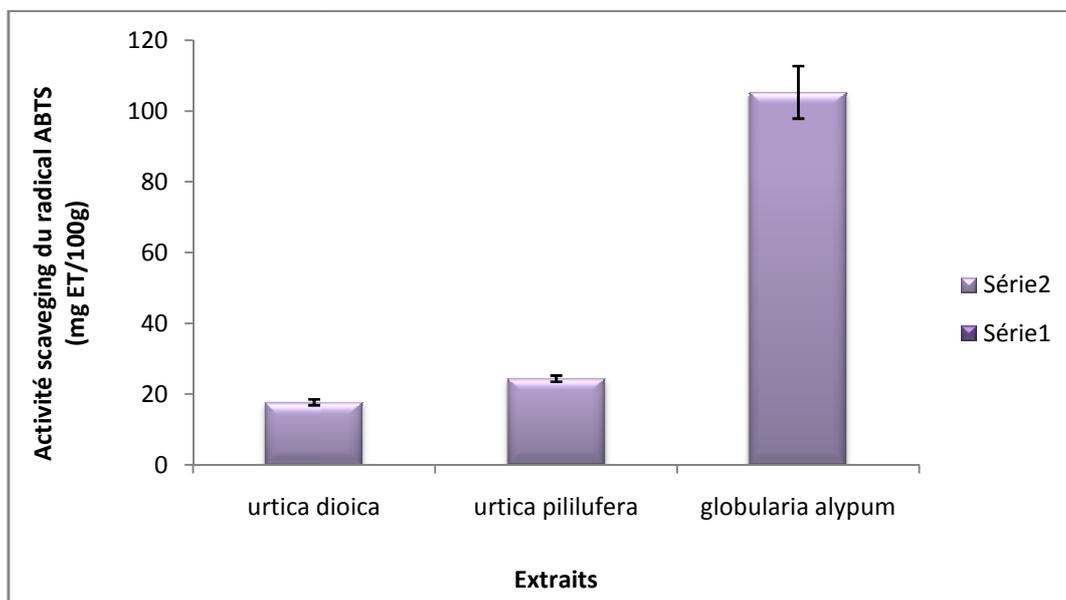


Figure 26: Activité scavenger du radical ABTS⁺ des extraits des feuilles des *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, *Globularia alypum L*.

D'après les résultats obtenus, l'extrait de *Globularia alypum L* a exhibé de meilleures capacités antioxydant vis-à-vis du radical ABTS⁺ avec une valeur (105,82 mg ET/100g), des

valeurs inférieures sont montrés par l'extrait de *Urtica pilulifera* (24,44 mg ET/100g) suivi par *Urtica dioica* (17,77mg ET/100g).

Djeridane et ses collaborateurs (2006) [84] dans l'étude de l'activité antioxydant de plusieurs plantes algériennes, parmi *Globularia alypum L* a enregistré (20,31mmol ET/g). Une autre étude menée par Khelifi et ses collaborateurs (2011) [96] sur l'étude de l'activité antioxydane de divers extraits de *Globularia alypum L* montre qu'une bonne activité antioxydante à été présenté par les extraits méthanoliques suivi par l'extrait d'acétate.

II.2.3.Méthode utilisant le phosphomolybdate :

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide ascorbique par 100g d'échantillon et représentées dans la figure suivante :

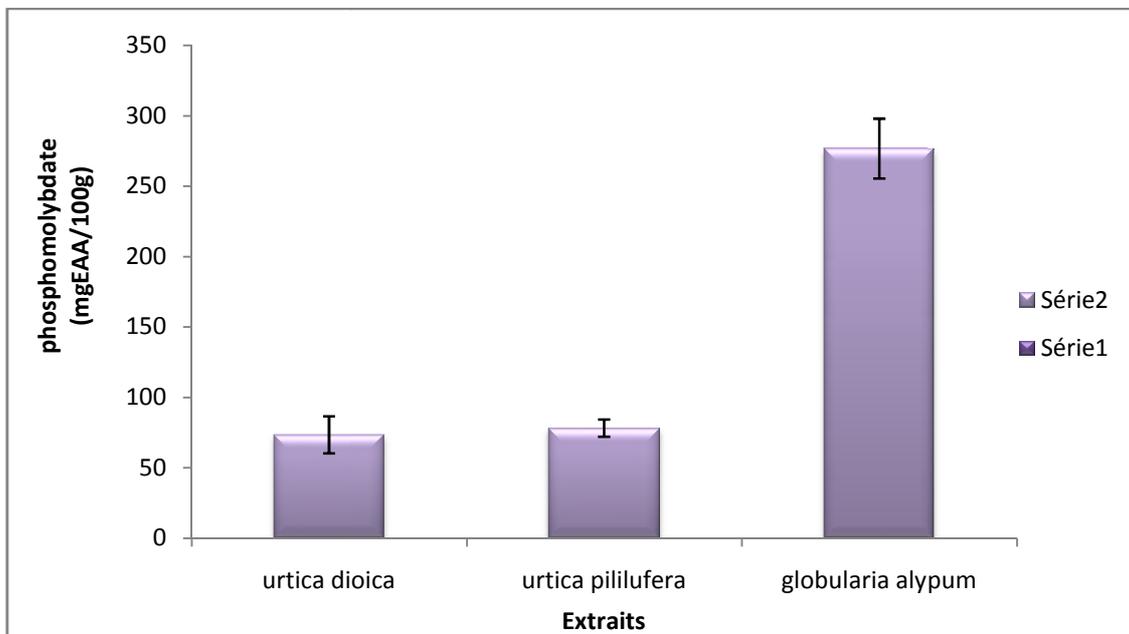


Figure 27: *Activité antioxydante utilisant le phosphomolybdate des extraits des feuilles des Urtica dioica, Urtica pilulifera, Globularia alypum L.*

Les résultats illustrés ci-dessus montrent que l'extrait de *Globularia alypum L* représente une meilleure activité antioxydante au phosphomolybdate (276,65 mg EAA/100g), suivi par l'extrait de *Urtica pilulifera* (78,20 mg EAA/100g) et *Urtica dioica* (73,45mg EAA/100g).

Conclusion :

L'étude réalisée a pour but l'évaluation quantitative et qualitative des substances antioxydantes contenues dans les extraits des feuilles de trois plantes médicinales locales *Globularia alypum L*, *Urtica pilulifera* et *Urtica dioica*, dont les activités antioxydantes sont évaluées par différentes méthodes à savoir : le test anti radicalaire, l'effet scavenging du radical cationique ABTS⁺ et la méthode utilisant le phosphomolybdate.

Le procédé d'extraction utilisé nous a permis de retenir trois extraits méthanoliques, le dosage des différents composés phénoliques montre que ces derniers sont riches en phénols totaux, flavonoïdes et flavonols, les concentrations de ces derniers dans les extraits analysés diffèrent d'une plante à une autre, les résultats ont révélé que *Globularia alypum L* est la plus riche en composés phénoliques suivi par *Urtica pilulifera* et *Urtica dioica*.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *Globularia alypum L*, *Urtica pilulifera* et *Urtica dioica* varie considérablement d'un extrait à un autre, elle est en fonction de la concentration et de la nature des composés phénoliques. Les résultats indiquent que *Globularia alypum L* a une très importante capacité antioxydante, utilisant le phosphomolybdate et elle présente une meilleure activité antiradicalaire contre le radical DPPH, et elle montre aussi une activité scavenger la plus élevée.

Ces résultats restent préliminaires, une suite de ce travail à l'avenir est souhaitable pour étudier les composants présents dans les extraits de *Globularia alypum L*, *Urtica pilulifera* et *Urtica dioica* et pour évaluer leurs activités antioxydantes. Comme perspectives, nous proposons:

- d'élargir l'échantillonnage et d'augmenter le nombre d'échantillons des plantes étudiés.
- d'isoler et de caractériser des composés actifs dans les différents extraits des plantes par des méthodes plus spécifiques.
- d'orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante des composés phénoliques en général et des flavonoïdes en particulier.
- d'élargir la gamme de germes cibles et la gamme des solvants utilisés pour l'extraction ainsi que leurs concentrations.

- [1]: **Hostettmann,K., Poterat,O & Wolfender,J-L:** The potential of higher plants as a source of drugs. *Chimia* 52:10-17. (1998).
- [2] **Hostettmann,K., Marston,A:**Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. *Phytochemistry reviews* 1: 275-285. (2002).
- [3]: **Boudjouref, M:** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. *Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister. En Biochimie,* Université Ferhat Abbes, Sétif. (2011). 99P.
- [4]: **Lutge, U., Kluge, M., Bauer, G :** Botanique 3ème Ed : Technique et documentation. *Lavoisier .Paris.* (2002). 211p.
- [5]: **Abderrazak M., et Joël R :** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris . (2007). 177p.
- [6]: **S,Djemai Zoughlache:** Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L, mémoire magister, Université -El Hadj Lakhder –Batna. (2008).
- [7]: **martin, S.et Andriantsitohaina, R:** Mécanisme de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de la cardiologie et d'angéiologie* 51 :304-315. (2006).
- [8]: **Knaggs, A.R:**The biosynthesis of shikimate metabolites.*Natural Product Reports,* 20 : 119–36. (2003).
- [9]: **Bruneton,J:** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (3èmeéd.).*Editions Tec & Doc Lavoisier.* (1999). p 1120.
- [10]: **Naczka, M., Shahidi, F:**Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography.* (2004).
- [11]: **Martin, S., Andriantsitohaina, R:** Mécanismes de la protection cardiaque etvasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie,* 51 : 304–315. (2002).
- [12]: **Bruneton, J:** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Editions Tec & Doc Lavoisier. (1999) 1120p.
- [13]: **Vermerris, W., Nicholson, R:** Phenolic compound biochemistry Springer. The Netherlands. (2006).
- [14]: **Macheix, J.J., Fleriet, A et Christian, A:** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de metabolites secondaire d'importance économique. PPTUR Lausanne. (2005).

- [15]: **Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., et Sapirstein, H.D:** Phenolic content and antioxydants Activity of Pearled wheat and Roller-Milled. Fractions. *Cereal chem.*82 (4), Pp 390-393. (2005).
- [16]: **Richter G:** Les composés phénoliques des végétaux. Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie. Gayon Dunod, paris, pp. 317-339. (1993).
- [17]: **soobratte, M.A.;Neergheen, V.S.;Luximon-Ramma, A.; Aruoma, O.I. et Bahorum, T:** Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents : Mechanism and action. *Mutation Research* 579:200-213. (2005).
- [18]: **Guignarg J.L:** Les métabolites secondaires. *Biochimie Végétal.* Dunod, Paris. (2000). 281p.
- [19]: **Macheix, J.J., Fleuriet, F. & Jay-Allemand, C:** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques.* (2005). p 134.
- [20] : **CHANFORAN, C:** Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'AVIGNON et des PAYS de VAUCLUSE. (2010).
- [21] : **Ghedira, K:** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3(4): 162-169. (2005).
- [22]: **Tapas, A. R., Sakarkar, D. M. & Kakde, R. B:**Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7 (3): 1089-1099. (2008).
- [23]: **D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R. Giovannini, C. & Masella, R :** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità* 43(4): 348-361. (2007).
- [24]: **Sadasivam, S. & Thayumanavan, B:** Molecular host plant resistance to pests. Volume 96 de Books in soils, plants and the environment. *CRC Press.* (2003). p221.
- [25]: **Fraga, C. G:** Plant phenolics and human health : Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. *John Wiley & Sons Edition,* pp 5-13. (2009).
- [26] : **Portet, B:** Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE. (2007).

- [27]: **Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L. & Crozier, A:** Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients* 2: 820-833. (2010).
- [28]: **BOUHEROUM, M:** Etude phytochimique des plantes médicinales Algériennes : *Rhantherium adpressum et Ononis angustissima*. Thèse de Doctorat : Université MENTOURI de CONSTANTINE-ALGERIE. (2007).
- [29]: **Kong, J.-M., Chia, L.-S., Goh, N.-K., Chia, T.-F. & Brouillard, R:** Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64: 923–933. (2003).
- [30]: **Kerio, L. C., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K. & Rotich, M. K:** Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification. *Food Chemistry*. 131, 31–38. (2012).
- [31]: **Shipp, J. & Abdel-Aal, El-S, M:** Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal* 4 :7-22. (2010).
- [32]: **Touafe. O:** Étude phytochimique des plantes médicinales du nord et du sud Algériens .*Thèse Doctorat*. Université Mentouri. Constantine. (2010).
- [33]: **Kone. D:** enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes, extraction, identification d'alcaloïdes, caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. *Thèse doctorat chimie organique*. Université de Bamako. (2008-2009).
- [34]: **Belguidoum, M:** Une approche phytochimique pour différencier deux espèces de genre *Zygophyllum*. *Mémoire master académique*. Université kasdi merbah ouargla. (2011-2012).
- [35]: **Midoun.T:** extraction des composés phénoliques et étude leur activité antioxydant par le comportement électrochimique. *Mémoire fin d'étude*. Université kasdi merbah ouargla. (2010/2011).
- [36]: **Roux, D. & Catier, O:** Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. *Wolters Kluwer France Edition*. (2007) p74.
- [37]: **Pénicaud, C:** Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. *Thèse de Doctorat* : Université de MONTPELLIER II. (2009).

- [38] : **Jarrige, R. & Ruckebusch, Y:** Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion. *Editions Quae. (1995).* p 57.
- [39] :**Collin, S. & Crouzet, J:** Agence universitaire de la francophonie. Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. *Edition Lavoisier. (2011).* p 13.
- [40]: **Wollgast, J. & Anklam, E:** Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33: 423 - 447. **(2000).**
- [41]: **Dykes, L. & Rooney, L. W:**Sorghum and millet phenols and antioxidants. *Journal of cereal Sciences* 44:236 - 241. **(2006).**
- [42] : **NKHILI, Ez-Z:** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Intéractions avec les ions du fer et du cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. *Thèse de Doctorat : Université de Cadi ayyad – Marrakech. (2009).*
- [43] : **Rabasso, N:** Chimie organique : Généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques, *Edition De Boeck Supérieur. (2006).* p 79.
- [44] : **Favier, A:** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité clinique.* 108-155. **(2003).**
- [45] : **Chaabi, M:** Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia steclada* Bail. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae).*Thèse de doctorat,* Université de Mentouri de constantine et université de louis Pasteur.**(2008).** 250p.
- [46] : **Pelli, K., Lyly, M:** Les antioxydants dans l'alimentation. VTT Biotechnology. Finlande pp 5-28. **(2003).**
- [47] : **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O:** Mécanisme physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme* 16 :233-239. **(2002).**
- [48] : **Barouki, R:** Stress oxydant et vieillissement. *Médecine science* 22 :266-272. **(2006).**

- [49] : **Favier, A**: Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité clinique*. 108-155. (2003).
- [50] : **Robert, F., Beern, K., Garrau, J.M., Gueriot, J.F., Robert, R., Brack, M. and Garrel C**: Evaluation et correction du stress oxydatif du porcelet en post- sevrage. *Journées Recherche Porcine* 41 : 173-178. (2009).
- [51]: **Midoun,T** : Extraction des composés phénoliques et étude leur activité antioxydant par le comportement électrochimique. Mémoire fin d'étude université kasdi merbah ouargla. (2011).
- [52]: **Scalbert,A** : Les polyphénols : intérêt nutritionnel Laboratoire des Maladies Métaboliques et Micronutriments Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix INRA Saint-Genes-Champanelle France.
- [53]: **NKHILI, E**: Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. *Thèse Doctorat*. Université CadiAyyad. Faculté Des Sciences Semlalia Marrakech. (2009).
- [54]: **Jacques, B, and André R**: Biochimie métabolique Ed ellipses .Paris. pp: 217-219-220-223-225. (2004).
- [55]: **Gutteridge J.M**: Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun*. 19: 141-158. (1993).
- [56] : **Koechlin-Ramonatxo, C**: Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* 20:165–177. (2006).
- [57]: **Al-Mamun, M., Yamaki, K., Masumizu, T., Nakai, Y., Saito, K., Sano, H. & Tamura, Y**:Superoxide anion radical scavenging activities of herbs and pastures in northern japan determined using electron spin resonance spectrometry. *Int. J. Biol. Sci.* 3 :349-355. (2007).
- [58] : **Jadot, G** : Antioxydants et vieillissement, *Edition John Libbey Eurotext*. (1994). p 35.
- [59] : **Karp, G** : Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and experiments. *Edition De Boeck Supérieur*. (2010). p 35.

- [60] : **Lacolley, P**: Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux. *Edition John Libbey Eurotext*. (2007). p 312.
- [61] : **Moussard, C**: Biochimie structurale et métabolique, *Edition De Boeck Supérieur*, p 336. (2006).
- [62] : **Beaudeux, J.-L., Delattre, J., Therond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Legrand, A. & Peynet, J** : Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 21: 144–150. (2006).
- [63]: **Kirsh, M. & De Groot, H**: Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen. *Journal of Biological Chemistry* 277(16) :13379-13388. (2002).
- [64]: **M^{me} K, BOUHADJRA épouse FODIL** : Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, *soutenance de magiste*, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. (2011).
- [65] : **Z.Hellal**: Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). *Mémoire de Magister*, Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. (2011).
- [66]: **Ben Slimane. M. et Bourasse. M, T**: contribution a l'étude de l'activité antioxydant de la plante acaia arabica. *Ingénieur d'état*. Université kasdi-merbah Ouargla. (2010).
- [67] : **Mekhibi, ala eddine & Boudria, H**: contribution a l'etude des extraits bruts de la plante *urtica dioica*. *Master académique*. universite kasdi marbah ouargla. (2013).
- [68]: **Maamri. S**: étude de pastacia atlantica de deux régions de sud algérienne dosages des lipides. Dosages des polyphénols, essais antileishmaniens .université de m'hamed Bougera Boumerdes. (2008).
- [69]: **Amrani, R**: étude comparative des composés phénoliques et du pouvoir: antioxydant de quelque variétés de dattes d'Algérie, *master académique*, Université de Ouargla. (2012).
- [70]: **HIMED, L**: Evaluation de l'activité antioxydant des huiles essentielles de Citruslimon: application à la margarine. *Mémoire magister*. Université mentouri Constantine. (2011) .
- [71] : **Bouhadjra, K**: étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. *Thèse pour l'obtention du diplôme de magister*. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. (2011).

- [72] : **Francine, Draghi**: l'ortie dioïque (*Urtica dioica* L.) : étude bibliographique. *Thèse docteur en pharmacie*. Université Henri Poincaré Nancy 1. (2005). 89P.
- [73] : **MEKHIBI, A., BOUDRIA, H**: Contribution a l'étude des extraits bruts de la plante *urtica dioica*. *Mémoire master académique*, Université kasdi marbah ouargla. (2013).
- [74]:**Daoudi, A., Sabiri, M., Bammou, M., Zair, T., Ibijbijen, J., et Nassiri, L**: Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica*: *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poiret et *Urtica pilulifera* L. *Journal of Applied Biosciences*. 87:8094– 8104. (2015).
- [75]:**Ziyyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Dassouli, A., Serhrouchni, M., benjelloun, W**: Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco, *J Ethnopharmacoi* 58:45-54. (1997) .
- [76] : **Taleb-Dda, N**: Effet d'un extrait de *Gloularia Alypum* sur la glycémie, transport des lipides, peroxydation lipidique et statut antioxydant, chez le rat soumis à un régime enrichi en fructose. Université d'Oran. (2012).
- [77]: **Luque de Castro, M.D., Priego-Capote, F**: Soxhlet extraction: Past and *present panacea*. *Journal of Chromatography A*, 1217: 2383–2389. (2010).
- [78]: **Luque de Castro, M.D. GarcõÂa-Ayuso, L.E**: Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369: 1±10. (1998).
- [79]: **Mandana Bimakra, Russly Abdul Rahmana,b, Farah Saleena Taipa, Ali Ganjloob, Liza Md Salleha,d, Jinap Selamatc, Azizah Hamidc, I.S.M. Zaidul**: Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *food and bioproducts processing* 89 : 67–72. (2011).
- [80]: **Estrella Aspé, Katherina Fernández**: The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Industrial Crops and Products*. 34: 838– 844. (2011).
- [81]: **MUANDA, F. N**: Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. *Thèse de Doctorat* : Université PAUL VERLAINE-METZ. (2010).
- [82]:**Cicco N., Lanorte M.T., Paraggio M., Viggiano M. and Lattanzio V**: A reproducible, rapid and inexpensive Folin- Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* 91:107-110. (2009).

- [83]:Naithani V., Nair S. and Kakkar P: Decline in antioxidant capacity of Indian herbal teas during storage and its relation to phenolic content. *Food Research International* 39:176-181. (2006).
- [84]:Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. and Vidal N: Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compound. *Food Chemistry* 97 :654-660. (2006).
- [85] :Ribéreau Gayon, P : Notion générale sur les composés phénoliques. *In Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod. 1-27. (1968).
- [86]:Adedapo A. A., Jimoh F. O., Afolayan A. J. and Masika P. J: Antioxidant activities and phenolic contents of the methanol extracts of the stems of *Acokanthera oppositifolia* and *Adenia gummifera*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 54 : 1-7. (2008).
- [87]:Chaabi M : Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia steclada* Bail. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae).Thèse de doctorat, Université de Mentouri de constantine et université de Louis Pasteur. (2008). 250p.
- [88]:Popovici C., Saykova I. and Tylkowski B: Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réaction avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 4: 25-39. (2009).
- [89]: Liviu AL M., Dezmirean D., Adela M., Otilia B., Laslo L. and Bogdanov (2009):Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry* 112: 863-867.
- [90]:Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26:1231-1237. (1999).
- [91]:Veepeur V., Prabhakar K.R., Parihar V. K., Kandadi M.R., Ramakrishana S., Mishra B., Satish Rao B.S., Srinivasan K.K., Priyadarsini K.I. and unnikrishnan M.K: *Ficus racemosa* Stem Bark Extract a potent antioxidant and a probable natural radioprotector. *eCAM*, 1-8. (2007).
- [92]: Ramalakshmi K., Rahath Kurbra I. and Jagan Mohan Rao L: Antioxidant potential of low- grade coffee beans. *Food Research International* 41: 96-103. (2008).

- [93]: **Abdel-Hameed E.S**: Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry* 114:1271-1277. (2009).
- [94]: **L, Arkoub** : Activité biologique *in vitro* des extraits de *Faxinus angustifolia* contre les radicaux ABTS⁺, O₂⁻ et NO et caractérisation des fractions actives. *Magister en biologie*, Université Abderrahmane MIRA de Bejaia. (2011).108 P.
- [95]: **Vuorela S** : Analysis, isolation, and bioactivities of rapeseed phenolic. *Helsinki*. (2005).
- [96]: **Khelifi, D., Hamdi, M., El Hayouni, A., Cazaux,S., Souchard, J.P., Couderc, F. and Bouajila, J** : Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) Leaves. *Molecules* 16 :10592-10603. (2011).
- [97]: **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., N. Vidal, N., Lesgards, JF., Stocker, P**: Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *Eur Food Res Technol.* 224: 801–809. (2007).
- [98]: **Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., et Yousefzadi M**: Essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. *Food chemistry.*, 110 : 927-931.(2008).
- [99]:**Miliauskas. G., Venskutonis P.R., et Van Beek T.A**: Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extract. *Food chemistry.* 85: 231-237. (2004).
- [100]: **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., et Lee C.Y**: Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry.* 51 : 7292-7295. (2003).
- [101]:**Morais M., Moreira L., Feàs X. and Estevinho L. M**: Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology* 10:1-6. (2011).
- [102]:**Màrghitas L.A., Stanciu O.G., Dezmirean D.S., Bobis O., Popesar O., Bogdanov S. and Campos M.G**: In vitro antioxidant of honey bee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food chemistry* 115 :878-883. (2009).
- [103]:**Popovici C., Saykova I. and Tylkowski B** : Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réaction avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* 4 :25-39. (2009).

[104]:Mohammedi Z : Etude du pouvoir Antimicrobien et antioxydant des Huiles essentielles et flavonoides de quelques plantes de la région de tlemcen. *Mémoire de magistère*, Université Aboubaker Belkaid de Tlemcen. (2006).105p.

[105]: Es-Safi,N-E., Kollmanna,A., Khlifc,S., Ducrota,P,H: Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. structure–activity relationship. *LWT* 40:1246–1252. (2007).

Les courbes d'étalonnages :

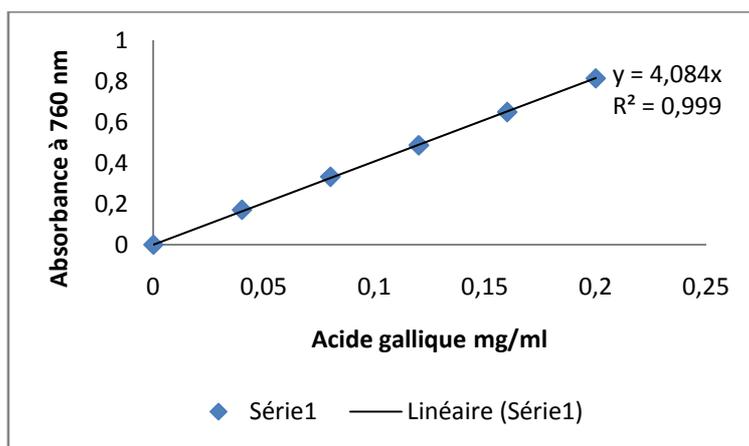


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des polyphénols.

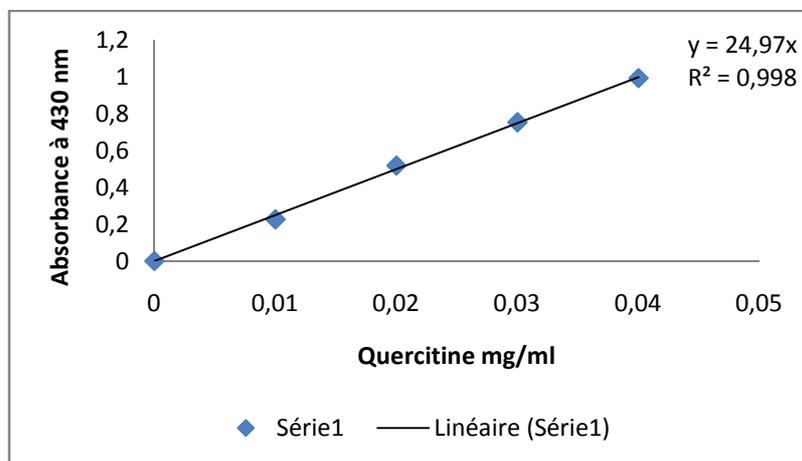


Figure 2 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.

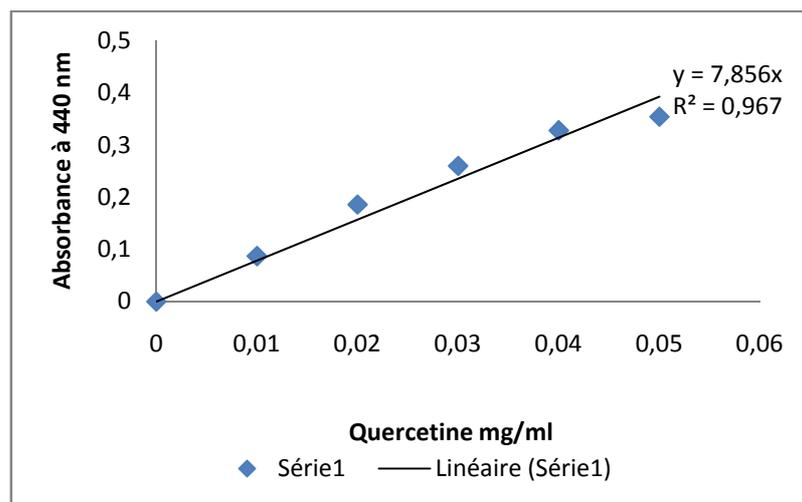


Figure 3 : Courbe d'étalonnage des flavonols.

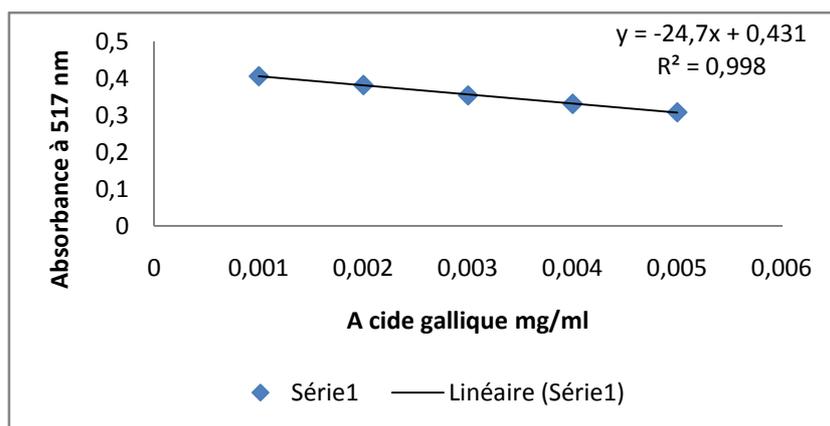


Figure 4 : Activité antiradicalaire avec le DPPH en fonction de l'acide gallique.

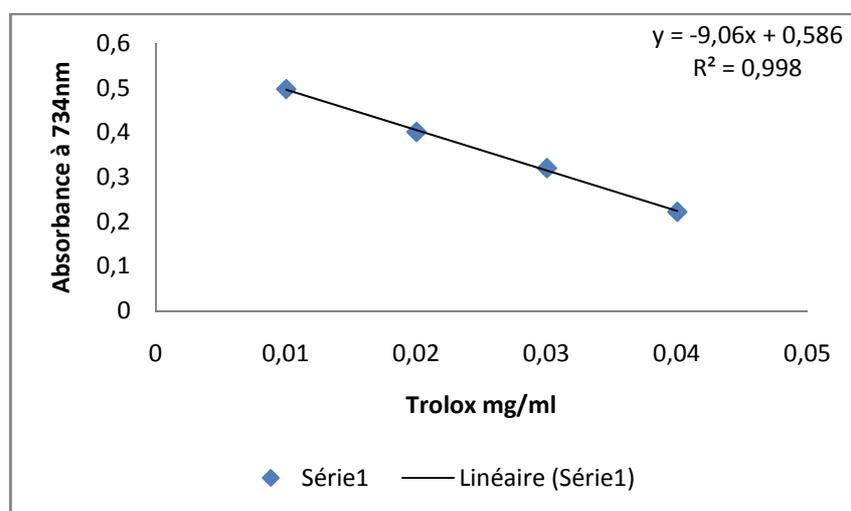


Figure 5 : Activité scavenging du radical ABTS⁺ en fonction de trolox.

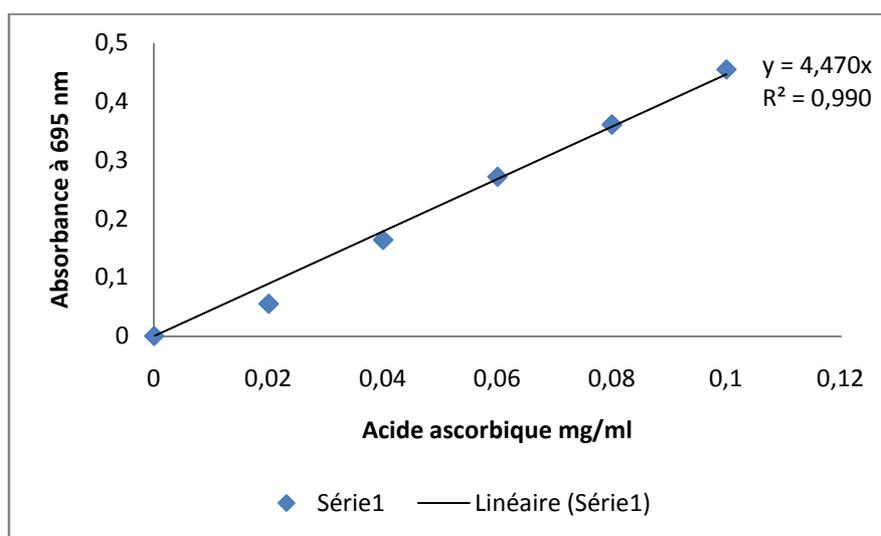


Figure 6 : Activité antioxydante « phosphomolybdate » en fonction de l'acide ascorbique.

Résultats :**I. Résultats du dosage des phénols totaux:****Tableau I :** Les résultats des absorbances des trois plantes :

	F _{dilution}	Abs		
<i>Urtica dioica</i>	1/10	0,587	0,592	0,652
<i>Urtica pilulifera</i>	1/10	0,803	0,832	0,874
<i>Globularia alypum</i>	1/25	0,923	0,999	0,980

Tableau II : Les concentrations en phénols totaux dans les trois plantes :

	C (mg EAG 100 g ⁻¹).			C _{moyenne}
<i>Urtica dioica</i>	35,93	36,23	39,91	37,35
<i>Urtica pilulifera</i>	49,15	50,03	53,15	51,19
<i>Globularia alypum</i>	141,25	152,88	149,97	148,03

F_{dilution} : facteur de dilution, C : la concentration.

II. Résultats du dosage des flavonoïdes :**Tableau I :** Les résultats des absorbances des trois plantes :

	F _{dilution}	Abs		
<i>Urtica dioica</i>	1/25	0,667	0,668	0,663
<i>Urtica pilulifera</i>	1/25	0,846	0,841	0,840
<i>Globularia alypum</i>	1/50	0,780	0,784	0,786

Tableau II : Les concentrations en flavonoïdes dans les trois plantes :

	C (mg EQ/100g).			C _{moyenne}
<i>Urtica dioica</i>	16,69	16,72	16,59	16,66
<i>Urtica pilulifera</i>	21,17	21,05	21,02	21,08
<i>Globularia alypum</i>	39,04	39,24	39,34	39,21

III. Résultats du dosage des flavonols :**Tableau I :** Les résultats des absorbances des trois plantes :

	F _{dilution}	Abs		
<i>Urtica dioica</i>	1/25	0,175	0,169	0,165
<i>Urtica pilulifera</i>	1/25	0,247	0,240	0,236
<i>Globularia alypum</i>	1/50	0,154	0,149	0,138

Tableau II : Les concentrations en flavonols dans les trois plantes :

	C (mg EQ/100g).			C _{moyenne}
<i>Urtica dioica</i>	13,92	13,44	13,12	13,49
<i>Urtica pilulifera</i>	19,65	19,09	18,77	19,17
<i>Globularia alypum</i>	24,50	23,70	21,95	23,38

IV. Résultats de l'activité anti-radicalaire :

Tableau I : Les résultats des absorbances des trois plantes :

	F _{dilution}	Abs		
<i>Urtica dioica</i>	1/25	0,422	0,413	0,401
<i>Urtica pilulifera</i>	1/25	0,380	0,373	0,365
<i>Globularia alypum</i>	1/100	0,375	0,372	0,370

Tableau II : L'activité anti-radicalaire des extraits des feuilles des trois plantes :

	C (mg EAG/100g).			C _{moyenne}
<i>Urtica dioica</i>	0,227	0,455	0,759	0,477
<i>Urtica pilulifera</i>	1,290	1,467	1,670	0,475
<i>Globularia alypum</i>	5,668	5,971	6,17	5,936

V. Résultats de l'activité scavenger du radical ABTS⁺:

Tableau I : Les résultats des absorbances des trois plantes :

	F _{dilution}	Abs		
<i>Urtica dioica</i>	1/25	0,320	0,321	0,344
<i>Urtica pilulifera</i>	1/25	0,248	0,225	0,222
<i>Globularia alypum</i>	1/100	0,239	0,186	0,188

Tableau II : L'activité scavenger du radical ABTS⁺ des extraits des des extraits des feuilles des trois plantes :

	C (mg ET/100g).			C _{moyenne}
<i>Urtica dioica</i>	18,349	18,280	16,694	17,774
<i>Urtica pilulifera</i>	23,316	24,903	25,110	24,443
<i>Globularia alypum</i>	95,750	110,375	109,823	105,316

VI. Résultats de l'activité antioxydante utilisant le phosphomolybdate :

Tableau I : Les résultats des absorbances des trois plantes :

	F _{dilution}	Abs		
<i>Urtica dioica</i>	1/25	0,442	0,490	0,644
<i>Urtica pilulifera</i>	1/25	0,565	0,508	0,605
<i>Globularia alypum</i>	1/100	0,543	0,478	0,463

Tableau II : L'activité antioxydante en utilisant le phosphomolybdate des extraits des feuilles des trois plantes :

	C (mg EAA/100g).			C _{moyenne}
<i>Urtica dioica</i>	61,800	68,512	90,044	90,044
<i>Urtica pilulifera</i>	78,998	71,029	84,591	78,206
<i>Globularia alypum</i>	303,69	267,337	258,948	276,658

Résumé :

Les plantes médicinales présentent une source importante de différents antioxydants qui peuvent inhiber les effets néfastes des radicaux libres sur l'organisme humain. La présente étude est entreprise dans le but d'évaluer la propriété antioxydante des extraits des feuilles des *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, et *Globularia alypum L*. L'extrait méthanolique des feuilles de l'espèce *Globularia alypum L* obtenu par la méthode d'extraction soxhlet est le plus riche en phénols totaux (148,03 mg EAG/100g d'échantillon), en flavonoïdes (39,21 mg EQ/100g d'échantillon) et en flavonols (23,38 mg EQ/100g) suivi de l'extrait méthanolique de *Urtica pilulifera* et *Urtica dioica*. Tous les extraits ont révélé une activité anti-radicalaire contre le radical libre DPPH dont les valeurs sont : *Globularia alypum L* (5,93 mg EAG/100g) *Urtica pilulifera* (1,47 mg EAG/100g) et *Urtica dioica* (0,47mg EAG/100g), et l'effet scavenging du radical ABTS⁺ le plus élevé est enregistré au niveau de l'extrait des feuilles de *Globularia alypum L* avec une valeur de 105,82 mg ET/100g, la meilleure activité antioxydante au phosphomolybdate est enregistré au niveau de l'extrait de *Globularia alypum L* avec une valeur de 276,65 mg EAA/100g d'extrait, et la plus faible est de 73,45mg EAA/100g d'extrait enregistré au niveau de l'extrait des feuilles de *Urtica dioica*.

Mots clés : *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera*, et *Globularia alypum L*, polyphénols, soxhlet, activité antioxydante.

Summary:

Medicinal plants present an important source of various antioxidants that can inhibit the harmful effects of free radicals on the human body. This study was undertaken to evaluate the antioxidant property of extracts from *Urtica dioica* leaves, *Urtica pilulifera* and *Globularia alypum L*. The methanolic extract of the leaves of the species *Globularia alypum L* obtained by the Soxhlet extraction method is the richest in total phenols (148.03 mg EAG / 100 g sample), flavonoids (39.21 mg EQ / 100 g sample) and flavonols (23.38 mg EQ / 100g) followed the methanolic extract of *Urtica pilulifera* and *Urtica dioica*.

All extracts showed anti-radical activity against the free radical DPPH whose values are: *Globularia alypum L* (5.93 mg EAG / 100g), *Urtica pilulifera* (1.47 mg EAG / 100g), *Urtica dioica* and (0,47mg EAG / 100g) and the scavenging effect of the radical ABTS⁺ is the highest recorded in the extract from the leaves of *Globularia alypum L* with a value of (105.82 mg AND / 100g), the best antioxidant activity by Phosphomolybdate is recorded at the extract *Globularia alypum L* with a value of (276.65 mg EAA / 100 g of extract), and the lowest is (73,45mg EAA / 100g extract) registered at extract of *Urtica dioica* leaf.

Keywords: *Urtica dioica*, *Urtica pilulifera* and *Globularia alypum L*, polyphenols, soxhlet, antioxidant activity.