

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



Université Abderrahmane Mira-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
Spécialité : Génie pharmaceutique

Thème

Extraction et analyses physico-chimiques des principes actifs de la plante *Rubus Fruticosus L* et l'étude de leurs activités biologiques



soutenu le 29/09/2020

Réalisé par

RAHMANI Nadine

TIGHIDET Sara

Membres de jury

Président : Mr Fatmi Sofiane

Examineur : Mr Rezgui Farouk

Encadreur : Mme BELHADJ Nadra

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciements

Nous tenons avant tout à remercier le miséricordieux tout puissant, car sans son aide et sa bienveillance, rien de cela n'aura pu être réalisé.

Nous tenons aussi, à exprimer nos remerciements, à notre promotrice Mme BELHADJ.N, pour avoir accepté de nous guider tout au long de ce travail, pour ses précieux conseils, et surtout pour son soutien qui nous a permis l'accomplissement de ce travail.

Merci pour l'ensemble des membres de jury de nous avoir fait l'honneur d'examiner et évaluer notre travail et de faire partie de notre jury.

Nous tenons aussi à remercier toute personne qui nous a aidé à réaliser ce modeste travail.

Dédicaces

A la mémoire de mon cher père qui nous a quitté trop tôt.

A ma chère mère à qui je dois ma réussite,

*Nulle expression ne saurait exprimer ma reconnaissance et
ma gratitude envers toi.*

Puisse dieu le tout puissant t'accorder longue vie

Et bonne santé.

A mon cher frère Amine ;

A ma chère famille ;

A mes ami(e)s ;

A mon amie et binôme ;

A tous ceux qui me sont chers.

Sara

Dédicaces

A celui qui m'a donné vie, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes mes années d'études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner aide et protection, mon soutien moral et ma source de joie et de bonheur, MON PERE.

A la lumière de mes jours, le symbole de tendresse, la source de mes efforts, la flamme de mon espoir et de ma réussite, MA MERE que j'adore.

A la mémoire de mon grand père, ton départ m'a beaucoup affecté

A mes frères : Imad, Ilyas, Samy

A ma sœurs : Yasmine

A mes grands-parents

A mes chers cousines

A mon binôme Sara

A tous mes amis(es), ils se reconnaîtront sans que je les cite.

A toute ma famille du plus petits au plus grands

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou loin pour que ce projet soit possible.

Nadine

Liste des figures

Figure I.1 : La plante du <i>Rubus fruticosus L</i>	6
Figure I.2 : Aspect general <i>Rubus fruticosus L</i>	8
Figure I.3 : Aire de répartition mondiale de <i>Rubus fruticosus L</i>	9
Figure I.4 : Structures des acides hydroxybenzoïques (a) et hydroxycinnamiques (b).....	13
Figure I.5 : Structure de base des flavonoïdes.....	14
Figure I.6 : Structure des principales classes de flavonoïdes.....	14
Figure I.7 : Structure des tannins hydrolysables et des acides associés.....	15
Figure I.8 : Structure chimiques de l'acide gallique.....	16
Figure I.9 : Structures de tannins condensés.....	17
Figure I.10 : Exemple d'un sirop.....	20
Figure I.11 : Flacon de sirop de Rubus Fritucosus G37.....	21
Figure I.12 : Flacon de sirop de Rubus Fritucosus BIO 60 ml.....	22
Figure I.13 : Sirop à base du <i>Rubus Fritucosus</i>	23
Figure I.14 : les gouttes d'homeopathie Boiron Rubus Fruticosus J. Pousses.....	24
Figure I.15 : Ronce (<i>Rubus Fruticosus</i>) bourgeon BIO 30ml.....	25
Figure II.1 : La plante <i>Rubus fruticosus L</i>	26
Figure II.2 : Site de collecte de la plante <i>Rubus fruticosus L</i>	26
Figure II.3 : Echantillon végétal des feuilles du <i>Rubus Fruticosus L</i>	27
Figure II.4 Extraction par décoction des composés phénoliques des feuilles fraîches de <i>Rubus Fruticosus L</i>	28
Figure II.5 : Extrait par décoction des composés phénoliques des feuilles fraîches de <i>Rubus Fruticosus L</i>	29
Figure II.6 : Extraction par macération des composés phénoliques des feuilles fraîches de <i>Rubus Fruticosus L</i>	30.
Figure II.7 : Extrait par décoction des composés phénoliques des feuilles fraîches de <i>Rubus Fruticosus L</i> (macérât).....	30
Figure II.8 : extraction liquide/liquide des extraits obtenus par les trois methodes d'extraction des feuilles du <i>Rubus fruticosus L</i>	32
Figure II.9 : Extraction des tanins totaux par le traitement en acétate d'éthyle.....	32
Figure II.10 : montage de l'appareil HPLC.....	35

Figure II.11 : appareil de l'Infra Rouge- shimadzu.....	38
Figure II.12 : appareil de l'UV visible-spectro scan 50-.....	39
Figure II.13 : Forme radicalaire et réduite du DPPH.....	42
Figure II.14 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH).....	44
Figure III.1 : Profil chromatographique des extraits de <i>Rubus fruticosus L.</i> (Annexes II)	
Figure III.2 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique (Annexes II)	
Figure III.3 : Droite d'étalonnage de la quercetine (Annexes II)	
Figure III.4 : Droite d'étalonnage de la catechine (Annexes II)	
Figure III.5 : Forme réduite du radical DPPH.....	54
Figure III.6 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique. (Moyenne \pm SD de trois essais)...	56
Figure III.7 : Histogramme comparatif de la capacité antioxydante totale des deux extraits lors de développement de la concentration. (Moyenne \pm SD de trois essais).....	56

Liste des tableaux

Tableau I.1 : La classification des polyphénols.....	11
Tableau II.1 : Les réactifs et leurs propriétés. (Annexes I)	
Tableau II.2 : Les différentes réactions utilisées pour la caractérisation par coloration.....	33
Tableau III.1 : valeurs des rendements obtenues par différentes méthodes d'extraction.....	47
Tableau III.2 : résultats des tests de caractérisation par coloration des tanins galliques et tanins condensés.....	48
Tableau III.3 : les rapports frontaux des métabolites secondaires dans l'extrait du <i>Rubus fruticosus L.</i>	49
Tableau III.4 : Composition phénolique des extraits de <i>Rubus fruticosus</i> identifiés par HPLC.....	51

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I :Aspect théorique de l'étude

I.1 La phytothérapie..... 3

I.1.1 Définition de la phytothérapie 3

I.1.2 Principe de la phytothérapie 4

I.1.3 Intérêt de la phytothérapie 4

I.1.4 exemples de plantes utilisées en phytothérapie 5

I.2. Etude botanique de la mûre sauvage (*Rubus fruticosus L.*) 5

I.2.1. Classification et appellation de la mûre sauvage (*Rubus Fruticosus L.*)..... 6

I.2.2 Description botanique de *Rubus Fruticosus L.*..... 7

I.2.3 Distribution mondiale de *Rubus Fruticosus L.* 8

I.2.4 La phytochimie du *Rubus fruticosus L.* 9

I.3 Les métabolites bioactives dans le *Rubus fruticosus L.*.....10

I.3.1 Les polyphénols.....10

I.3.1.1 Les acides phénoliques.....13

I.3.1.2 Les flavonoïdes.....13

I.3.1.3 Les tanins.....15

I.4 Propriété pharmacologique et usage thérapeutique traditionnel de *Rubus Fruticosus L.*.....17

I.5 L'activité anti-oxydante	18
I.5.1 Définition d'un antioxydant.....	18
I.5.2 Définition d'un radicale.....	18
I.6 Formes galéniques pour les médicaments à base de plantes médicinales	18
I.6.1 La forme galénique liquide.....	19
I.6.1.1 Le sirop.....	19
I.6.1.2 Les gouttes buvables.....	23

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1préparation du matériel végétal	26
II.2.Produits chimiques utilisés	27
II.3. Extraction des composés phénoliques	27
II.3.1. La décoction	27
II.3.2. Extraction par macération dans un mélange hydro-alcoolique eau/méthanol.....	29
II.3.3. Extraction par irradiation avec micro ondes dans un mélange hydro alcoolique eau/méthanol	31
II.4Extraction des tannins galliques et condensés de l'extrait des feuilles fraîches de <i>Rubus Fruticosus L.</i>	31
II.5.Caractérisation qualitative et quantitative des métabolites secondaires dans l'extrait des feuilles fraîches de <i>Rubus FruticosusL.</i>	33
II. 5.1 Caractérisations photochimiques par colorations et précipitations.....	33
II.5.2. Caractérisation par chromatographie.....	34
II.5.2.1Chromatographie sur couche mince CCM.....	34
II.5.2.2 Chromatographie liquide haute performance (pression) (HPLC).....	35
II.5.3 Caractérisation par les méthodes spectrophotométries Infra-Rouge(IR) et UV-Visible.....	37
II.5.3.1 Caractérisation par Infra-rouge(IR).....	37
II.5.3.2 Caractérisation par Ultraviolet –Visible (UV-Vis).....	38

II.6 Evaluation de l'effet anti-radicalaire des extraits de <i>Rubus Fruticosus</i> L.....	42
II.6.1. Le test de piégeage du radical DPPH.....	42
II.6.2. Dosage de la capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate ».....	43
II.6.3. Dosage du pouvoir réducteur « FRAP ».....	44
II.7 Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	45

Chapitre III :Résultats et discussions

III.1 Rendement d'extraction des polyphénols contenu dans le <i>Rubus Fritucosus</i> L.....	46
III.2 Caractérisation qualitative et quantitatives des métabolites secondaires dans l'extrait des feuilles fraiche de <i>Rubus Fruticosus</i> L.....	48
III.2.1. Caractérisation par les méthodes photochimiques (coloration et ou précipitations).....	48
III.2.2 Caractérisation par les méthodes chromatographiques.....	49
III.2.2.1 Caractérisation par Chromatographie sur couche mince CCM.....	49
III.2.2.2 Chromatographie liquide a haute performance (pression) HPLC.....	49
III.2.3 Caractérisation par les méthodes spectrophotométrique.....	52
III.2.3.1 Caractérisation par spectrométrie UV Visible.....	52
III.3 Evaluation de l'effet anti-radicalaire des extraits de <i>Rubus Fruticosus</i> L.....	53
III.3.1 Le test de piégeage du radical DPPH.....	54
III.3.2 Dosage de la capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate ».....	55
III.3.3 Dosage du pouvoir réducteur « FRAP »	57
III.4 Pouvoir antimicrobien des extraits des plantes.....	57
III.4.1 Etude qualitative.....	57
III.4.2 Concentrations Minimales Inhibitrices.....	58
Conclusion	60

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Introduction

Si la médecine par les plantes connaît un engouement extraordinaire à travers le monde, il est impossible de ne voir là qu'un phénomène de mode. Bien sûr, notre époque est profondément marquée par la recherche d'une vie plus saine, d'un retour à la nature, aux valeurs essentielles. **(Wichtl et Anton, 2003).**

La phytothérapie a existé depuis l'antiquité. Les plantes, par leur métabolisme secondaire, synthétisent des métabolites de nature variée où plusieurs études scientifiques ont démontré leurs effets bénéfiques sur plusieurs pathologies **(Katalinic et al., 2006).**

Le médicament à base de plantes est un "complexe" de molécules, issu d'une ou plusieurs espèces végétales. De nombreuses formes galéniques sont aujourd'hui proposées, certaines plus innovantes que d'autres. Malgré l'industrie pharmaceutique, les plantes ne furent jamais abandonnées. **(Wichtl et Anton, 2003).**

Pour mieux expliquer d'où provient l'effet thérapeutique, il faut procéder à une étude phytochimique. C'est une pratique basée sur les avancées scientifiques qui recherchent et identifient les extraits actifs des plantes et qui sont moins agressifs pour l'organisme. **(Verdrager, 1978 ; Fernandez, 2003)**

Dans le cadre de ce travail notre choix s'est porté sur une plante, très répandue dans la région de Bejaïa, la mère sauvage, qui est très utilisée comme plante médicinale pour ses propriétés anti-oxydantes, antibactériennes et antifongique. Cette plante vivace qui fait partie de la famille des *Rosaceae* de l'espèce *Rubus Fruticosus L.* possède de nombreuses vertus tel que les vitamines, les minéraux ainsi que des métabolites bioactifs qui lui confère son action thérapeutique.

Ce travail est présenté en trois chapitres. Le premier chapitre porte sur la phytothérapie, présentation de la plante et ses propriétés thérapeutiques, ainsi que les métabolites secondaires qu'elle contient.

Le deuxième chapitre est de l'ordre pratique, dans lequel est exposé le matériel les méthodes utilisés, à savoir :

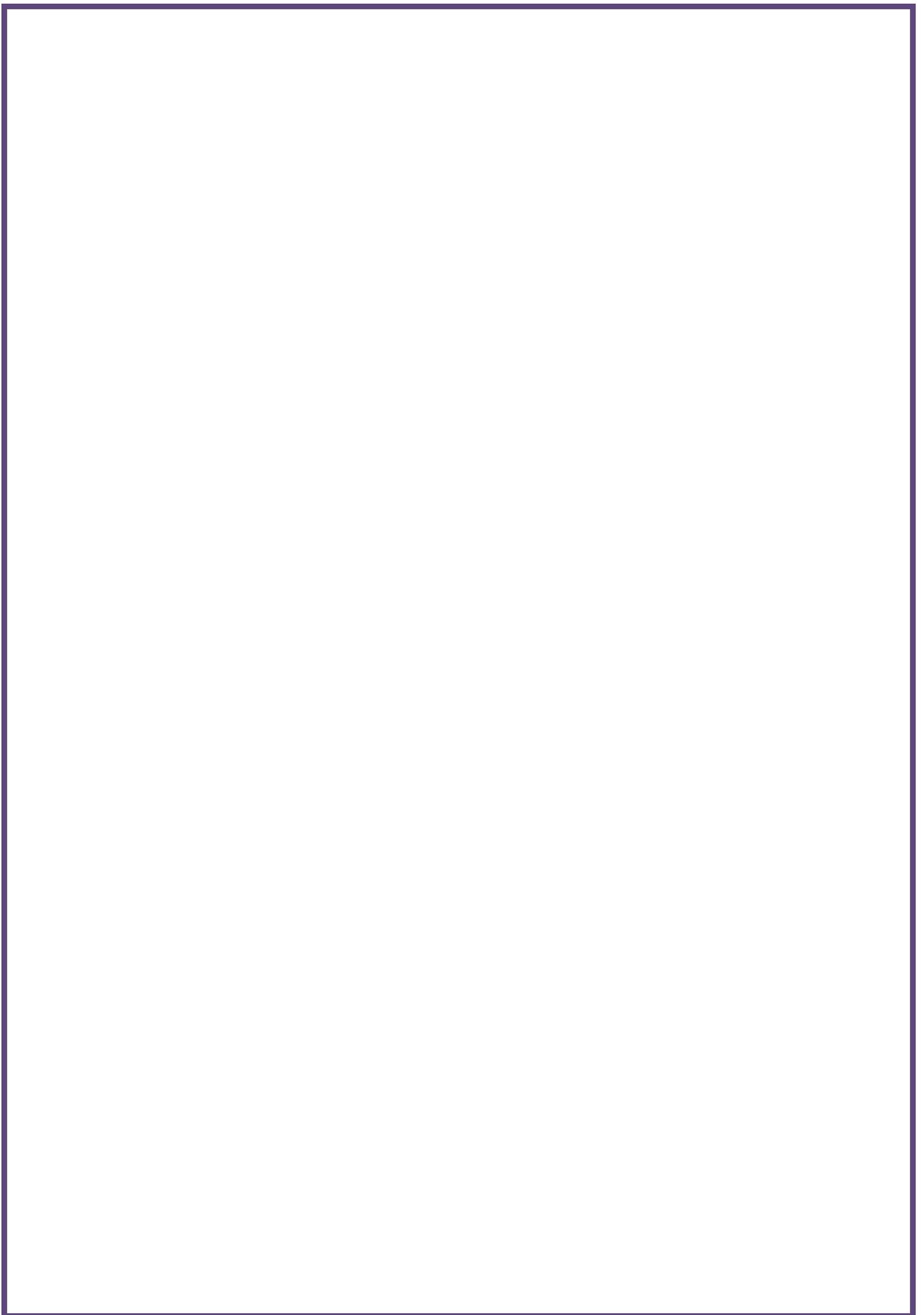
- ✓ L'extraction des métabolites secondaires de cette plante par décoction, macération et par micro-ondes
- ✓ Caractérisation des métabolites secondaires par les méthodes colorimétrique, spectrométriques et chromatographiques
- ✓ Evaluation de l'activité antioxydants et antibactérienne

Le troisième chapitre comporte la partie résultats et discussion, la discussion des résultats des travaux qui ont pu être réalisés au niveau du laboratoire avant l'état pandémique et la présentation et la discussion des résultats référencés issue des études antérieures sur des extraits de la même plante réalisée par d'autres chercheurs avec des conditions opératoires similaires et différentes des nôtres

Enfin une conclusion générale résumera essentiellement l'étude réalisée dans ce mémoire et des perspectives liées à notre travail.

Chapitre I

Aspect théorique de l'étude



La plante, organisme vivant, marque son identité par des spécificités morphologiques, à l'origine de la classification botanique, mais aussi biochimiques, liées à des voies de biosynthèses inédites, représentant l'intérêt de l'usage des plantes médicinales (**Bruneton, 1987**).

Dans le code de la Santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « une plante » est dite médicinale. Lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médical. C'est-à-dire qu'elles sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (**Moreau, 2003**).

Ce sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses. Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**).

Une plante médicinale est un végétal dont un des organes, par exemple la feuille ou l'écorce, possède des vertus curatives lorsqu'il est utilisé à un certain dosage et d'une manière précise (**Barka, 2017**).

I.1 La phytothérapie

I.1.1 Définition de la phytothérapie

La phytothérapie est le traitement par les plantes (**Bruneton, 1999**), c'est une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de végétaux, de parties de végétaux ou de préparations à base de végétaux, qu'elles soient consommées ou utilisées en voie externe (**Wichtl et Anton, 2003**).

Il est important de ne pas confondre cette discipline avec la phytopharmacie qui désigne l'ensemble des substances utilisées pour traiter les plantes, à savoir les pesticides, fongicides, herbicides, ou insecticides (**Prescrire, 2007**).

On distingue deux types de phytothérapies :

- **La phytothérapie traditionnelle** : C'est une thérapie de substitution qui a pour but de traiter les symptômes d'une affection. Ses origines peuvent parfois être très anciennes et elle se base sur l'utilisation de plantes selon les vertus découvertes empiriquement. Elles concernent notamment les pathologies saisonnières depuis les

troubles psychosomatiques légers jusqu'aux symptômes hépatobiliaires, en passant par les atteintes digestives ou dermatologiques (**Prescrire, 2007**).

- **La phytothérapie clinique** : C'est une approche globale du patient et de son environnement est nécessaire pour déterminer le traitement, ainsi qu'un examen clinique complet. Son mode d'action est basé sur un traitement à long terme agissant sur le système neuro-végétatif. Dans ce type les indications sont liées à une thérapeutique de complémentarité. Elles viennent compléter ou renforcer l'efficacité d'un traitement allopathique classique pour certaines pathologies (**Moreau, 2003**).

I.1.2 Principe de la phytothérapie

La phytothérapie repose sur l'utilisation de plantes médicinales à des fins thérapeutiques. En médecine classique, les fabricants pharmaceutiques extraient le principe actif des plantes pour en faire des médicaments.

La logique de traitement est également différente entre la médecine classique et la phytothérapie. La médecine moderne est substitutive, c'est-à-dire que les médicaments classiques régularisent les fonctions de l'organisme et le soulagent du besoin de s'auto guérir. En phytothérapie, les plantes sont également utilisées comme des médicaments pour réguler les fonctions du corps.

Selon les phytothérapeutes, une maladie ne survient pas par hasard. Elle est la conséquence d'un déséquilibre interne à l'organisme qui doit en permanence s'adapter à son environnement. La phytothérapie s'attache à analyser les systèmes constitutifs de l'organisme : systèmes neuroendocrinien, hormonal, immunitaire, système de drainage... (**Devoyer, 2012**).

I.1.3 Intérêt de la phytothérapie

La phytothérapie se pratique sous différentes formes et uniquement dans le cas de maladies « bénignes ». Bien sûr, bon nombre de symptômes nécessitent des antibiotiques ou autres traitements lourds. Dans d'autres cas, se soigner par les plantes représente une alternative reconnue par la médecine et dénuée de tout effet toxique pour l'organisme (**Berlencourt, 2008-2013**).

I.1.4 Exemples de plantes utilisées en phytothérapie

De nombreuses plantes sont utilisées depuis des siècles en phytothérapie, certaines d'entre elles ont été identifiées comme étant des plantes médicinales à effets thérapeutiques et leur efficacité a été approuvée suite à des études menées sur des parties de plantes ou des plantes en entier. A titre d'exemples :

- ✓ L'écorce de grenade ont des effets antioxydant et antibactérien (**Dies et Aggoune, 2019**).
- ✓ Feuilles de l'inule viscosse ont des effets hémostatique et antioxydant (**Anani et Belhadi, 2018**).
- ✓ Feuilles de l'ortie ont des effets antifongique et antibactérien (**Guelil, 2018**).
- ✓ Les racines du Carthamus ont des effets cicatrisant et antibactérien (**Halou et Bali, 2019**).
- ✓ Feuilles de l'olivier ont des effets antifongique et antibiotique (**Saadi et Saoudi, 2018**).

I.2. Etude botanique de la mûre sauvage (*Rubus fruticosus L.*)

La mûre sauvage est présente depuis l'Antiquité. Dans la Grèce Antique, sykamion (nom de la mûre en grec), était déjà utilisée à des fins thérapeutiques. En effet, les Grecs utilisaient le jus de mûre sauvage pour lutter contre la goutte et le mal de gorge.

Quant aux Celtes, ils la considéraient comme une plante sacrée, pourvue de pouvoirs médicaux et magiques.

La mûre sauvage favorisait la guérison et permettait de rester en bonne santé. Mais plus encore, elle attirait la richesse et la protection. Sans oublier les Amérindiens qui consomment la mûre sauvage depuis toujours.

Par ailleurs, dès le 1er siècle, Pline l'Ancien, Galien et Dioscoride utilisaient la mûre sauvage. Comme toutes les parties de la plante avaient un usage, on récoltait le fruit, les feuilles ou encore les racines.

Et ceux-ci soignaient de nombreux maux tels les ulcères, la toux, les plaies, et les fièvres. Plus tard, au 12ème siècle, Hildegarde de Bingen compléta la liste des traitements possibles.

Le nom *Rubus fruticosus* L (**Figure I.1**) (**Lim, 2012**) provient du latin *ruber* ; rouge en référence à la couleur des fruits avant leur complète maturité. *Frutex* signifie rejeton ou en forme d'arbrisseau. *Rubus fruticosus* L. est une plante appartenant à la famille des rosacées. Elle est communément connue sous le nom de Ronce commune, Mûrier sauvages, Blackberry en anglais et Tût el Ullayq en Algérie (**Lim, 2012**). Cette espèce est originaire d'Asie et d'Europe. C'est une plante spontanée qui se trouve dans les terrains incultes, le long des haies, clairières des bois, bords des chemins, lisière et coupe forestière (**Rameau et al., 2008**).



Figure I.1 : La plante de *Rubus fruticosus* L. (**Lim, 2012**)

I.2.1 Classification et appellation de la mûre sauvage (*Rubus Fruticosus* L.)

La position systématique de la Ronce est la suivante (**Bock 2013**) :

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta*

Super division : *Spermatophyta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Rosidae*

Ordre : *Rosales*

Famille : *Rosaceae*

Genre : *Rubus*

Espèce : *Rubus fruticosus* L.

Plusieurs noms vernaculaires sont attribués à cette plante (**Lim 2012**) :

- **Nom français:** Ronce commune, Ronce des bois, Ronce des haies, Ronce européenne, Mures sauvages;
- **Nom Anglais:** Blackberry;
- **Nom Arabe:** Tût el Ullayq;
- **Nom Kabyle:** Tizwal

I.2.2 Description botanique de *Rubus Fruticosus* L.

Sous-arbrisseaux vivaces, espèce caractérisée par des aiguillons arqués, très vulnérants, rougeâtres et recouverts de pruine (**Alioute, 2014**) (**Figure I.2**). Les feuilles : de forme convexes, vertes et glabrescentes en dessus, blanches-tomenteuses en dessous, à 5 folioles elliptique peu profondément dentées, nettement pétiolulées.

Les fleurs : sépales tomenteux, réfléchis. Pétales d'un rose vif, suborbiculaires, chiffonnées. Etamines égalant ou dépassant peu les styles roses. Le fruit : le fruit est composé de nombreuses drupéoles noires plutôt luisantes. La floraison : a lieu de juin à août.

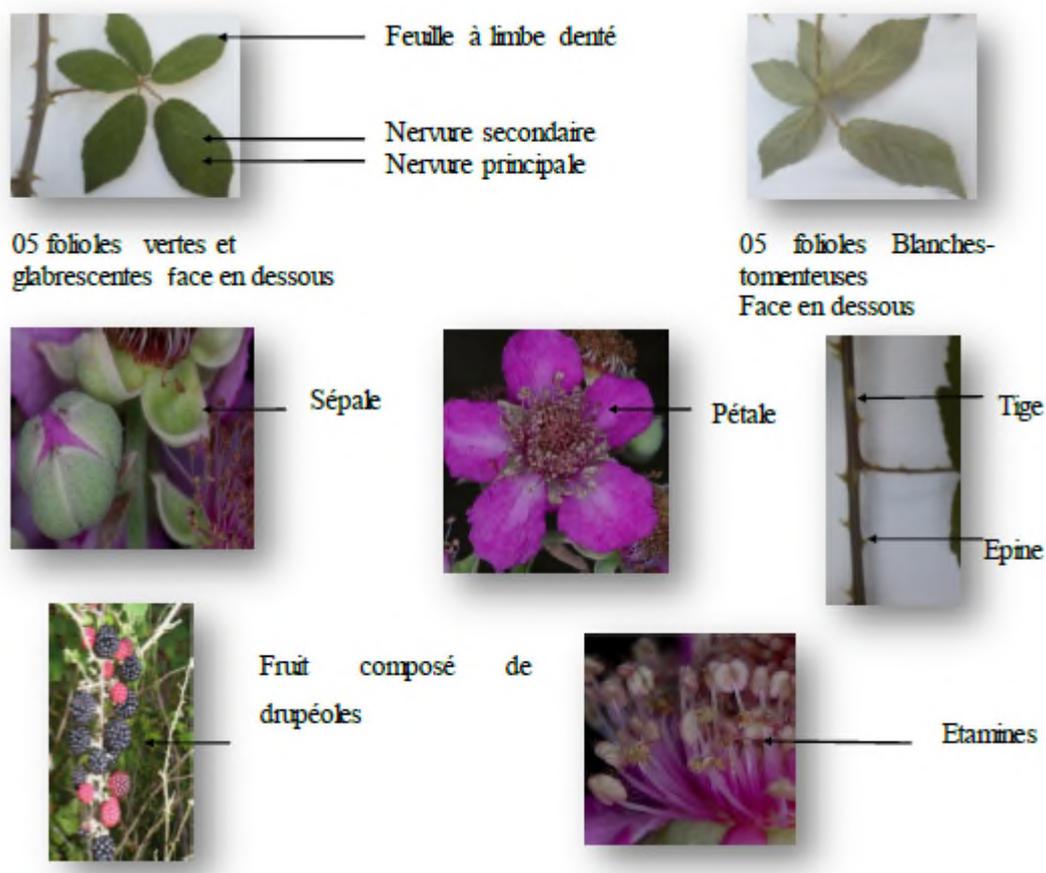


Figure I.2: Aspect général de *Rubus fruticosus L.* (Alioute, 2014).

I.2.3 Distribution mondiale de *Rubus Fruticosus L.*

La répartition de l'espèce *Rubus fruticosus L.* s'étend sur toute l'Europe, L'Afrique du Nord (Atlas), l'Afrique australe, le Sud-Est de l'Australie, la Nouvelle-Zélande, les Etats-Unis et le Chili. La ronce est également présente plus près de l'Equateur, mais à des altitudes plus élevées (on trouve jusqu'à plus de 2 000 m d'altitude) (Figure I.3) (Wehrlen, 1985).

En Algérie, elle se trouve dans les régions côtières méditerranéennes comme Béjaïa en la retrouve aussi dans les hauts palataux comme Constantine, Tizi ousou, ..).

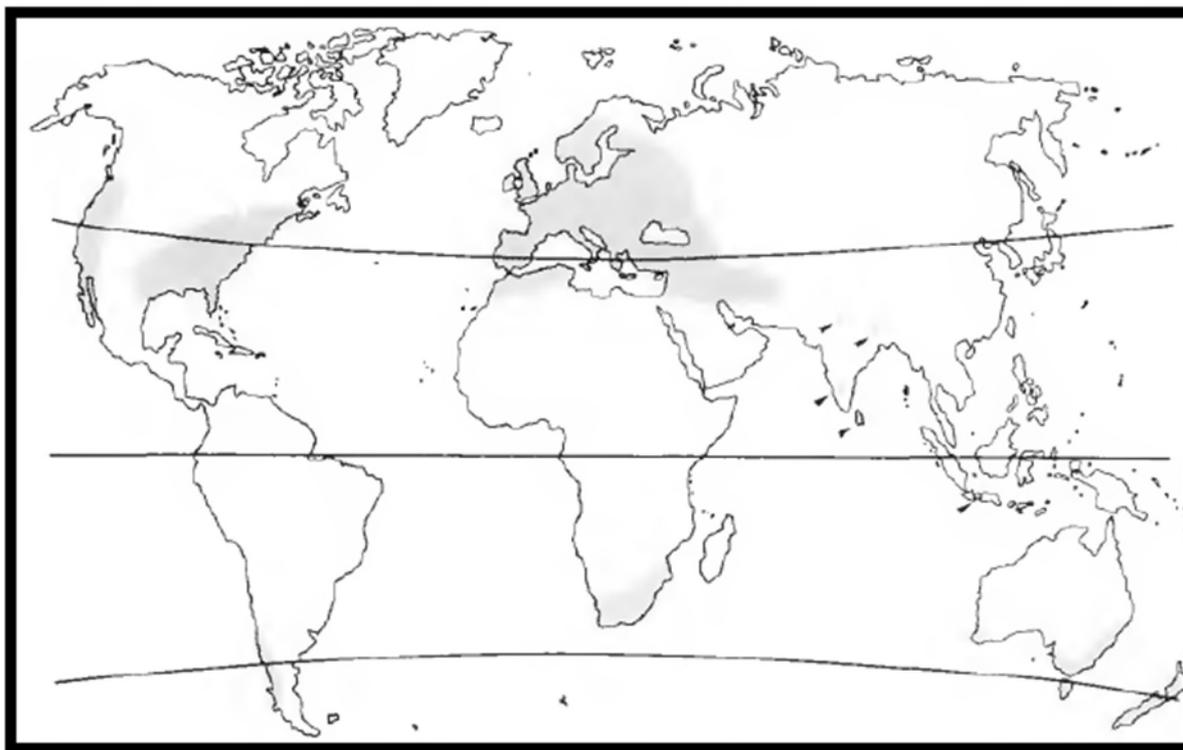


Figure I.3 : Aire de répartition mondiale de *Rubus fruticosus* L.(Wehrlen, 1985).

I.2.4 La phytochimie de *Rubus fruticosus* L.

Plusieurs études phytochimiques réalisées sur la plante *Rubus fruticosus* ont permis d'identifier certains composants bioactifs auxquels sont attribuées les activités pharmacologiques de cette plante, dont les plus importants sont les acides phénoliques comme l'acide éllagique, l'acide gallique, l'acide caféique, l'acide p-coumarique et les flavonoïdes comme la quercétine, le kaempferol, la myricitine, la catéchine, l'epicatéchine, l'epicatéchine gallate, la cyanidine-3-O-glucoside et la quercétine-3-D-glucoside. (Gudej et Tomczyk, 2004 ; Radovanović et al., 2013 ; Milivojevic et al., 2011).

Des triterpènes acides comme l'acide rubutique, rubinique et 2- α -Hydroxyursolique ont été isolés à partir de *Rubus fruticosus* (Zia-Ul-Haq et al., 2014).

Les composés aromatiques tels que le 5-hydroxyméthylfurfural et le 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl-4H-pyran-4-one sont éventuellement présents dans cette plante (Turemis et al., 2003).

I.3 Les métabolites bioactives dans le *Rubus fruticosus L.*

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allelopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits. (Judd et al., 2002)

Leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections virales). (Makkar et al., 2007)

I.3.1 Les polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires, d'un poids moléculaire élevé (Haslam, 1993), se trouvent dans un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Psotova et al., 2003).

L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel il est directement lié au moins à un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2009).

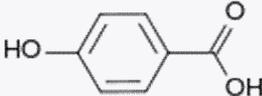
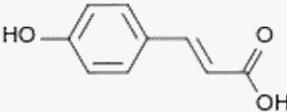
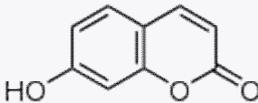
Les composés phénoliques naturels regroupent plus de 8000 substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles (Bamforth, 1999). Allant de molécules simples à des composés hautement complexes (Urquiaga, 2000). L'accumulation de ces dernières dans les plantes, varie quantitativement et qualitativement non seulement dans les différentes parties de la plante, mais aussi d'une espèce végétale à une autre. On peut distinguer les différentes classes de polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure du squelette de base (Harborne, 2000) :

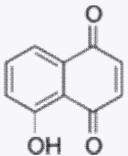
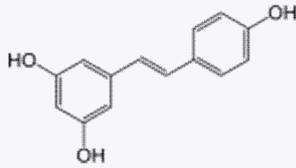
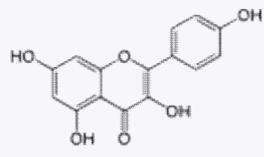
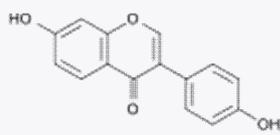
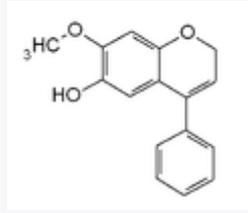
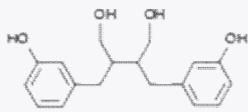
- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïque, acides hydroxycinnamiques),
- Les flavonoïdes qui représentent la classe la plus abondante et la plus étudiée,
- Les tanins et lignines,
- Et plus rares, les coumarines et les stilbènes.

Les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stilbènes, les tanins et les lignanes (**Tableau I.1**) (**Bruneton, 1999**), sont majoritairement présents dans les racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, graines de bois et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines,...etc (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Les polyphénols sont des composés organiques, très abondants dans les fruits et les feuilles de mûres sauvages, qui jouent également un rôle sur la physiologie des plantes, particulièrement dans la défense contre les biotiques et le stress abiotique. (**Marhoune et Boulebtina, 2017**).

Tableau I.1 : La classification des polyphénols (**Bruneton, 1999**).

Composés phénoliques				
Squelette carboné	Classe	Exemple	Structure	Origine
C ₆	Phénols simples	hydroquinone		Busserole
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	acide parahydroxybenzoïque		Épices, fraises
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques	acide paracoumarique		Tomates, ail
	Coumarines	ombelliférone		Carottes, coriandre

C_6-C_4	Naphtoquinones	juglon		Noix
$C_6-C_2-C_6$	Stilbénoides	trans-resvératrol		Raisin
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoïdes <i>lato sensu</i>	kaempférol		Fraises
	Isoflavonoïdes	daïdzéine		Graines de soja
	Anthocyanes	dalphiniol		<i>Dalbergia sissoo</i> , petits fruits rouges
$(C_6-C_3)_2$	Lignanes	entérodiol		Bactéries intestinales, lin
$(C_6-C_3)_n$	Lignines			Bois, fruits à noyau
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Tanins condensés	procyanidine		Raisins, kaki

I.3.1.1 Les acides phénoliques

Le terme acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique (**Belyagoubi et Benhammou, 2011**).

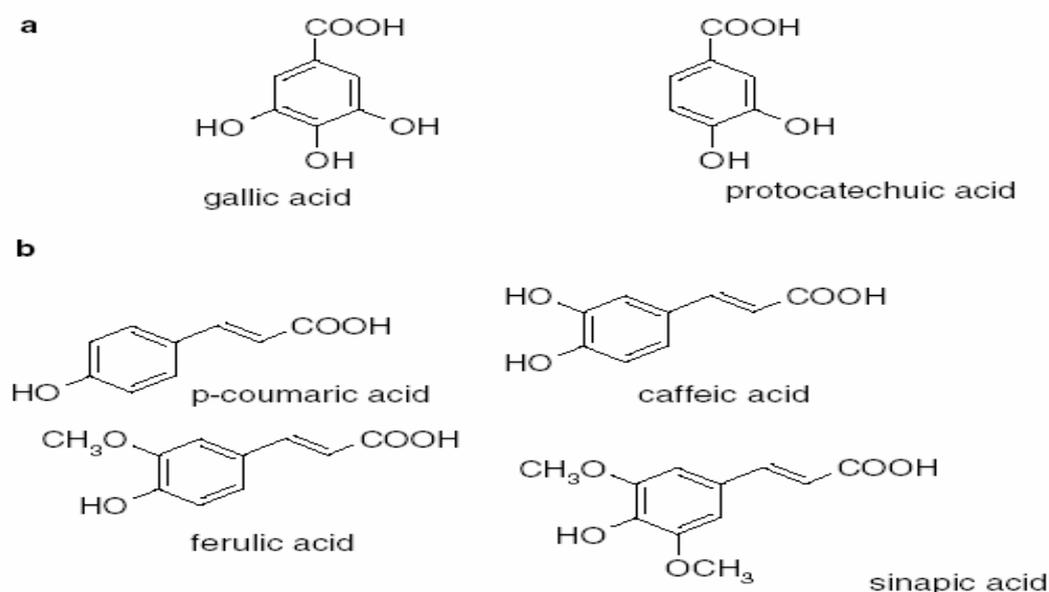


Figure I.4 : Structures des acides hydroxybenzoïques (a) et hydroxycinnamiques (b) (**Belyagoubi et Benhammou, 2011**).

I.3.1.2 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent une large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (**Bruneton, 1999**). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (**Havsteen, 2002**). Ils dérivent de l'enchaînement Benzo-pyrone et peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation (**Figure I.4**) (**Hendrich, 2006**). Les flavonoïdes sont des composés phénoliques, très abondants dans la nature, trouvés partout dans les plantes développées et ils sont identifiés dans toutes les parties de la plante y compris les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, le pollen, le nectar, les graines et l'écorce (**Cermak et al., 1998** ; **Tim Cushnie et Lamb, 2005**). Dans la plante *Rubus fruticosus L.* ces métabolites sont localisés dans les feuilles (**Meziti, 2018**), le fruit (**Issaadi, 2010**)

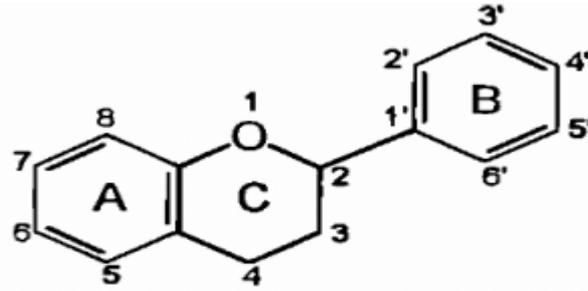


Figure I.5: Structure de base des flavonoïdes. (Hendrich, 2006)

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavanols, les flavanones, les dihydroflavanols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les auronones et les anthocyanes (**Figure I.5**) (Manach *et al.*, 2004).

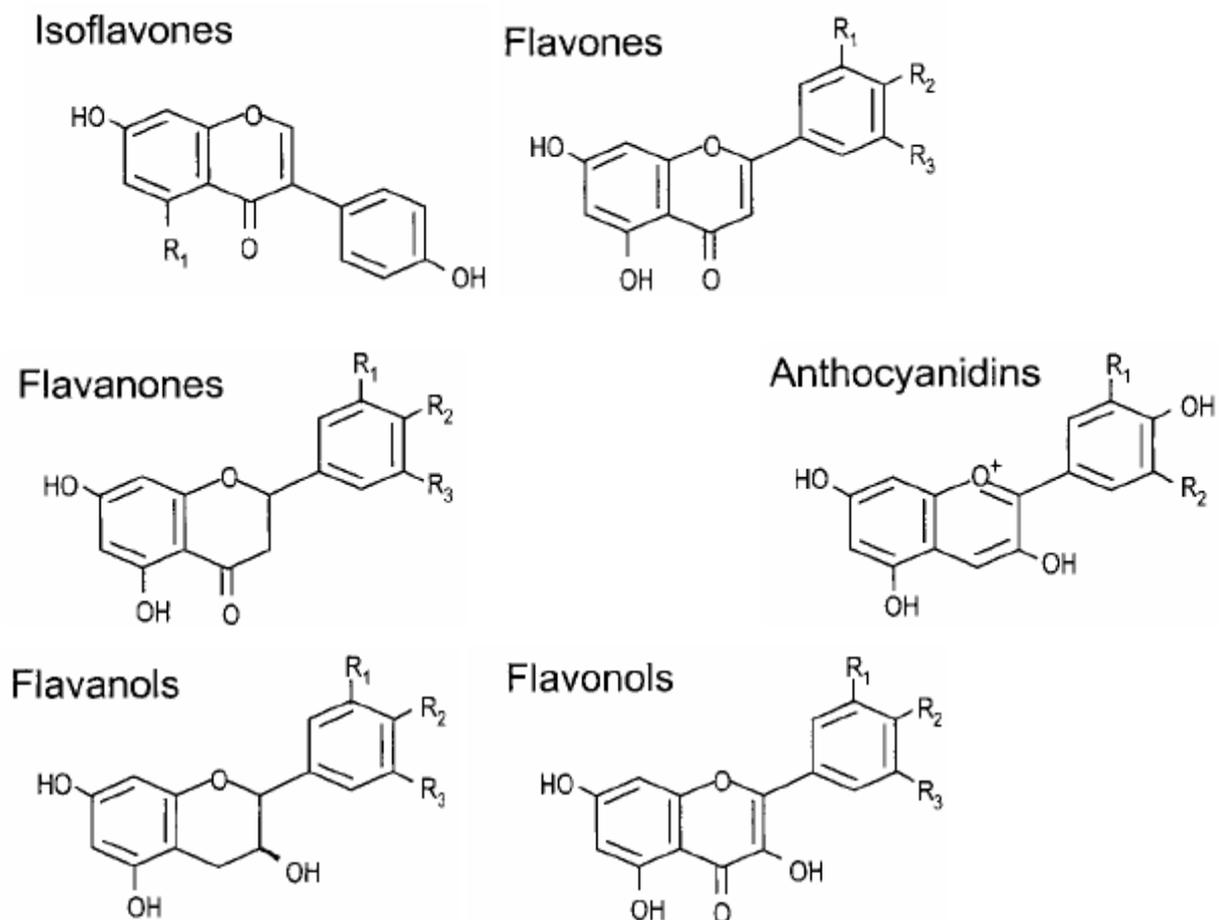


Figure I.6 : Structure des principales classes de flavonoïdes (Manach *et al.*, 2004)

I.3.1.3 Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tanins condensés) et les dicotylédones (tanins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités. (Harborne., 1997). Leur poids moléculaire est compris entre 5000 et 3000 Daltons. On distingue deux grands groupes de tanins :

- **Tanins hydrolysables** : Ces composés sont considérés comme des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Généralement le sucre est le D-glucose et l'acide phénol soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide éllagique dans le cas des tanins classiquement dénommés éllagitanins (Bruneton, 2009) (Figure I.6).

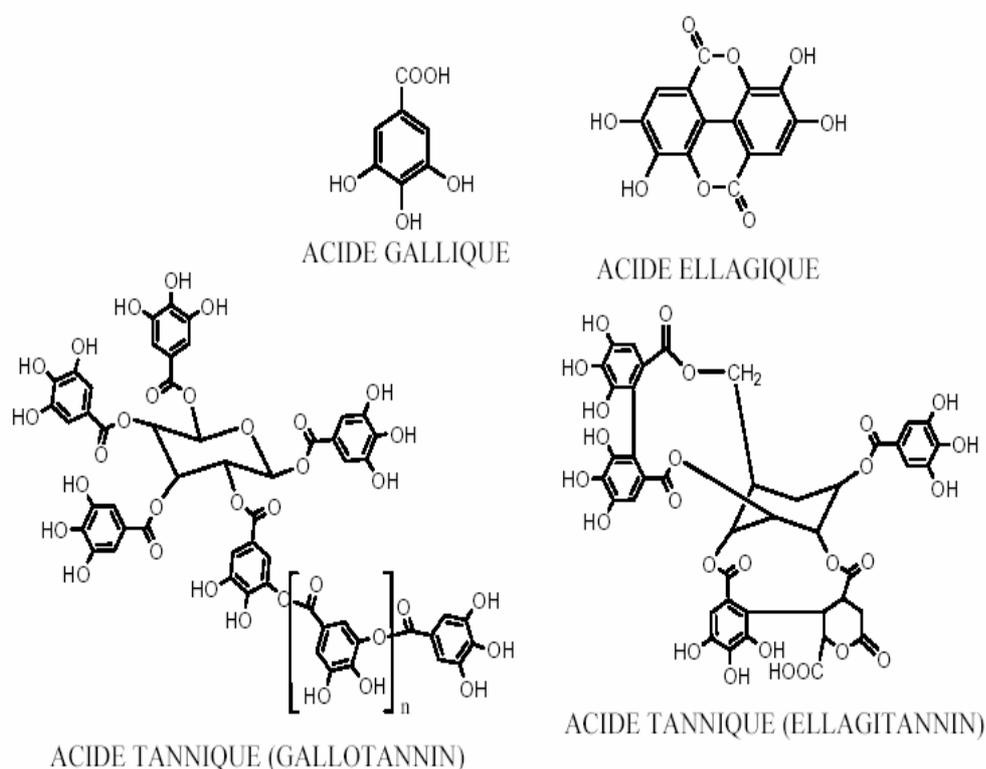


Figure I.7 : Structure des tanins hydrolysables et des acides associés (Issaadi, 2010).

❖ Acide gallique

L'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque) est un composé organique aromatique, l'un des six isomères de l'acide trihydroxybenzoïque, largement répandu dans les plantes soit sous forme libre soit comme composant des gallotanins (**Figure I.7**) (**Bruneton, 2009**), cet acide est classé dans les acides-phénols (ou acides phénoliques) puisqu'il comporte à la fois une fonction carboxylique et des hydroxyles phénoliques. Et comme il est dérivé de l'acide benzoïque, on le classe aussi dans les acides hydroxybenzoïques.

On le trouve à l'état naturel dans des galles de chênes (ou noix de galle), de sumac, d'hamamélis, les feuilles de thé, l'écorce de chêne, la peau de grenade, entre autres plantes. Sa formule chimique est $C_6H_2(OH)_3COOH$. Les sels et esters issus de cet acide sont appelés gallates.

Fréquemment utilisé dans l'industrie pharmaceutique, il est un précurseur pour la synthèse de la mescaline.

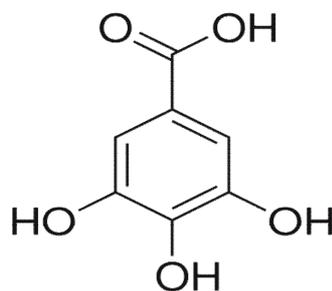


Figure I.8 : Structure chimiques de l'acide gallique (**Bruneton, 2009**).

- **Tanins condensés** : Les tanins condensés diffèrent fondamentalement des tanins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constituées d'unité de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone (**Bruneton, 2009**), (**Figure I.8**) Dans la plante *Rubus fruticosus L.* ces métabolites sont localisés dans les feuilles (**Issaadi, 2010**).

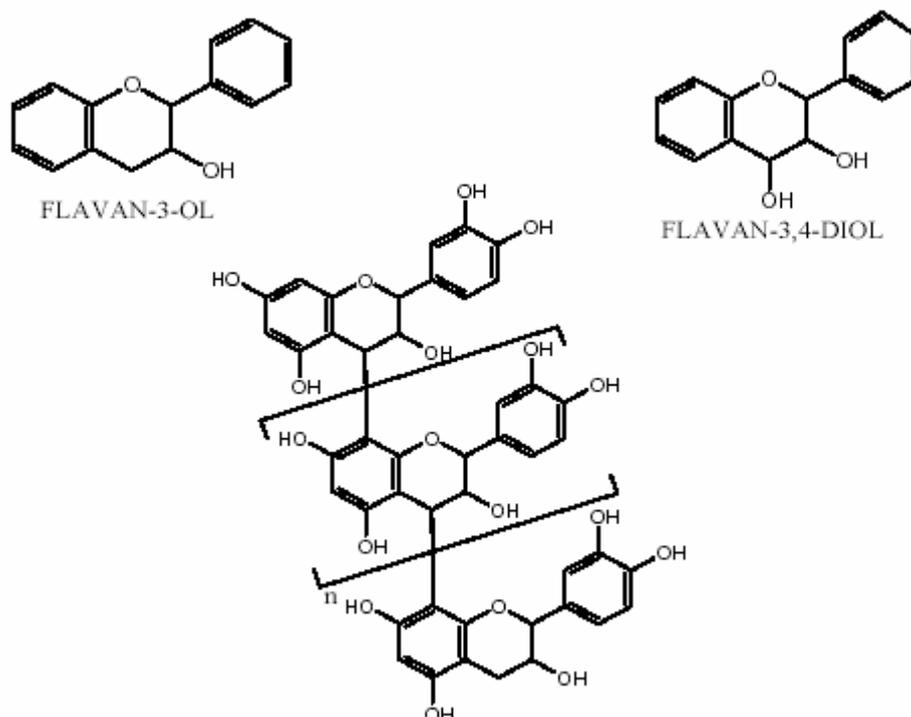


Figure I.9 : Structures de tannins condensés. (Issaadi, 2010)

I.4 Propriété pharmacologique et usage thérapeutique traditionnel de *Rubus fruticosus L.*

La ronce est une plante médicinale très appréciée pour son efficacité à traiter certaines maladies. Constituée essentiellement de tanins, cette plante détient un pouvoir astringent et anti-diarrhéique. Le gargarisme par la décoction de la ronce est utilisé pour le traitement des inflammations de la bouches comme les aphtes, les gingivites, les pharyngites. Les feuilles de la ronce possèdent une action antibactérienne et antifongique ; ainsi elles sont utilisées pour soigner les plaies et les blessures extérieures. Le décocté des feuilles peut servir de collyre pour les yeux. Les bourgeons sont employés pour guérir la bronchite et permet d'atténuer les problèmes d'insuffisance respiratoire. La ronce est dotée aussi de propriétés carminatives, diurétique et anti hémorroïdaire (Fournier, 2010 ; Zia-Ul-Haq et al., 2014).

En plus de ces activités, l'étude menée par (Gomar et al., 2014), met en évidence un effet protecteur des difficultés cognitives, conséquentes au diabète.

I.5 L'activité anti-oxydante

Il existe des mécanismes de défense cellulaire qui détruit les radicaux oxygènes (Peroxydases cellulaires) ou qui piègent les radicaux libre (molécules anti-oxydantes) (**Boyd et al., 2003**).

I.5.1 Définition d'un antioxydant

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substances biologique. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (**Boyd et al., 2003**). Ils sont capables de minimiser efficacement les rancissements, retarder la peroxydation lipidique, sans effet sur les propriétés sensorielles et nutritionnelles du produit alimentaire. Ils permettent le maintien de la qualité et d'augmenter la durée de conservation du produit. (**Barka et Medjahed, 2017**).

I.5.2 Définition d'un radicale

Un radical libre est une espèce chimique qui possède un électron célibataire qui lui confère une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de radicaux libres est normale et ne constitue pas une situation pathologique en soi. En effet, elle joue un rôle dans certaines voies de signalisation. De plus, il existe divers systèmes permettant d'éliminer les ROS et de rétablir la balance oxydative. Ces systèmes peuvent être des enzymes d'origine endogène (catalase par exemple) ou de simples molécules d'origine exogène (vitamine E par exemple) (**Florence, 2016**).

I.6 Formes galéniques pour les médicaments à base de plantes médicinales

Il existe différentes formes pharmaceutique du principe actif comme les gélules, les comprimés, des pommades, des sirops,...etc, pour les médicaments à base de plantes. Le principe actif renfermé, initialement sous forme de poudre, d'extrait ou teintures peut se présenter sous différents aspects et constitue ce que l'on appelle une forme galénique. (**Morris et al., 1987**).

I.6.1 La forme galénique liquide

Les préparations liquides pour usage oral sont habituellement des solutions, émulsions ou suspensions contenant un ou plusieurs principes actifs dans un véhicule approprié : certains liquides pour administration orale peuvent consister en des principes actifs utilisés tels quels. **(Pharmacopée Européen éd 5.5)**

Les liquides pour usage oral peuvent contenir des conservateurs antimicrobiens appropriés, des agents oxydants et d'autres substances auxiliaires telles que :

Des agents de dispersion, de suspension, des substances épaississantes. Emulsionnantes, des tampons, des mouillants, des solubilisant, des stabilisants, des aromatisants, des édulcorants, des matières colorantes autorisées.

I.6.1.1 Le sirop

Selon la pharmacopée européenne, un sirop peut être défini comme étant une forme galénique liquide qui contient au moins un principe actif administré par voie orale. **(Figure I.9)**

Les sirops sont des préparations aqueuses caractérisées par leur saveur sucrée et leur consistance visqueuse. Ils peuvent contenir du saccharose à une concentration au moins égale à 45% m/m. La saveur sucrée peut également leur être conférée par d'autres polyols ou édulcorants. Ils contiennent généralement des aromatisants ou autres agents de sapidité **(Pharmacopée européenne, 2008)**. Ils sont administrés par voie orale.

A une concentration voisine de 65% en masse (une densité de l'ordre de 1,32 à 20°C), le saccharose assure, sous certaines conditions, une protection antimicrobienne. La densité des sirops est comprise entre 1.26 et 1.32 **(Fonteneau, Klusiewicz, 2008)**.

✓ Composition du sirop

Les sirops peuvent contenir un ou plusieurs principes actifs et des substances auxiliaires (colorant, aromatisants, agents antimicrobien). Le nom et la concentration des édulcorants et des polyols doivent être indiqués sur l'étiquette **(Hir et al., 2009)**.



Figure I.10 : Forme pharmacologique d'un sirop

- **Sirop à base du *Rubus Fruticosus L.***

- **Rubus Fritucosus G37**

Le Rubus Fritucosus G37 est un médicament à base de jeunes pousses de Ronce sous forme sirop conditionné dans un flacon en verre de 50ml. (**Figure I.11**)

- **Ingrédients**

- Ingrédients médicinaux** : Rubus fruticosus 0,05 ml (jeunes pousses de Ronce) (extrait 1:20 2,5 mg) :

- Ingrédients non-médicinaux** : Alcool, eau, glycérine.

- **Posologie**

- Adultes et enfants > 12 ans : 5-15 gouttes par jour, en dehors des repas, pures ou diluées dans de l'eau, ou selon les directives d'un praticien de la santé.

- **Précautions et mises en garde**

- Consulter un praticien de la santé si les symptômes persistent ou s'aggravent.

- Ne pas utiliser si le sceau de sécurité est brisé.

- Tenir hors de la portée des jeunes enfants.

- **Contre-indications**

- Ne pas utiliser si vous êtes enceinte ou si vous allaitez sauf sur l'avis d'un praticien de la santé.

- Pour plus d'information, consulter votre praticien en soins de santé.



Figure I.11 : Sirop de Rubus Fruticosus G37

➤ **Rubus Fruticosus BIO 60 ml**

Le Rubus Fruticosus BIO 60ml est un médicament à base de Rubus Fruticosus (bourgeon) sous forme sirop conditionné dans un flacon en verre de 60ml le fabricant est canadien (**Homeocan**) (**Figure I.12**)

Ce médicament aide à apaiser les voies respiratoires et à renforcer les défenses naturelles de l'organisme. La ronce est employée pour guérir la bronchite et permet d'atténuer les problèmes d'insuffisance respiratoire. Elle est aussi riche en vitamine C et en acides organiques, c'est une plante dépurative et fortifiante.

• **Ingrédients**

Ingrédient médicinal (pour 1 goutte) : Rubus fruticosus 1DH (1:200) 0.05 ml, équivalent à 0.25 mg de jeunes pousses de Petit mûrier.

Ingrédients non médicinaux : Glycérol, Alcool, Eau purifiée

• **Posologie**

Adultes (plus de 12 ans) : Prendre 50 gouttes 3 fois par jour dans un verre d'eau ou tel que recommandé par un praticien de la santé.

• **Contre-indication**

Ne pas utiliser si vous êtes enceinte ou si vous allaitez sauf sur la recommandation d'un praticien de la santé.



Figure I.12 : Flacon de sirop de Rubus Fruticosus BIO 60 ml (**homeocan.ca**).

➤ **Rubus Fruticosus**

Le Rubus Fruticosus est un médicament à base de Rubus Fruticosus sous forme sirop conditionné dans un flacon en verre de 125ml.

Rubus fruticosus peut aider à réduire la douleur qui accompagne la décalcification des os. Le traitement de l'arthrose chez les personnes âgées est délicat, comme l'ostéoporose, il est aussi indiqué pour la spondylarthrite ankylosante, la bronchite, l'emphysème, la polyarthrite rhumatoïde et les maladies respiratoires sclérosées. (**La para.ca**) **Figure I.13**.

• **Ingrédients**

Ingrédients médicinaux : *Rubus fruticosus* (Mûrier sauvage) 1 X

Ingrédients non-médicinaux : glycérine, alcool, eau pure.

• **Posologie**

Adultes en enfants de plus de 12 ans : 50 gouttes (1/2 cuillère à café) une à trois fois par jour.

Les enfants de moins de 12 ans : 15 à 25 gouttes une à trois fois par jour.

• **Précautions et mise en garde**

Si les symptômes persistent ou s'aggravent, consultez votre médecin. Si vous êtes enceinte ou allaitez, ne pas utiliser, à moins que conseillé par votre professionnel de la santé.

• **Contre-indications**

Aucune connue.

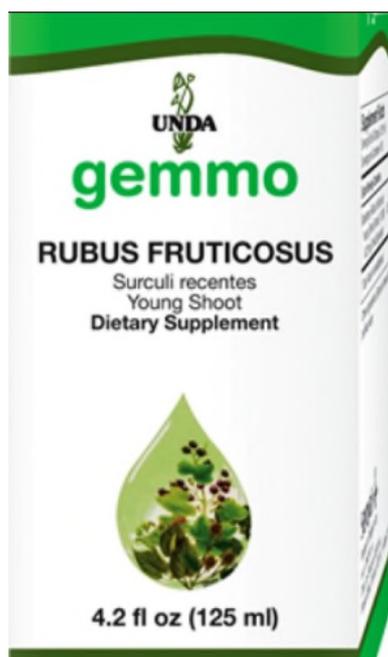


Figure I.13 : Sirop à base du *Rubus Fritucosus* (La para.ca)

I.6.1.2 Les gouttes buvables

Les gouttes buvables sont des solutions relativement concentrées, contenant un ou plusieurs principes actifs dissous dans un solvant approprié, par une dissolution simple. Elles sont administrées par un compte-gouttes incorporé dans le bouchon ou remplacé par une seringue graduée ou pipette (**Pharmacie galénique, 2008**). Ils peuvent être des solutions, des émulsions ou des suspensions à administrer en petits volumes au moyen d'un dispositif approprié (**Pharmacopée Européen, Ed 5.5**).

➤ **Rubus Fruticosus J.Pousses Gouttes**

Le Rubus Fruticosus J.Pousses est un médicament homéopathique sous forme de macérat glycéринé. Disponible dans différentes dilutions : 1DH, 3DH, 6DH, 3CH. Ce médicament est fabriqué par les Laboratoires Boiron, 2 avenue de l'Ouest Lyonnais, 69510 Messimy, et est conditionné dans des flacons de 30, 60, et 125ml. Les gouttes doivent être diluées dans un peu d'eau et sont administrées par voie orale. Un léger trouble peut apparaître sans incidence sur la qualité du médicament. (**Illico pharma**) **Figure I.14**.

- **Liste des excipients à effet notoire :** Ethanol
- **Précautions et mise en garde**

Ce médicament contient de l'alcool. En raison de la présence d'alcool, prévenez votre médecin en cas de maladie du foie, d'épilepsie, de grossesse ou d'allaitement.

L'usage chez l'enfant doit être fait sur avis médical seulement.
Ne pas laisser à la portée des enfants.



Figure I.14 : Les gouttes d'homéopathie Boiron Rubus Fruticosus J.Pousses (**Illico pharma**)

➤ **Ronce (Rubus fruticosus) bourgeon BIO, 30 ml**

Le médicament Ronce (Rubus fruticosus) bourgeon BIO est à base de bourgeons sous forme de gouttes conditionné dans des flacons de 30 ml

Le bourgeon de ronce est particulièrement recommandé pour les problèmes respiratoires chroniques. (**Aroma-zen**) **Figure I.14.**

• **Ingrédients**

Ingrédients médicaux : ronce (rubus fruticosus): 10,3%

Ingrédients non-médicaux : eau, alcool à 32%, glycérine

• **Posologie**

Prendre 10 à 15 gouttes dans un petit verre d'eau, 15 min avant les repas.

Une prise par jour, pendant au moins 21 jours.

• **Précautions et mise en garde**

Tenir hors de portée des enfants

Ne pas dépasser la dose journalière recommandée

Ne se substitue pas à une alimentation variée et à un mode de vie sain

- **Astuce**

Pour le traitement des animaux domestiques (chiens et chats particulièrement), il est conseillé de donner 1 goutte de macérat glycéринé pour 5 à 10 kg.

- **Indication**

Un flacon de 30ml permet de faire une cure d'un mois.

Il est conseillé de faire des cures de longue durée (2 mois).



Figure I.15 : Ronce (*Rubus fruticosus*) bourgeon BIO, 30 ml (**Aroma-zen**)

Chapitre II

Matériels et

méthodes

II.1 préparation du matériel végétal

La récolte des feuilles de *Rubus Fruticosus L.* communément appelé dans la région de la Kabylie *Inijel* (Figure II. 1) a été réalisée au mois de mars 2020 dans la région d'Aokas, wilaya de Bejaïa. (Figure II. 2)



Figure II.1 : La plante *Rubus fruticosus L.*



Figure II.2 : Site de collecte de la plante *Rubus fruticosus L.*

Les feuilles de *Rubus Fruticosus L.* sont préalablement lavées avec l'eau du robinet et ensuite avec l'eau distillée pour éliminer les poussières et d'autres particules contaminantes, elles sont ensuite séchées à l'air libre (**Figure II.3**)



Figure II.3 : Echantillon végétal des feuilles de *Rubus Fruticosus L.*

II.2 Produits chimiques utilisés

L'ensemble des produits chimiques et réactifs utilisés dans l'extraction, la séparation, les caractérisations qualitatives et quantitatives ainsi que les tests microbiologiques sont regroupés dans le **Tableau II.1** (Annexes I).

II.3 Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L.* a été réalisée par trois différentes méthodes, à savoir par décoction, par macération à froid et enfin par irradiations micro-ondes

II.3.1 La décoction

Cette méthode d'extraction a été réalisée selon le protocole décrit par **Konkon et al., 2006** avec quelques modifications. 20 grammes de feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L.* sont introduites dans 200ml d'eau distillée chaude, le mélange sous couvert est chauffé pendant 30min à 80°C (**Figure II.4**). Après refroidissement de ce dernier une filtration est réalisée sur papier Wathman n°1 (**Figure II.5**). L'extrait

végétal est conservé dans un contenant en verre à 4°C pour une utilisation ultérieure.



Figure II.4 : Extraction par décoction des composés phénoliques des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L*



Figure II.5 : Extrait par décoction des composés phénoliques des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L*

II.3.2 Extraction par macération dans un mélange hydro-alcoolique eau/méthanol

L'extraction par macération dans un solvant hydro méthanolique(v/v) : (50/50) a été effectué selon le protocole décrit par **Hamia et al. 2014**, avec quelques modifications. 20g de la matière végétale est mélangé avec 100 ml de solvant hydrométhanolique 50% (**Figure II.6**). Après une macération sous couvert pendant 24h, l'extrait est filtré sur papier Wathman n°1 (**Figure II.7**). Le filtrat est conservé au frais à 4 °C pour une utilisation future.



Figure II.6 : Extraction par macération des composés phénoliques des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L.*



Figure II.7 : Extrait par macération des composés phénoliques des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L* (macérât).

II.3.3 Extraction par irradiation avec micro ondes dans un mélange hydro alcoolique eau/méthanol

L'extraction par micro onde dans un solvant hydro éthanolique (v/v) : (10/90) des composés bioactifs des feuilles *Rubus Fruticosus L.* est réalisée en utilisant un appareil micro-onde (Kenwood), avec une puissance de 1450W.

Cette méthode d'extraction a été réalisée selon le protocole décrit par **Paré et al. 1990** en y apportant quelques modifications en variant le temps. Des échantillons de 20g des feuilles fraîches du *Rubus Fruticosus L.* sont mélangés à un solvant hydro éthanoïque (90%) avec un temps d'irradiation relatif à chaque échantillon: [1min, 5min, 10 min, 15min, 30min]. Après refroidissement et filtration sur papier Wathman n°1. Les extraits en question sont conservés dans un contenant en verre à 4°C pour une utilisation ultérieure.

II.4. Extraction des tannins galliques et condensés de l'extrait des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L.*

Les extraits végétaux obtenus par les trois méthodes d'extractions ont été débarrassés de la chlorophylle et les lipides par un traitement avec le dichlorométhane (3*.30ml) par agitation pendant 15min suivi d'une extraction liquide/ liquide (**Figure II.8**).



Figure II.8 : extraction liquide/liquide de la chlorophylle et les lipides des extraits des feuilles fraiche de *Rubus fruticosus L.* obtenus par les trois méthodes d'extraction

Les extraits aqueux on été ensuite traités par l'acétate d'éthyle (3*30ml) qui extrait les tannins galliques et les proanthocyanidoles dimériques (**Figure II.9**). Les tannins plus condensés restent dans la phase aqueuse (**Zhang et al., 2008**) .Après évaporation du solvant les extraits sont conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure.



Figure II.9 : séparation des tanins galliques et condensés

II.5. Caractérisation qualitative et quantitative des métabolites secondaires dans l'extrait des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L*

II. 5.1 Caractérisations photochimiques par colorations et précipitations

La caractérisation qualitative photochimique par coloration et par précipitation des métabolites présents dans l'extrait des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L* est résumée dans le **tableau II.1**.

Tableau II.2 : Les différentes réactions utilisées pour la caractérisation par coloration.

Nature des métabolites secondaires	Réactifs et protocoles d'identification	Le Résultat positif
Tanins totaux (Mole et Waterman, 1987 ; Ben Naser et al., 1996 avec modifications)	5ml de l'extrait brut + 1ml de la solution de FeCl ₃ a (2%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ La coloration bleue indique la présence des tanins gallique. ○ La coloration verdâtre indique la présence des tanins condensés.
	2ml de l'extrait brut + 1ml de la vanilline chlorhydrique et chauffage au bain marie pendant 15min	<ul style="list-style-type: none"> ○ La coloration rose foncé indique la présence des tanins condensés.
Flavonoïdes (Bahorun, 1996 avec modifications)	1ml de l'extrait brut + 1ml de la solution d'AlCl ₃ (2%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Coloration jaune
Polyphénols (Negi et al., 2003 avec modifications)	0.2ml de 'extrait + 1ml du réactif Folin Ciocalteu, on laisse incuber pendant 4min à température ambiante puis on ajout 0.8ml de Na ₂ CO ₃ (2%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Coloration bleue

II.5.2. Caractérisation par chromatographie

II.5.2.1 Chromatographie sur couche mince CCM

La chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites (Bennouar et Chekakta, 2017).

✓ Principe

Cette technique repose principalement sur le phénomène d'adsorption sélective des composants, la migration (verticale) est fonction de la polarité des substances. De la polarité de l'éluant (phase mobile) et du pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire.

La mise en œuvre d'une CCM nécessite plusieurs matériels tel que :

-une cuve chromatographie : c'est un récipient en verre, fermé par un couvercle maintenu étanche.

-une phase stationnaire : c'est une couche d'absorbant étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimension variable (généralement 20*20cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2mm. L'absorbant que nous avons utilisé est le gel de silice.

-La phase mobile : c'est l'éluant, il est composé d'un mélange de solvant qui migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé.

L'éluant utilisés : eau distillée, méthanol.

✓ Mode opératoire

Des petits spots de l'extrait sont déposés par une pipette pasteur sur une plaque CCM préalablement découpée. La plaque est déposée verticalement dans la phase mobile dans une cuve contenant le solvant d'éluant. Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis

examinée sous une lampe UV-Visible. Le rapport frontal pour chaque constituant est déterminé selon la relation :

$$Rf = \frac{\text{distance parcourue par l'échantillon}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{h}{H}$$

h= distance parcourue par la substance cm.

H= distance parcourue par l'éluant cm.

II.5.2.2 Chromatographie liquide haute performance (pression) (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC, High performance liquid chromatography), est une technique de séparation analytique et/ou préparatrice de molécules présentes dans un mélange. Cela permet d'adapter les méthodes chromatographiques usuelles (voir Colonne) sur un montage haut pression (**Figure II.10**).



Figure II.10 : montage de l'appareil HPLC

La phase mobile est liquide percole à haute pression à travers une phase stationnaire de granulométrie très fine ce que permet de séparer plus efficacement les composés donc d'utiliser des colonnes plus petites avec une économie de support, de solvant et de produit à analyser (**Fabien, 2009**).

✓ Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. (**Imami et al., 2016**).

✓ Protocole d'analyse

L'analyse chromatographique de l'extrait bruts de *Rubus fruticosus* est réalisée par HPLC-TOF-MS selon le protocole décrit par **Demirtas et al., 2013**. Le système utilisé est Agilent Technologies série 1260 doté d'un détecteur 6210 Spectromètre de masse à temps de vol (Time of Flight (TOF)/MS) et d'une colonne ZORBAX SB-C18 (4.6 x100mm, 3.5 µm).

La phase mobile est constituée d'un mélange de deux solvant A et B (acétonitrile et acide formique à 0.1% respectivement dans de l'eau bi distillée) avec un gradient dont le programme du solvant est le suivant: 0-1 min 10% B, 1-20 min 50% B, 20-23 min 80% B, 23- 25 min 0% B; 25-30 min 10% B. L'extrait bruts (200 µg) est solubilisé dans le méthanol et filtré à travers un filtre PTFE (0.45µm) pour éliminer les particules. Le volume injecté est 10 µl. Le débit du solvant est de 0.6 ml min⁻¹ et la température de la colonne est 35°C.

Le mode d'ionisation de l'instrument HPLC-TOF/MS est négatif et fonctionne avec une température du gaz d'azote de 325°C, un débit d'azote gazeux de 0,7 mL/min, un nébuliseur de 40 psi, un voltage capillaire de 4000 V et un voltage du fragmenteur de 175 V (Afif Chaouche, 2015).

Nous avons envisagé de faire une analyse par HPLC propre à nous pour pouvoir comparer les résultats et voir l'influence de la méthode et le choix du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques qui on était extrait, vue la situation actuelle du payé notre projet est malheureusement mis a l'arrêt.

II.5.3 Caractérisation par les méthodes spectrophotométries Infra-Rouge(IR) et UV-Visible

II.5.3.1 Caractérisation par Infra-rouge(IR)

La spectroscopie infrarouge a été exploitée pour la caractérisation qualitative des métabolites secondaires dans l'extrait des feuilles fraîche de *Rubus Fruticosus L.* Elle permet d'identifier la nature des groupes fonctionnels des composés des liquides, des solides, des gaz, des poudres, des fibres, des films ou des surfaces.

✓ Principe

L'analyse du faisceau infrarouge permet de détecter un certain nombre de bandes d'absorption qui correspondent aux modes de vibrations caractéristiques des divers groupements contenus dans les substances analysés. Le spectre infrarouge constitué par l'ensemble de ces bandes représente alors l'empreinte digitale de la molécule (Mahdjar, 2013). Dans notre étude l'ensemble des mesures spectrophotométries IR sont réalisées sur un appareil IR Affinité (Figure II.11), les données sont traitées par le logiciel IR solution au laboratoire d'analyse université de Bejaïa.



Figure II.11 : appareil de l'Infra Rouge- shimadzu-

✓ **Protocole d'analyse**

Déposer une goutte de chaque extrait sur une pastille de KBr (bromure de potassium) préparée en amont, placé ensuite ces pastilles dans l'appareil IR (IR affinity –shimadzu) pour l'analyse.

II.5.3.2 Caractérisation par Ultraviolet –Visible (UV-Vis)

La spectrophotométrie UV-vis est une méthode analytique qualitative et quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique en solution, plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

A : Absorbance

ϵ : Le coefficient d'absorption molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

l : La largeur de cuve (1 cm)

C : La concentration de la solution en mol/L

✓ Principe

Le principe repose sur l'absorption de la lumière par les espèces chimiques, l'appareil comporte une source de lumière blanche, un système dispersif permettant de sélectionner la longueur d'onde de la radiation et un système détecteur permettant la mesure de l'intensité lumineuse de la radiation monochromatique traversant la solution. Le spectrophotomètre effectue une comparaison entre les intensités lumineuses incidentes et transmises et permet par l'intermédiaire d'un circuit électronique d'afficher l'absorbance.

Pour valider la loi de Beer-Lambert il faut travailler en lumière monochromatique, les solutions utilisées doivent être diluées, homogènes, et le soluté ne doit pas donner de réactions sous l'effet de la lumière incidente. (Silverstein et al., 1998)

Dans notre étude l'ensemble des mesures spectrophotométriques UV-Visible sont réalisées sur un appareil Spectroscan50 (Figure II.12), les données sont traitées par le logiciel UV-Win .5. Des mesures réalisées au laboratoire d'analyse à l'université de Bejaia.



Figure II.12 : appareil de l'UV visible-spectro scan 50-

✓ Protocole de caractérisation et de quantification des tanins galliques

La caractérisation et la quantification des tannins galliques par UV-Vis basée sur la réaction des tannins galliques avec les chlorures de fer (**Mole et Waterman, 1987**). Pour la détermination et l'identification de ces composés, un volume de 1ml de l'extrait brut a été ajouté à 3ml d'une solution de trichlorures de fer (0.01M) dans l'acide chloridrique (0.001M). L'absorbance de la mixture est lue après 15 secondes à une longueur d'onde (λ) de 750nm sur un spectrophotomètre UV-Vis. La teneur en tannin galliques est déterminée avec la formule suivante :

$$\text{TG (\%)} = (\text{Abs} \times \text{M} \times \text{V}) / \text{.E mole} \times \text{P.}$$

ou : TG: tannins gallique , Abs: absorbance, E mole: 2169 de l'acide gallique (constante exprimé en moles), M: mass = 300, V: volume de l'extrait , P: poids de l'échantillon

✓ Protocole de caractérisation et de quantification des tanins condensés

Nous avons adopté la méthode à la vanilline avec l'HCl. Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des TCs et la formation de complexes rouges (**Makkar., 2000 ; Schofield et al., 2001**), cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline (**Sun et al., 1998**). La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline décrite par **Julkunen-Titto, 1985**.

Un volume de 50 μ l de chaque extrait a été ajouté à 1500 μ l de la solution vanilline/méthanol à 4 %, puis mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750 μ l de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) a été additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc. Différentes concentrations comprises entre 0 et 1000 μ g/ml préparées à partir d'une solution mère de la catéchine, permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

✓ **Protocole de caractérisation et de quantification des flavonoïdes totaux**

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (**Lagnika., 2005**)

le protocole utilisé est basé sur celui décrit par **Zhishen et al., 1999** et **Kim et al., 2003** en y apportant quelques modifications

Dans un tube à essai, 400µL d'extrait pour le témoin ont été ajoutés à 120µL de NaNO₂ à 5%. Après 5min, 120µL d'AlCl₃ à 10% ont été additionnés, et le milieu est mélangé vigoureusement. Après 6min, un volume de 800µL de NaOH à 1M a été ajouté au milieu. L'absorbance est lue immédiatement à 510 nm contre le témoin. Une solution méthanolique de quercétine a été préparée. Des solutions filles préparées à partir de la solution mère à différentes concentrations comprises entre 0 et 1000 µg/ml, permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

✓ **Protocole de caractérisation et de quantification des polyphénols totaux**

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (**Singleton et al., 1999**). Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par **Singleton et Ross, 1965** en y apportant quelques modifications.

Dans un tube à essai, 200µL d'extrait a été ajouté avec un mélange de 1ml de réactif Folin-ciocalteu dilué 10 fois, et 800µL de NaCl à 7.5%. Le tube est agité et conservés pendant 30 min. L'absorbance est lue à 765 nm.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0 à 1000 µg/ml).

été mélangé avec 1ml de différentes dilutions des extraits de plante (0-1 mg/ml). Le mélange obtenu est ensuite gardé à l'abri de la lumière à la température ambiante pendant 30 minutes. Puis l'absorbance est mesurée à 517 nm contre un témoin composé de 1ml de la solution de DPPH et de 1ml de méthanol (**Laraba et al., 2016**).

Les échantillons, les témoins (l'acide ascorbique, la quercétine, le BHA, le BHT, et le torolox) et le blanc sont préparés dans les mêmes conditions opératoires. La décroissance de l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre et le % PI (pourcentage d'inhibition) est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$\%PI = \frac{\text{Densité optique de blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique de blanc}} \times 100$$

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC_{50}); la valeur d' IC_{50} la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée. La valeur de l' IC_{50} est exprimée en $\mu\text{g/ml}$ (3 répétitions pour chaque concentration).

II.6.2 Dosage de la capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate »

Le test du PPM (PhosphoMolybdate) est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

✓ Principe

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} à molybdène Mo (V) MoO_2^+ en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo (V) à un pH acide (**Prieto et al., 1999**). On mesure l'augmentation de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...).

✓ Méthode de dosage

La méthode consiste à introduire dans un tube 200 μl de chaque extrait à différentes concentrations mélangés à 2000 μl d'un réactif composé de H_2SO_4 (0,6 M), de Na_2PO_4 (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube est ensuite bien fermé puis incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après les avoir refroidis, l'absorbance est mesurée à 695 nm. Le témoin est constitué de 200 μl de méthanol mélangé avec 2000 μl du réactif mentionné ci-dessus. Les échantillons et les témoins sont incubés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent acide ascorbique par gramme de matière sèche de l'extrait (mg EAA/g EXS).

II.6.3. Dosage du pouvoir réducteur « FRAP »

✓ Principe

La méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés (Ou et al., 2001).

La présence des réducteurs (AH) dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} /complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm (Chung et al., 2002). En effet, le système $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ confère à la méthode la sensibilité pour la détermination «semi quantitative» des concentrations des antioxydants, qui participent à la réaction redox (Amarowicz et al., 2004).

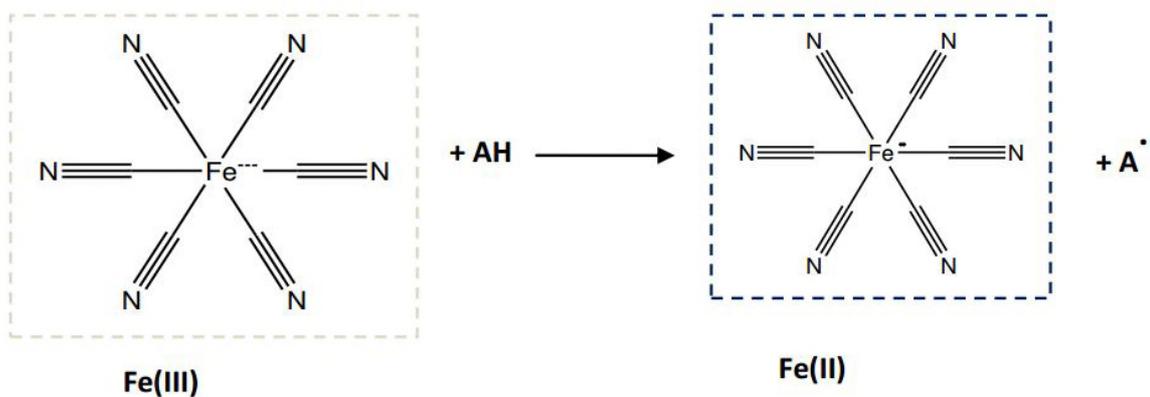


Figure II.14 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe ferricyanide ferrique Fe (III) et un antioxydant (AH) (Laraba et al., 2016).

✓ Méthode de dosage

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par **Oyaizu, 1986**. Dans un tube à essai en verre contenant 200 µl de solution d'échantillon à différentes concentrations, ont été ajoutés 500 µl de tampon phosphate (0,2M : pH 6,6) puis 500 µl de potassium hexacyanoferrate [K₃Fe (CN)₆] 1% dans l'eau distillée. L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes. Un volume de 500 µl d'acide trichloracétique (10%) est ensuite ajouté et le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. Un aliquote de 500 µL de surnageant est transféré dans un autre tube auquel ont été ajoutés 500 µl d'eau distillée et 100 µl de FeCl₃ 1% fraîchement préparé dans de l'eau distillée. Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par méthanol. (**Laraba et al., 2016**).

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

II.7 Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne a été faite par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Ainsi, des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller Hinton pour les bactéries ou la gélose Sabouraud pour les champignons ont étéensemencées avec la suspension à 0.5 Mc Farland suivant les recommandations de NCCLS (2006). Ensuite, des disques de 6 mm de diamètre, imprégnés de 10 µl de l'extrait à différentes concentrations ont été placés au centre de chaque boîte. Après incubation à 37°C pendant 24h pour les bactéries ou à 28°C pendant 48h pour les champignons, le pouvoir antimicrobien de l'extrait est déterminé par la mesure du diamètre d'inhibition. Tous les tests ont été répétés trois fois pour calculer les moyennes et les erreurs standards à la moyenne (**Afif Chaouche, 2015**).

Chapitre III

Résultats et discussions

Dans notre étude l'extraction des métabolites secondaires des feuilles fraîche de *Rubus Fruticosus L.* a été réalisée par trois méthodes ; par infusion dans l'eau qui est une méthode relative à l'usage traditionnel, par macération dans un mélange hydro-alcoolique pour voir l'effet de la nature du solvant sur la nature des métabolites extraits, et une dernière méthode par irradiation avec des micros ondes avec différents temps d'irradiation et voir le temps optimum pour avoir un extrait riche en métabolites secondaire en un temps relativement court par rapport aux autres méthodes conventionnelles d'extraction. Un plan expérimentale a été élaboré pour l'identification qualitatives et quantitatives par différentes méthodes spectrophotométriques UV-Vis et IR ainsi que les méthodes chromatographiques celle de couche mince CCM et la chromatographie liquide haute performance HPLC. Des applications pour évaluer l'activité biologiques de certains métabolites dans l'extrait des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L* à savoir l'activité antibactérienne, et anti-oxydante on été planifiées.

Une partie du programme expérimentale élaboré a été réalisé à savoir l'extraction avec les différentes méthodes ainsi que l'identification qualitative avec certaines méthodes phytochimiques de précipitation et de coloration et les méthodes spectrophotométrique UV-Vis et IR ainsi que la chromatographie sur couche mince CCM ont été réalisées. Les autres étapes prévues dans le plan expérimentale à savoir l'analyse HPLC et les testes biologiques n'ont pas pus être réalisés à cause de l'état pandémique du moment, néanmoins ces résultats référencés issue des études antécédentes sur des extraits de la même plantes réalisée par d'autres chercheurs avec des conditions opératoires similaires et différentes des nôtres ont été présenté pour mettre en évidence l'activité biologique des métabolites de cette plante.

III.1 Rendement de l'extraction des polyphénols dans les extraits des feuilles de *Rubus Fritucosus L.*

La macération de la poudre de feuilles de *Rubus fruticosus L.* dans un mélange hydro-méthanolique eau /méthanol/ (2 :8 v/v) (Meziti, 2018) a donné un extrait brut de couleur vert foncée avec un rendement en polyphénol totaux de 21,5%. L'utilisation du solvant hydro-alcoolique permet une bonne récupération des composés polaires, ainsi que les composées de moyenne et de faible polarité, principalement les composés phénoliques (Xia et al., 2010). La méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio-activité de ses constituants.

De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction (Seidel, 2005).

D'autres méthodes d'extraction ont été réalisées sur les feuilles de *Rubus Fruticosus L.* avec des solvants différents. L'ensemble des valeurs de rendements obtenues par les différentes méthodes d'extraction sont présentées dans le **Tableau III.1**

Tableau III.1 : Valeurs des rendements obtenues par différentes méthodes d'extraction

Méthode d'extraction	Rendement (%)
Macération dans le méthanol 100% (Marhoune et Boulebtona, 2017)	20.6
Macération dans l'eau distillée 100% (Marhoune et Boulebtona, 2017)	12.92
Macération dans un solvant hydro-alcoolique eau/méthanol (8 :2 v/v) (Mezite Asma, 2018)	21.5
Extraction par sonication dans un bain ultrason (Aliouat Fatma, 2014)	14

Avec les méthodes d'extraction que nous avons réalisées à savoir la décoction, la macération dans un mélange hydro-alcoolique eau/méthanol (50 :50 v/v) et l'extraction par irradiation avec micro ondes dans un mélange hydro-alcoolique eau/méthanol (10 :90 v/v) et conformément à la nature du solvant utilisé dans ces méthodes d'extraction on prévoit des valeurs de rendements plus au moins importantes.

III.2 Caractérisation qualitatives et quantitatives des métabolites secondaires dans l'extrait des feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L.*

III.2.1 Caractérisation par les méthodes photochimiques (coloration et ou précipitations)

La caractérisation photochimique par coloration et par précipitation a permis d'identifier les composés phénoliques présents dans l'extrait des feuilles du *Rubus Fruticosus L.* L'ensemble des résultats des tests réalisés sont représentés dans le **Tableau III.2**

Tableau III.2 : Résultats des tests de caractérisation par coloration réalisées sur l'extrait des feuilles de *Rubus Fruticosus L.*

Nature du métabolite	Réactifs d'identification	Résultats positifs
Tanins condensés	Vanilline + Acide Chlorhydrique	 Coloration Rose
Tanins galliques	Chlorure ferrique (FeCl ₃)	 Coloration Bleu noir
Flavonoïdes	Chlorure d'Aluminium	 Coloration Jaune

Polyphénols	Folin Ciocalteu + carbonate de Sodium (Na_2CO_3)	 Coloration Verdâtre
-------------	--	---

Les tests positifs de caractérisations qualitatifs effectués sur l'extrait des les feuilles fraîches de *Rubus Fruticosus L.* Confirment la présence des polyphénols, des flavonoïde, ainsi que des tanins galliques et tanins condensés.

III.2.2 Caractérisation par les méthodes chromatographique

III.2.2.1 Caractérisation par Chromatographie sur couche mince CCM

L'analyse chromatographique par C.C.M des extraits hydro-alcoolique v:(50 :50) des feuilles de *Rubus Fruticosus L.* a permit la détermination du rapport frontal (RF) relative à chaque type de métabolite, l'ensemble de ses résultats est résumé dans le **Tableau III.3**

Tableau III.3 : les rapports frontaux des métabolites secondaires dans l'extrait du *Rubus Fruticosus L.*

Métabolite	Rf
Polyphenols	0.90
Flavonoïdes	0.87
Tanins condensés	0.24

III.2.2.2 Chromatographie liquide a haute performance (pression) HPLC

La chromatographie liquide haute pression est sans doute la technique d'analyse, de caractérisation d'extraits en composés phénoliques la plus utilisée. Elle présente une haute résolution, une reproductibilité élevée et une durée d'analyse relativement courte (**Wollgast et Anklam, 2000**). De ce fait, cette technique a été

utilisée dans la caractérisation, qualitativement et quantitativement, des composés phénoliques des extraits de *Rubus fruticosus*L.. L'ensemble des résultats de l'analyse HPLC sont des résultats référencés réalisés en aval par d'autres chercheurs

L'analyse des extraits par l'HPLC a permis la mise en évidence de l'existence d'un nombre d'acides phénoliques et de flavonoïdes (**Tableau III.4**). Depuis le profil chromatographique (**Figure III.1, Annexe II**), l'extrait de *Rubus fruticosus*L présente un profil chimique composé de plusieurs polyphénols incluant huit acides phénoliques et huit flavonoïdes appartenant à différentes classes, la scutellarine en tant que flavone représente le composé phénolique majoritaire suivi par l'acide chlorogénique. La quercétine-3- β -D-glucoside représente le flavonol majoritaire suivi par la fisétine. En outre, l'acide Hydroxybenzoïque et le kampferol sont présent en faible quantité dans l'extrait de *Rubus fruticosus* L. Ces résultats concordent relativement avec les investigations phytochimiques de **Radovanović et al., (2013)** et **Milivojevic et al., (2011)** qui ont conduit à la caractérisation d'acides phénoliques tels que l'acide ellagique, gallique, caffeique et *p*-coumarique, et des flavonoïdes comme la quercétine hyperoside, kaempferol, myricitine, (+) catéchine, (-) épicatechine, épicatechine gallate, procyanidine et quercétine-3-D-glucoside, dans les fruits et les feuilles de *Rubus fruticosus* L. Les travaux de **Gudej et Tomczyk, (2004)** menés sur les feuilles de différentes espèces du genre *Rubus* y compris *Rubus fruticosus* L révèlent aussi la présence de l'acide éllagique, le kampherol et la quercétine.

Tableau III.4 : Composition phénolique des extraits de *Rubus fruticosus* identifiés par HPLC (Gudej et Tomczyk 2004).

Composés phénoliques	Classes	Temps de Retention (min)	<i>Rubus fruticosus</i> (µg/g extrait)
Acide Gentisique	Acide phénolique	4.55	74.46
Catechine	Flavanol	6.15	145.34
Acide chlorogénique	Acide phénolique	6.22	5918.51
Acide protocatechique	Acide phénolique	6.93	131.48
Acide 4hydroxybenzoïque	Acide phénolique	7.69	4.13
Acide caffeique	Acide phénolique	7.70	420.93
Acide vanillique	Acide phénolique	8.04	61.06
Acide syringique	Acide phénolique	9.35	145.72
Rutine	Flavanol	9.49	35.34
Acide ellagique	Acide phénolique	9.97	1367.81
glucoside	/	/	2247.62
Naringine	Flavanone	10.36	53.44
Fisetine	Flavanol	11.02	179.34
Scutellarine	Flavanone	11.02	13093.34
Néohesperidine	Flavanone	11.42	33.81
Kaempferol	Flavanol	16.84	13.95

Dans notre programme opératoire, nous avons envisagé de faire une analyse semblable pour voir l'influence de la méthode d'extraction et la nature des solvants sur la teneur des composés phénoliques extrait de la plante, et malheureusement cette analyse n'a pas pu être réalisée pour des raisons pandémiques.

III.2.3 Caractérisation par les méthodes spectrophotométrique

III.2.3.1 Caractérisation par spectrométrie UV Visible

Les spectres UV-visible des différents métabolites secondaires des extraits des feuilles de *Rubus Fruticosus L.* ont été enregistrés dans le domaine [400-800nm]. Les spectres UV-vis des tanins gallique contenu dans les extraits révèle une bande d'absorption à la longueur d'onde 750nm, caractérisation des tanins gallique (**Mole et Waterman ,1987**).

Les spectres UV-vis des tanins condensés contenu dans les extraits étudié révèlent une bande d'absorption à la longueur d'onde 550nm, caractérisation des tanins condensés (**Julkunen-Titto, 1985**).

Les spectres UV-vis des flavonoïdes contenu dans les extraits étudié révèle une bande d'absorption à la longueur d'onde 510nm, caractérisation des flavonoïdes (**Zhishen et al., 1999 et Kim et al.,2003**).

L'analyse des spectres UV-vis des polyphénols totaux contenu dans les extraits révèle une bande d'absorption à la longueur d'onde 765nm, caractérisation des polyphénols totaux (**Singleton et Ross, 1965**).

Les droites d'étalonnage pour les polyphénols, les flavonoïdes, et les tanins condensés (**Figure III.2, Figure III.3, Figure III.4**) respectivement sont représentés dans l'Annexe II.

La teneur en tannin gallique de l'extrait des feuilles de *Rubus Fruticosus L.* est de 2.31 % et est déterminée suivant la formule :

$$\text{TG (\%)} = (\text{Abs} \times \text{M} \times \text{V}) / \text{.E mole} \times \text{P}$$

La teneur en tannin condensé de l'extrait obtenu est estimée par dosage avec la méthode de la vanilline chloridrique, la catéchine a été utilisé comme standard. La droite d'étalonnage tracée, à partir des résultats obtenu, a l'équation suivante :

$$Y = 0.0002X + 0.019$$

$$R^2 = 0.997$$

La valeur est exprimé en équivalent de la catechine par poids de l'échantillon sec est vaut 0.092mg EC/g ES

La teneur en flavonoïde de l'extrait obtenu est estimée par dosage avec le chlorure d'aluminium, la quercétin a été utilisé comme standard. La droite d'étalonnage tracée, à partir des résultats obtenu, a l'équation suivante :

$$Y = 0.002X + 0.0139 \quad R^2 = 0.995$$

La valeur est exprime en équivalent de la quercetin par poids de l'échantillon sec est vaut 0.5908mg EC/g ES.

La teneur en polyphénols contenu dans l'extrait est estimée par dosage avec la méthode de Folin-Ciocalteu, l'acide gallique a été utilisé comme étalon. La droite d'étalonnage tracée à partir des résultats obtenus a l'équation suivante :

$$Y = 0.001X - 0.031 \quad R^2 = 0.996$$

La valeur est exprime en équivalent de l'acide gallique par poids de l'échantillon sec est vaut 0.008mg EC/g ES.

III.3 Evaluation de l'effet anti-radicalaire des extraits de *Rubus Fruticosus L.*

Les résultats du test de piégeage du DPPH et du test de dosage du pouvoir réducteur présentés sont issus d'un travail réalisé en avale par d'autres chercheurs (Afif Chaouche, 2015); ainsi que pour celles présentées pour le test de phosphomolybdate (Marhoune et Boulebtina, 2017).

Nous avons envisager de réaliser les tests de piégeage du radical DPPH, le dosage de la capacité anti-oxydante totale « test de phosphomolybdate », ainsi que le dosage du pouvoir réducteur « FRAP » sur les extraits que nous avons obtenu par les différentes méthodes d'extraction et voir l'influence de la méthode et le choix du solvant sur l'activité anti-oxydante des extrait, ça sera une perspective pour des études ultérieures.

III 3.1 Le test de piégeage du radical DPPH

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, plusieurs méthodes *in vitro* sont utilisées pour évaluer l'activité anti-oxydante. Le plus souvent il faut combiner les résultats de différents tests complémentaires pour avoir une indication sur la capacité anti-oxydante (Popovici et al., 2009).

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical synthétique présentant, à l'état oxydé, une intense coloration violette. La couche électronique de ce radical est saturée en contact d'antioxydants, ce qui explique la disparition de sa coloration (Figure III.5). Cette décoloration explique le pouvoir de l'anti-oxydant à piéger ce radical (Ghazghazi et al., 2013).

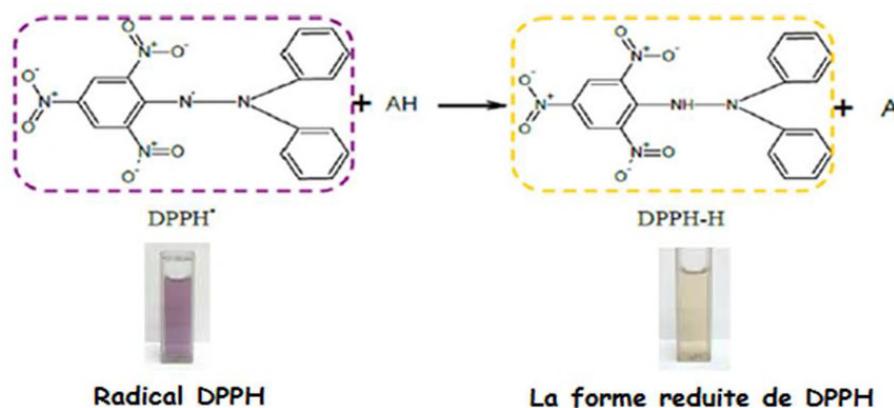


Figure III.5 : Forme réduite du radical DPPH (Molyneux, 2004)

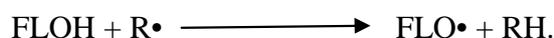
L'activité scavenger des extraits de *Rubus fruticosus L* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée par spectrophotométrie UV-vis en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

Les profils d'activité anti-radicalaire obtenus révèlent que les extraits de *Rubus fruticosus L* possèdent une activité anti-radicalaire dose dépendante, avec une $IC_{50} = 14.00 \pm 0.004$ ($\mu\text{g/ml}$)

L'extrait de *Rubus fruticosus*L montre une activité anti-oxydante importante avec une IC₅₀ très faible de l'ordre de 14 µg /ml. Une activité similaire 15,2 µg /ml du même extrait a été rapportée par **Salehi et al., (2013)**. Cependant, l'étude réalisée par **Asnaashar et al., (2015)** a révélé une faible capacité à piéger le radical DPPH avec IC₅₀ = 65,043 µg/ml . (**Mezite, 2018**).

L'activité importante de *Rubus fruticosus* L est probablement attribuée à sa haute teneur en composés phénolique et en flavonoïdes. En effet, les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnues comme des substances potentiellement anti-oxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires (**Zhang et Tsao, 2016**).

L'effet scavenger des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres (R•) par un transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyles. Cette réaction donne naissance au radical aroxyde (FLO•) et à la molécule radicalaire rendue stable (RH).



Le FLO• subira par la suite un réarrangement structurale permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation de radicaux aroxyde (**Mezite, 2018**).

De nombreuses études ont établi des relations entre la structure chimique des flavonoïdes et leur capacité anti-oxydante vis à vis du radical DPPH. L'activité de ces molécules dépend essentiellement de leur structure. Les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'- 4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (**Mezite, 2018**).

III.3.2 Dosage de la capacité antioxydante totale « test de phosphomolybdate »

La capacité anti-oxydante totale des deux extraits est exprimée en nombre d'équivalent d'acide ascorbique par g d'extrait sec (mg EAA/g EXS), à partir d'une

courbe d'étalonnage définie par leur équation linéaire ($y=0,4026x - 0,4761$; $R^2=0,995$) (Marhoune et Boulebtona, 2017).

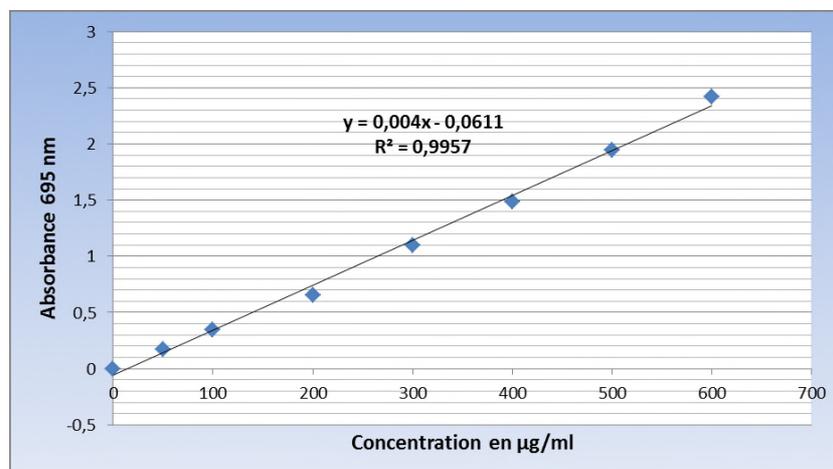


Figure III.6: Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique. (Moyenne \pm SD de trois essais)

Les capacités anti-oxydantes des deux extraits sont présentées dans la (Figure III.7) suivante (Marhoune et Boulebtona, 2017) :

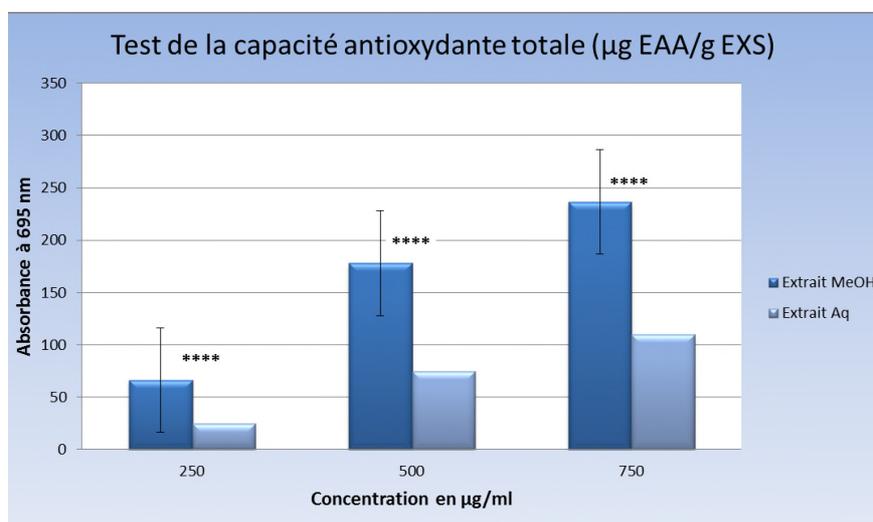


Figure III.7: Histogramme comparatif de la capacité antioxydante totale des deux extraits lors de développement de la concentration. (Moyenne \pm SD de trois essais).

La capacité anti-oxydante de nos extraits est dose dépendante. Cependant, l'extrait méthanolique se montre plus performant : à la dose maximale de 750µg/ml avec une capacité anti-oxydante de $236,5 \pm 1,145$ µg/ml , valeur hautement significative (P

≤ 0.001) vs la capacité antioxydante de milieu aqueux $109,866 \pm 0,635 \mu\text{g/ml}$, la capacité antioxydante total de l'extrait MeOH est 2 fois supérieure que l'extrait aqueux. Ces résultats indiquent qu'il existe une différence hautement significative entre les deux extraits.

III.3.3 Dosage du pouvoir réducteur « FRAP »

La technique FRAP, appelée également le test de réduction du fer, est considéré comme une méthode directe et rapide qui permet de mesurer la réduction du Fe^{3+} (fer ferrique) en Fe^{2+} (fer ferreux) en présence d'antioxydants. Cette réduction est rapide avec tous les réducteurs ayant des potentiels de la demi réaction de réduction supérieur à celui du couple $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ (Olszowy et widowicz, 2016).

L'extrait de *Rubus fruticosus* montre aussi une activité importante dans le test FRAP avec un pouvoir réducteur de l'ordre de 3,39 m mol FeSO_4/mg extrait.

Ces résultats est en concordance avec les travaux de (Belkacem et al., 2014 ; Parikh et Patel 2016) qui ont mis en évidence une corrélation réciproque entre la teneur des extraits en composés phénoliques et en flavonoïdes et leurs activité antioxydante dans les tests DPPH et FRAP.

Pour comprendre le mécanisme réactionnel des flavonoïdes dans la test FRAP, (Firuzi et al 2005) ont étudié le potentiel redox et le pouvoir réducteur de 18 flavonoïdes appartenant à différentes classes ; ils ont tiré comme conclusion que la capacité de ces molécules à réduire les ions ferreux dépend essentiellement de leurs structure et de leurs potentiel redox ; les flavonoïdes les plus actif (quercétine, fisétine et myricetine) possèdent un potentiel redox faible (+0,3 - 0,39V) et renferme des groupement O-dihydroxy dans le cycle B , 3-hydroxy et une double liaison 2-3 dans le cyle C. L'étude phytochimique des deux extraits qui a révélé la présence de quercetin-3- β -D-glucoside et de fisétine dans l'extrait de *Rubus fruticosus* explique le pouvoir réducteur puissant montré par cet extrait.

III.4 Pouvoir antimicrobien des extraits des plantes

III.4.1 Etude qualitative

L'étude qualitative du pouvoir antimicrobien des extraits bruts de, *R. fruticosus* est évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

Selon l'effet des extraits de la plantes, on remarque qu'*E. coli* est sensible aux flavonoïdes avec des zones d'inhibition atteignant les 21,5 mm. Les souches d'*Acinetobacter baumannii* sont toutes sensibles aux flavonoïdes, avec des zones d'inhibition de 21,6 mm. *Burkholderia cepacia* est une bactérie généralement sensible à certains antibiotiques comme la pipéraciline, la ceftazidime et la ciproflaxine (Plésiat, 1999), parfois résistante à d'autres. Dans ce travail, elle n'a montré aucune résistance vis-à-vis des extraits. Avec les flavonoïdes, les diamètres d'inhibition atteignent 26,0 mm, qui est une zone d'inhibition très importante. Pour *Enterobacter cloacae*, elle est sensible à tous l'extraits testés, mais ne présente pas de diamètres d'inhibition très grands comme pour *Burkholderia cepacia* par exemple. Le diamètre d'inhibition calculé est de 15,1 mm, enregistré avec les flavonoïdes. Certaines souches de *Klebsiella pneumoniae* sont résistantes aux extraits, d'autres en sont sensibles. La plus sensible présente un diamètre d'inhibition de 16,9 mm aux flavonoïdes. *Haemophilus Influenziae* est aussi une bactérie qui s'est montrée sensible a l'extraits de la plante étudiée. Pour *Pseudomonas aeruginosa*, elle présente un petit diamètre d'inhibition. Concernant *Pseudomonas fluorescens*, il s'avère qu'elle est considérablement sensible aux flavonoïdes de la ronce avec un diamètres d'inhibition allant jusqu'à 25,1 mm. Pour les souches de *Corynebacterium diphtheriae*, la plupart d'entre elles ne sont pas très sensibles aux extraits flavonoïdiques de la plantes étudiée. *Staphylococcus aureus*, bactérie renommée par sa résistance, était moyennement sensible aux flavonoïdes des plantes étudiées. Quant à *Streptococcus pneumoniae*, les flavonoïdes de *Rubus Fruticosus L.* ont donné un diamètre d'inhibition de 26,1 mm.

La seule levure isolée dans ce travail, *Candida albicans*, elle s'est révélée largement sensible et a montré sa plus grande sensibilité face à l'extrait flavonoïdique de la Ronce (22,6 mm). (Afif Chaouche, 2015).

III.4.2 Concentrations Minimales Inhibitrices

Les CMI obtenues concernant les flavonoïdes sont comprises entre la dilution $\frac{1}{2}$ (42,13 mg/ml) pour *E.coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *C. diphtheriae*, *E. cloacae* et la dilution $\frac{1}{64}$ (1,31mg/ml) pour *B. cepacia*, *P. fluorescens*, *S. aureus*. Les huit souches qui ont montré une résistance pour ces métabolites secondaires sont *E. coli* (2), *P. aeruginosa* (1), *H. influenzae* (2), *S. pneumoniae* (2)

et *C. diphtheriae* (1). (Cavanagh *et al.* (2003) ont enregistré un effet bactériostatique des métabolites secondaires de *Rubus Fruticosus* L. sur la croissance des souches microbiennes. (Krisch *et al.* 2008) ont montré que l'extrait méthanolique des parties aériennes de *R. fruticosus* inhibe la croissance de *M. tuberculosis* avec une CMI de 1 mg / ml. (Riaz *et al.* (2011), en étudiant l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de diverses parties de la plante, ont noté que tous les extraits testés ont inhibé la croissance des bactéries suivantes: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacteri sp.* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'ordre de puissance de l'inhibition, selon les parties de la plante, décrit par ces auteurs est: racines > feuilles > fruits. Les mêmes auteurs ont également analysé le pouvoir antifongique de l'extrait méthanolique contre neuf souches de champignons pathogènes (*Yersinia aldovae*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus effusus*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani*, *Trichophyton rubrum*, *Saccharomyces cerevisiae*) sans enregistrer aucune activité inhibitrice. Pour *Candida albicans*, les flavonoïdes ont exercé une bonne activité avec une CMI allant jusqu'à la dilution 1/16 (5,26 mg/ml) (Afif Chaouche, 2015).

Conclusion

Les plantes représentent un réservoir immense de métabolites secondaires qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Elles sont utilisées depuis longtemps et leur utilisation s'inspire des expériences des populations ainsi que de la médecine traditionnelle. Cependant, cette utilisation ne suit pas des règles scientifiques précises et ne tient pas compte des mécanismes thérapeutiques. Pour cela, des recherches se sont orientés vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes. (Meziti, 2018)

Le *Rubus Fruticosus L.* est une plante aussi riche en composés bioactifs que de nombreuses autres plantes médicinales présentent en grande quantité sur notre territoire.

Les résultats des études faites sur les feuilles du *Rubus Fruticosus L.* montrent que le choix de la méthode et du solvant d'extraction influe de manière directe sur le rendement. L'analyse photochimique des extraits révèle la richesse des feuilles de *Rubus Fruticosus L.* en métabolites secondaires à savoir les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins et confirme les données bibliographiques.

D'après l'analyse des résultats de l'évaluation de l'effet anti-radicalaire par les méthodes ; DDPH, la FRAP ainsi que le test de phosphomolybdate, on peut déduire que la capacité des tanins à réduire les radicaux libres est attribué à leurs structure chimique spécifique.

Nous avons envisagé dans notre étude de faire des extractions avec différentes méthodes dites conventionnelles à savoir par infusion, par macération et par irradiations micro ondes dans différents solvants et faire une études comparative pratique sur l'effet de la méthode d'extraction et la nature du solvant sur le rendement des métabolites secondaires extraits et leurs qualités sur le plan activité biologique antibactériennes et anti-oxydantes et confirmer ses propriétés thérapeutiques observées par son utilisation traditionnelle et démontrées par des travaux antérieures cités par la bibliographies. Notre objectif été aussi l'élaboration d'un sirop pharmaceutique à base de cet extrait végétale riche en métabolites secondaires qui sera prescrit comme un remède antioxydant et anti bactérien disponible au niveau des officines.

Références bibliographiques

A

Afif Chaouche T., (2015). Etude ethno-pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de quelques plantes médicinales de la région de TiziOuzou – Algérie, Doctorat en Microbiologie appliquée, Université AbouBekrBelkaid Tlemcen.

Aliouat F., (2014). Etude des activités antioxydantes et antiprolifératives réalisées in vitro des extraits méthanoliques fruit et partie aérienne (feuilles et tige) d'une plante médicinale : *Rubus Ulmifolius* Schott (la ronce). Mémoire Master. Université de Blida I.

Amarowicz R., Pegg R. B., Rahimi-Moghaddam P., Barl B., & Weil, J. A. (2004). Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551 – 562.

Anani H., Belhadi K., (2018). Extraction d'une substance active de la plante *Inula Viscosa* et l'étude de son activité hémostatique, Mémoire de Master en Génie des Procédés Pharmaceutique. Université de Abderrahmane Mira Bejaia.

B

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C. et Pinkas M., (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneim-Forsch/Drug Research*, 46: 1086-1108.

Bamforth, P. B., (1999). "The derivation of input data for modelling chloride ingress from 391 eight-year UK coastal exposure trials". *MagConcrRes*.

Barka D., Medjahed A., (2017). Optimisation des paramètres de préparation de deux tisanes traditionnelles en se basant sur le potentiel phénolique. Mémoire master en Bioprocédés et Technologie Alimentaire. Université Abderrahmane Mira Bejaia.

Barka I., (2017). Inventaire des plantes médicinales de la réserve de Chasse Moutas (Tlemcen). Mémoire de Master en Pathologie des écosystèmes. Université Abou BakrBelkaid de Tlemcen.

Belkacem N., Djaziri R., Lahfa F., El-Haci IA., Boucherit Z., (2014). Phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activity of various *Punicagranatum* L. Peel extracts from Algeria: A comparative study. *Phytothérapie*. 12(6):372-379.

- Belyagoubi et Benhammou N., (2011).** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et Sud-Ouest Algérien. Algérie.
- Ben Nacer C., Ayed N. et Match M. (1996).** Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Z lebensmUntersFrosch*, 203:374-378.
- Bennouar, Y. Chekakta, S., (2017).** « Etude phytochimique et biologique chez l'espèce *Urticadioica* au niveau des deux parties : racinaire et aérienne ». Thèse de Master, Département de Biologie et Ecologie Végétale.
- Berlencort A., (2008-2013).** Huiles essentielles, Aromatherapie Histoire review of medicinal plants' 10.413/0973-7847.95849) .
- Bezanger-Beauquesne, L., Pinkas, M., Torch, M., (1986).** Les plantes dans la thérapeutique moderne, 2ème édition révisée, Ed. Maloine éditeur.
- Boizot N., Charpentier J-P., (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Cahier des techniques de INRA, numéro spécial : 79-82.
- Bock B., (2013).** La ronce des haies. *Tela Botanica*. BDNF. 4(2):1-3
- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B. (2003).** Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Glyco.Science & Nutrition*. 4(6):7p.
- Bruneton J., (1987).** Éléments de phytochimie et de pharmacognosie, Ed. Tec & Doc Lavoisier.
- Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Ed Tec & Doc. Paris : 309-353.
- Bruneton J., (2009).** Pharmacognosie: Phytochimie, Plantes médicinales. 4^{ème} édition. Edition *Lavoisier Tec & Doc. Médicales Internationales, Paris*, p 261 , 308 , 571.

C

- Cermak R., Follmer U., Wolfram S., (1998).** Dietary flavonol quercetin induces chloride secretion in rat colon. *Am J Physiol*. 275: G1166_ G 1172.
- Chung, Y. C., Chang C. T., Chao W. W., Lin C. F., & Chou S. T. (2002).** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 50, 2454 – 2458.

D

Demirtas I., Erenler R., Elmastas M., Goktasoglu A., (2013). Studies on the antioxidant potential of flavones of *Allium vineale* isolated from its water-soluble fraction. *FoodChem.* 136:34-40.

Dévoyer J., (2012). Stéphane Kosia-Meffre, rédacteur et coordinateur du guide des plantes qui soignent (éd. Vidal). Publié le 28.09.2012.

Dries S., Aggoune M.,(2019).Extraction des composés phénoliques de l'écorce de grenade *punicagranatum L.* et l'évaluation de leurs activités antioxydante et antibactérienne, Mémoire de master en génie des procédés pharmaceutique, Université de Bejaia.

F

Fabien C., (2009). Biotéchnologie 26 fiches. Dunod. Paris. 1^{ère} édition. P : 110-111-

113. **Fernandez M., (2003).** De quelques plantes dites médicinales et de leurs fonctions, éd. Aenigma, page 09.

Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L., (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *BiochimBiophys Acta.* 1721:174-184.

Florence Boyer. (2016). Stress oxydant et pathologie diabétique : impact de l'hyperglycémie et de l'albumine glycosylée sur les cellules cardiaques et adipeuses. Médecine humaine et pathologie. Université de la Réunion. *FoodChemistry*, 103:381–388.

Fonteneau J., Klusiewicz P., (2008). Travaux pratiques de préparation et de conditionnement des médicaments.

Fournier PV.,(2010). Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France. Pris : Omnibus. P : 529-836.

G

Ghazghazi H., Chedia A., Abderrazak M., Brahim H., (2013). Comparaison des contenus en polyphénols et de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques de quatre plantes collectées du nord de Tunisie. *MicrobiolHygAlim.* 25(73):37-41.

Gomar A., Hosseini A., Mirazi N., (2014). Preventive effect of *rebus friculosus* on learning and memory impairment in an experimental model of diabetic neuropathy in male rats. *pharmaNutrition.* 2(4):155-160.

Guelil S., (2018). Extraction et analyse des principes actifs d'une plante médicinale « *urticaDioica* » et applications thérapeutiques, mémoire master en génie des procédés pharmaceutique Université de Bejaia.

Gudej J., Tomczy KM., (2004).Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus*L.species. *ArchPharmRes.* 27(11):1114-1119.

H

Halou N., Bali O., (2019). Extraction des composés phénoliques de *Cartamus caeruleus* L et l'évaluation de leurs activités antioxydante, antibactérienne et cicatrisante, mémoire de master en génie des procédés pharmaceutique, Université de Bejaia.

Hamia C., Guetgab A., Rennane N., Birache M., Haddad M., Saidi M., et Youcef M., (2014), Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du *Rhanterium adpressum*. *Annales des sciences et technologie.* Vol 6. N°1.

Harborne J. B., (1997). Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* 1997;14: 83-98.

Haslam E., (1993). Polyphenol complexation. In: « Polyphenolic phenomena ». Ed. Scalbert.

Havsteen B. H., (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 96:67-202.

Hendrich B. A., (2006). Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacologica Sinica.* 27(1): 27-40.

Hir A., Chaumeil J.-C., Brossard D., (2009). Pharmacie galénique bonne pratiques de fabrication des médicaments. 9e édition.

I

Imami L., Tourat A., (2016). Contribution à l'étude phytochimique (les polyphénols) de deux espèces *Pimpinella anisum* L. et *Peganum harmala* L., mémoire master 2, Université de Constantine.

Issaadi O., (2010). Etude comparative des activités antioxydantes de deux fruits : la mûre et l'arbose, en vue de l'obtention du diplôme de Magister en science Alimentaire, option contrôle de qualité des aliments, certification et méthodes de validation, Université Abderrahmane Mira de Bejaia.

J

Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., et Stevens P., (2002). Botanique Systématique : une perspective phylogénétique. Ed 1: DEBOECK. 84-336 p.

Julkunen-Titto R.,1985. "Phenolic constituents in the leaves of northern willows methods for the analysis of certain phenolics" Journal of Agricultural and Food chemistry, Vol. page: 213.

K

Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M., (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food chemistry Page 550–557. **Kim D.,**

Chun O. Kim Y., Moon H., Lee C., (2003). Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums" J. Agric. Food Chem., Vol. (51), page: 6509. **Konkon N G., Simaga**

D and Adjoungova A., (2006). Etudes phytochimique de mitragynaine (willd.) o. ktze (rubiaceae), plante à feuille antibiotique, pharm Med trad Afr. Vol. 14, pp 73-80.

L

Lagnika, L., (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises « thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg, page :249.

Laraba M., Serrat A., Ouassaa G., (2016). Etude in vitro de l'activité antioxydante des polyphénols isolés à partir d'une plante médicinale, Mémoire Master en Biologie Animale, Université Frères Mentouri Constantine.

Lim T. K., (2012). Edible Medicinal and Nono-Medicinal Plants. Springer. 4: 544-554.

M

Mahdjar S., (2013). Contribution à l'étude de la composition chimique de la plante *Matricaria pubescens* et à l'évaluation de son activité antioxydante. Mémoire de Master Académique. Université Kasdi Merbah Ouargla.

Makkar H.P.S., Siddhuraju P., et Becker K., (2007). Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology 393. Ed: HUMANA PRES. 67-111 p.

Makkar H.P.S., (2000). "In Quantification of tannins in tree foliage" Working document, FAO/IAEA, Vienna.

Mamadou B., (2002). Action pharmacologiques des tanins. Thèse de doctorat. Université Cheik Anta Diop de Dakar. 57.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jiménez L. (2004). Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. Journal Clin.Nutrition.*79: 727-747.

Marhoune N., et Boulebtina F., (2017). Extraction des polyphenols ou flavonoïdes des feuilles de mures sauvage (*Rubus Fruticosus*) par le méthanol ou dans un milieu aqueux : *Teste de tolérance ou glucose et activité anti-oxydante*, Mémoire de Master en Biochimie/Nutrition Moléculaire et Santé, Université frères Mentouri Constantine.

Mehradj S., (2003). Contribution à l'étude de la composition de la plante *Matricaria pubescens* et à l'évaluation de son activité antioxydante. Mémoire de master académique Université Kasdi Merbah Ouargla.

Meziti A., (2018). Régulation de l'inflammation par les extraits de *Rubus fruticosus* et *Zizyphus vulgaris*, Doctorat en Biochimie, Université Ferhat Abbas Sétif 1.

Miliojevic J., Maksimovic V., Nikolic M., Bogdanovic J., Maletic R., Milatovic D., (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *fragaria and rubus berries*. *J Food Quality.* 34:1-9.

Mole S., Waterman P.G. (1987). Tannic acid proteolytic enzymes: enzyme inhibition substrate derivation. *Phytochemistry*, 26, 99-102.

Molyneux, P., (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarim J .Sci .Technol*, 26, 211 – 219.

Moreau B., (2003). Maître de conférence de pharmacognosie à la faculté de pharmacie de Nancy. Travaux dirigés et travaux pratiques de pharmacognosie de 3ème année de doctorat de pharmacie.

Morris J., Bitzer & Joe D., (septembre 1987). Fox Processing Sweet Sorghum for Syrup [archive]. AGR-123, Univ. of Kentucky.

N

Negi P.S, Jayaprakasha G.K., et Jena B.S., (2003). Antioxydant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 80:393-397.

O

Olszowy M., Dawidowicz AL., (2016). Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. *Monatsh Chem.* 147:2083-2091.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior R. L., (2001).Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 49, 4619 – 4626.

P

Paré J.R.J., Sigouin M., et Lapointe J., (1990). Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. *Brevet européen*, EP 398798.

Parikh B., Patel V.H., (2017).Quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of an underutilized Indian fruit: Rayan [*Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard]. *FSHW*.6(1):10-19.

Pharmacopée Européen édition 5.5

Pharmacopée européenne, VIe éd. Janvier .2008.

Pharmacie galénique chapitre IV/ Tome1, (juin 2008). Les formes pharmaceutiques V.3.0 page 7/28 (<https://fr.slideshare.net/fibustier/chapitre-iv-tome-1-formes-pharma>).

Plésiat P., (1999). Résistance aux Antibiotiques des Espèces du Complexe Burkholderiaceae UFRSMP Besançon.

Price, M.L., Van Scoyoc, S., et Butler L.G., (1978). A critical evaluation of the vanillin Reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5) : 1214-1218.

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269, 337 – 341.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* .4:25-39.

Popovici, C., Saykova I., & Tylkowski B., (2010). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie Industriel*, (4), 1– 8.

Prescrire., (2007). Bien utiliser les plantes en situations de soins, numéro spécial été T. 27, n°286.

Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar M., (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem*, 269, 337 – 341.

Psova J., Kolar M., Sousek J., Švagera Z., Vicar J., Ulrichova J., (2003) Biological activities of *Prunella vulgaris* extract. *Phytother Res* 17:1082-1087.

R

Radovanović Bc., Anđelković AM., Radovanović Ab., Anđelković MZ., (2013). Antioxidant antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Trop J Pharm Res.* 12 (5):813-819.

Rameau JC., Mansion D., Dumé G., Gauberville C., Bardat J., Bruno E., Keller R., (2008). Flore forestière française : guide écologique illustré. Région méditerranéenne, Paris : Institut pour le développement forestier. P:1019-1020.

Riaz M., Mansoor A., Najmur R., 2011. Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus* L. university of Karachi-75270. Pakistan. 5(24):5920-5924.

S

Saadi M., Saudi Y., (2018). Elaboration d'une pommade pharmaceutique à effet antibiotique et antifongique à base d'une substance active naturelle feuille d'olivier (TAKSRIT), Mémoire de master en génie des procédés pharmaceutique, Université de Bejaia.

Sanago R., (2006). Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université

Sanchez-Moreno, C., (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Food Science and Technology.* 8: 121- 375.

Schofield P., Mbugua D. M., Pell A. N., (2001). "Analysis of condensed tannins" a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* Vol. (91), page : 21.

Seidel V., (2005). Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Totowa: Humana Press. pp: 27-37.

Silverstein, R., Basler, G-C., Morill, T. C., (1998). Identification spectrométriques des composés organiques. De Boeck (Ed). Bruxelles, 411p.

Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M., (1999). « Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent » *Methods Enzymol.*, Vol. (299), page : 152.

Singleton V.L., Rossi J.R., (1965). « Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid » *Am. J. Enol. Vitic.* Vol. (16) page : 144.

Sun, B., Richardo-da-Silvia, JM., Spranger, I., 1998. "Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins" *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. (46), page : 4267.

T

Turemis N., Kafkas E., Kurkcuoglu M., Baser KHC., (2003). Determination of aroma compounds in blackberry by GC/MS analysis. *Chem. Nat Compd.* 39:174-176. **Tim Cushnie T.P., Lamb J. A., (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 26:343-356.

U

Urquiaga L., et Leighton F., (2000). Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research.*

V

Verdrager J., (1978). Ces médicaments qui nous viennent des plantes. Ed. S. A. Maloine. P.12-15.

W

Wehrlen L., (1985). La Ronce (*Rubus fruticosus* L. agg) en forêt, vol :37 n :4, 288-304p

Wehrlen L. (1689). La Ronce (*rubus fruticosus* L. agg.) en forêt, vo : 37, n :4, 288-304 p

Wichtl M., Anton R., (2003). Plantes thérapeutiques – Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2ème édition, Ed. TEC & DOC.

Wollgast J., Anklam E., (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Int.* 33:423-447.

X

Xia EQ., Deng GF., Guo YJ., Li HB., (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci.* 11:622-646.

Z

Zhang S.Y., Zheng C.G., Yan X.Y., Tian W.X.,(2008).Low concentration of condensed tannins from catechu significantly inhibits fatty acid synthase and growth of MCF-7 cells.*Biochemical and Biophysical Communications* 371pp. 654-658 10.1016/j.bbrc.2008.04.062.

Zhang H., Tsao R., (2016).Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects.*Curr Opin Food Sci.* 8:33-42.

Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W.,(1999). "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals" *J Food Chem*, Vol. (64), page : 555.

Zia-Ul-Haq M., Riaz M., Vincenzo De Feo, Hawa Z. E. Jaafar, Marius Moga, (2014). *Rubus Fruticosus L.: constituents biological activities and health related uses. Molecules.* 19:10998-11029.

Site web

<https://homeocan.ca/boutique/rubus-fruticosus-bio-60-ml-gemmo-professional/>

<https://lapara.ca/products/rubus-fruticosus>

<https://www.aroma-zen.com/therapies-naturelles/gemmotherapie/bourgeons/ronce-rubus-fruticosus-bourgeon-30ml-biologique-saint-hilaire-p-3191.html>

<https://www.gagneensante.com/products/rubus-fruticosus-g37>

<https://www.illicopharma.com/teinture-mere-goutte-ampoule/8897-rubus-fruticosus-jpousses-gouttes-3400388204804.html>

Annexes

Annexes I : Produits chimiques et réactifs

Tableau II.1 : Les réactifs et leurs propriétés.

REACTIF	FORMULE CHIMIQUE	MASSE MOLAIRES (g/mol)	PURTE %
Acetate d'éthyl	C ₄ H ₆ O ₂	88,11	99,8
Acetonitrile	C ₂ H ₃ N	41,05	/
Acide Chlorhydrique	HCl	36,46	35_38
Acide Formique	CH ₂ O ₂	46,03	/
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	98,079	/
Acide trichloralitique	C ₂ HCl ₃ O ₂	163,38	/
Carbonate de Sodium	Na ₂ CO ₃	105,98	99,8
Chlorure d'Aluminium	AlCl ₃	133,34	95_98
Chlorure de fer III	FeCl ₃	162,2	/
Chlorure de Sodium	NaCl	58,44	
Dichloromethane	CH ₂ CL ₂	84,93	100
Eau distillé	H ₂ O	18	/
Ethanol	C ₂ H ₆ O	46,07	96
Ferricyanure de potassium	C ₆ FeK ₄ N ₆	368,343	/
Folin-cioaltea	/	/	/
Hydrogènephosphate de sodium	Na ₂ PO ₄	141,958	/
Hydroxyde de sodium	NaOH	39,997	/
Methanol	CH ₃ OH	375,13	99
Nitrite de sodium	NaNO ₂	68,9953	99
Vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	152,15	99

II. Préparations des Réactifs

Le réactif Folin-cioaltea : (1 ml réactif dans 10ml de H₂O).

Vanilline : 1 g de vanilline complété avec 100ml de H₂O.

FeCl₃ 0.1% : dissoudre 0.1 g de la poudre dans une fiole.

Na₂CO₃ 2% : dissoudre 2 g de la poudre dans une fiole.

AlCl₃ 2% : dissoudre 2 g de la poudre dans une fiole.

Annexes II : Caractérisation qualitative des composés phénoliques

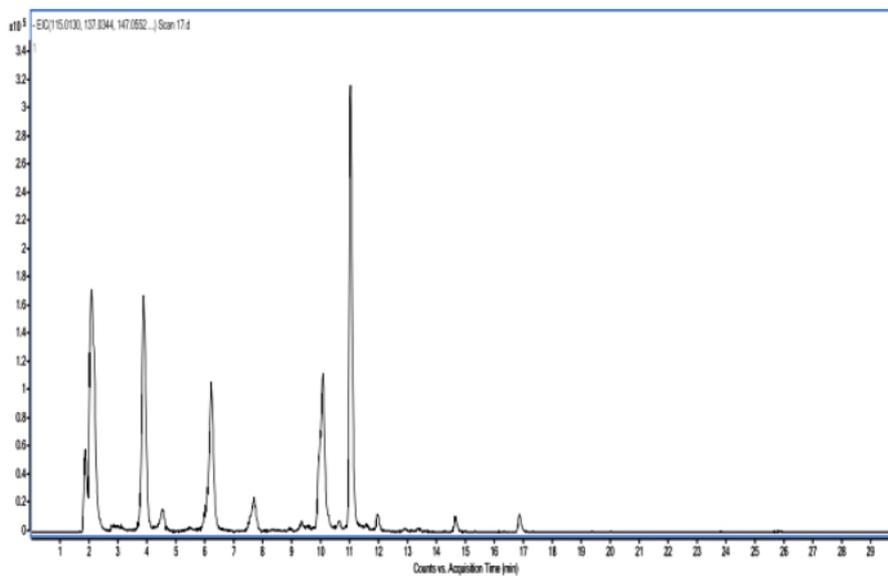
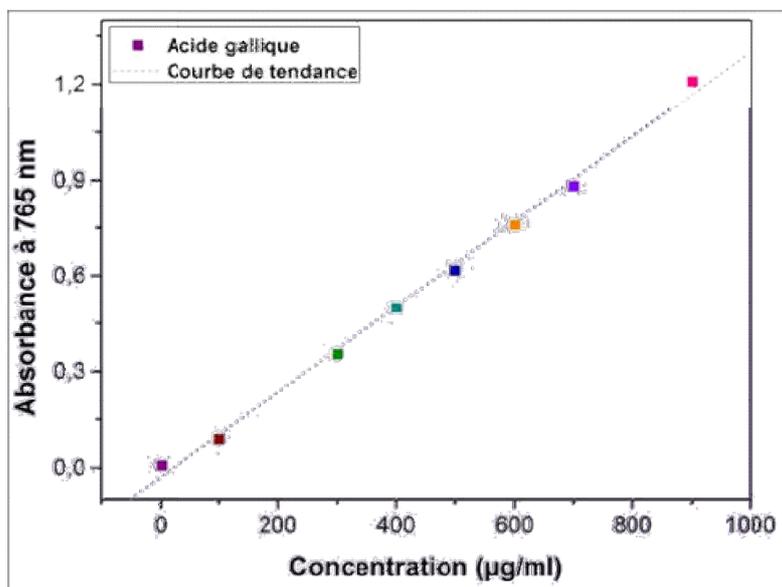
Figure III.1 : Profil chromatographique des extraits de *Rubus fruticosus L.*

Figure III.2: Droite d'étalonnage de l'acide gallique

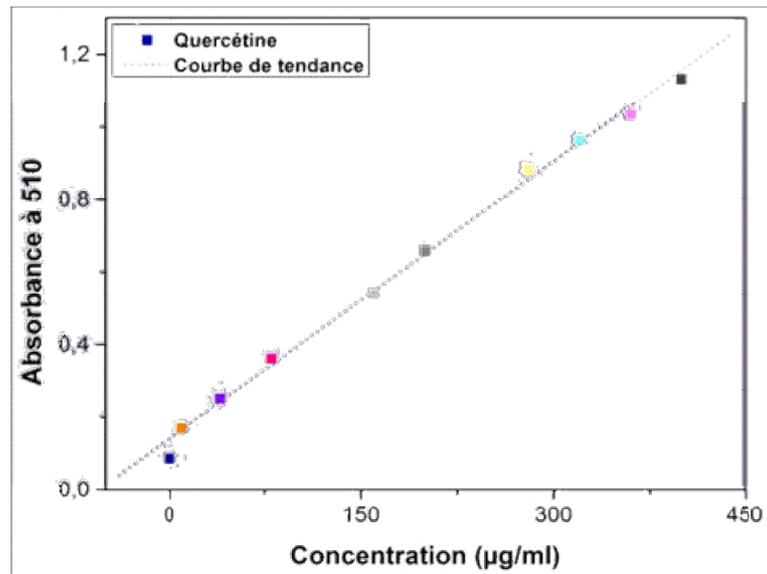


Figure III.3 : Droite d'étalonnage de la quercétine

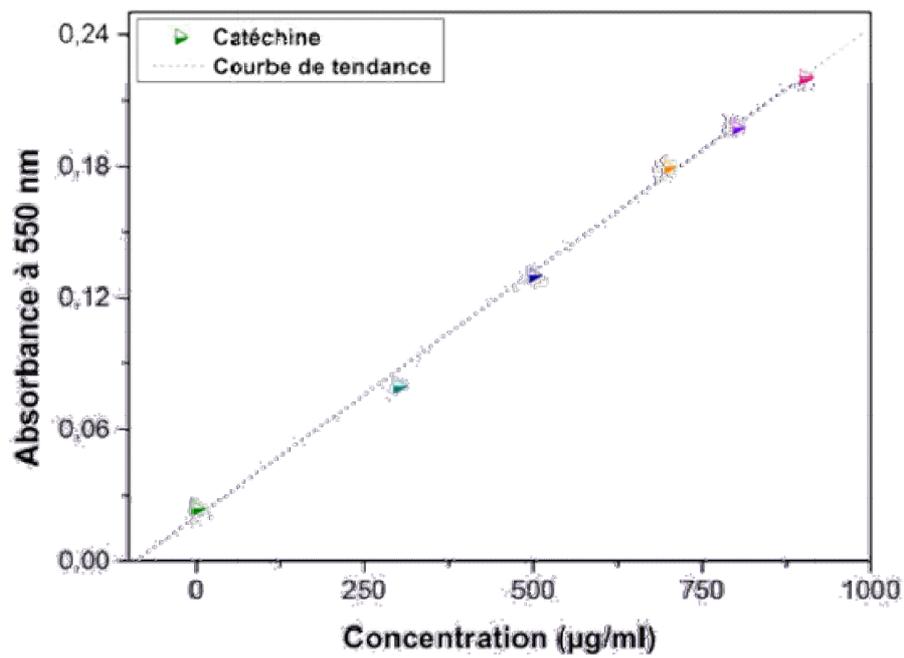


Figure III.4 : Droite d'étalonnage de la catechine

Résumé :

Le *Rubus Rruticosus L.* Communément appeler la Ronce ou Muries sauvage est l'une des plante médicinale exploité en raison de ses propriétés thérapeutiques. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour le traitement des bronchites et l'arthrose.

Le but de notre étude et l'extraction des métabolites secondaires présents dans les feuilles de cette plante: les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins condensés ainsi que les tanins hydrolysables avec différentes méthodes d'extractions à savoir par infusion dans l'eau, par macération dans un solvant hydroalcoolique et par micro odes pour mettre en évidence l'effet de ses paramètres expérimentaux sur l'efficacité biologique des métabolites extraits comme antibactériens et comme antioxydants et la confection d'un sirop pharmaceutique à base de ces principes actif. La nature chimique de ses métabolites a pue être déterminer par des méthodes phytochimiques de colorations et précipitations et par des méthodes spectrophotométrique (Uv-vis et IR), par les méthodes chromatographiques (chromatographie sur Couche Mince CCM, chromatographie liquide a haute performance HPLC)

Les résultats positifs référencés de l'activité anti-oxydante de ces métabolites ont été évalué par le test de DDPH, test de FRAP ainsi que le test de phosphomolybdate. Les résultats positifs référencés des tests antibactériens montrent l'efficacité de *Rubus Fruticosus L.* contre certaines bactéries

Mots clés : les feuilles de *Rubus FRuticosus L.*, méthodes d'extraction, activités antioxydante, activité antibactérienne, métabolite bioactifs, composés phénoliques

Abstract

The *Rubus Rruticosus* L. Commonly called the wild Bramble or Muries is one of the medicinal plants exploited because of its therapeutic properties. It is used in traditional medicine for the treatment of bronchitis and osteoarthritis.

The aim of our study and the extraction of the secondary metabolites present in the leaves of this plant: polyphenols, flavonoids, condensed tannins and hydrolysable tannins with different methods of extraction namely by infusion in water, by maceration in a hydroalcoholic solvent and by micro odes to highlight the effect of its experimental parameters on the biological effectiveness of the extracted metabolites as antibacterial and antioxidant and the preparation of a pharmaceutical syrup based on these active ingredients. The chemical nature of its metabolites could be determined by phytochemical methods of staining and precipitation and by spectrophotometric methods (Uv-vis and IR), by chromatographic methods (Thin Layer Chromatography TLC, High Performance Liquid Chromatography HPLC).

The referenced positive results of the antioxidant activity of these metabolites were evaluated by the DDPH test, FRAP test and the phosphomolybdate test. The referenced positive results of the antibacterial tests show the effectiveness of *Rubus Fruticosus* L. against bacterial ceratins.

Keywords : *Rubus FRuticosus* L. leaves, extraction methods, antioxidant activity, antibactérienne activity, bioactive metabolite, phenolic compounds, phenolic compounds.