

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE MASTER  
EN BIOLOGIE

OPTION : GENIE BIOLOGIQUE

THÈME :

**Etude des activitésantioxydantes et antiproliférativesréalisées  
in vitro des extraitsméthanoliques fruit et partie aérienne  
(feuilles et tige) d'une plante médicinale :  
*Rubus ulmifolius* Schott (la ronce)**



Présenté par :

Soutenu le : 18/12/2014

M<sup>elle</sup> : ALIOUAT FATMA

Devant le jury composé de :

Mr MOHAMED SAID R.	MAA	USDB	PRÉSIDENT DE JURY
Mr BOUKHATEM M.N.	MCB	USDB	EXAMINATEUR
Mme SAÏDI F.	PROFESSEUR	USDB	PROMOTRICE
Mme BRAHIM ERRAHMANI D.	M A	USDB	CO-PROMOTRICE

2013/2014

## RESUME

L'objectif assigné à notre travail consiste à l'étude comparative de l'activité antioxydante et antiproliférative de l'extrait méthanolique du fruit et de la partie aérienne de *Rubus ulmifolius* Schott appartenant à la famille des rosaceae.

Le screening phytochimique a révélé la présence des métabolites secondaires tel que : flavonoïdes, tannins et anthocyanes au niveau de la partie aérienne et du fruit et présence de saponine dans la partie aérienne de la plante.

Le dosage des polyphénols a donné une teneur dans la partie aérienne **31, 71 ± 0,02**mg EAG /g Ps contre **11,13 ± 0,02**mg EAG /g Ps pour le fruit.

L'extrait méthanolique de partie aérienne (tiges et feuilles) de *Rubus ulmifolius* a démontré une activité antioxydante intéressante à l'aide du test chimique au DPPH estimée par IC 50 et égale à **16, 12 ± 0,9 µg / ml** contre **93, 58 ± 0,32 µg/ ml** pour le fruit.

La partie aérienne (tiges et feuilles) a révélé une activité antiproliférative remarquable avec une inhibition de 100 % de *Saccharomyces cerevisiae* pour une concentration de 3 mg supérieur à celle du fruit (18%) est comparable à celle du médicament de référence l'Hydréa pour la même concentration.

Mots clés : *Rubus ulmifolius* Schott, activité antioxydante, DPPH, activité antiproliférative.

## ABSTRACT

The aim of this work is the comparative study of the antioxidant and antiproliferative activity of the methanol extract of the fruit and the aerial part of *Rubus ulmifolius* Schott belonging to the family Rosaceae.

The phytochemical screening has revealed the presence of secondary metabolites such as flavonoids, tannins and anthocyanin in the aerial part and fruit and the presence of saponin in the aerial part of the plant.

The content of polyphenols in the aerial part is **31, 71 ± 0,02** mg EAG /g Wd against **11,13 ± 0,02** mg EAG /g Wd for the fruit.

The methanol extract of *Rubus ulmifolius* has shown interesting antioxidant activity using the DPPH test chemical IC<sub>50</sub> is about **16, 12 ± 0.9 µg / ml** against **93, 58 ± 0.32 µg / ml** for the fruit.

The aerial plant part revealed a remarkable antiproliferative activity with a 100% inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* for a concentration of 3mg higher than that of the fruit (18%)

The antiproliferative activity of aerial plant is comparable to that of the reference drug hydroxyurea for the same concentration.

Key word: *Rubus ulmifolius* Schott, antioxidant activity, DPPH, antiproliferative activity.

## ملخص

هذه الدراسة تهدف الى اجراء مقارنة بين مستخلص الميثانول للجزء الهوائي و الثمرة لنبته العليق

التابعة لعائلة الورديات (*Rubus ulmifolius* Schott. (ROSACEAE).

يكن هدف المقارنة في دراسة خاصيتين و هما خاصية مضاد الأكسدة و خاصية تثبيط التكاثر الخلوي

-أظهرت نتائج دراسة المكونات الكيميائية لنبته العليق ما يلي :

وجود مركبات الفلافونويد و حمض الطنطاليك و الانثوسيانين في الجزء الهوائي والثمرة وجود مادة السابونين في الجزء الهوائي فقط .

- قدرت كمية متعدد الفينول في الجزء الهوائي ب  $0.2 \pm 31.73$  مغ / مكافئ لحمض الغاليك / للوزن الصافي مقابل  $0.02 \pm 11.13$  في الثمرة .

- أظهرت دراسة النشاط المضاد للأكسدة (تجربة التثبيط DPPH) أن مستخلص الميثانول للنبته العليق يتميز بنشاط مضاد للأكسدة و الذي يقدر بـ 16.12 ميكروغرام/ ملل معطى من قبل الجزء الهوائي مقابل  $0.32 \pm 93.58$  ميكروغرام / ملل معطى من قبل مستخلص الثمرة .

- تبين من خلال دراسة نشاط تثبيط التكاثر الخلوي لمستخلص الميثانول و التي أجريت على خلية خميرة الجعة

*Saccharomyces cerevisiae*:

100% من خلايا الخميرة تم تثبيطها من قبل مستخلص الجزء الهوائي ذو تركيز 3مغ/ملل بينما 18% تم تثبيطها من قبل مستخلص الثمرة من اجل نفس التركيز .

\* مستخلص الميثانول للجزء الهوائي يتميز بخاصية تثبيط التكاثر الخلوي مشابه لدواء hydrea و الذي تم اختياره كمعيار للمقارنة، حيث من اجل نفس التركيز 3 مغ/ملل تم تثبيط 100 % من خلايا الخميرة .

الكلمات المفتاح : DPPH -مضاد *Rubus ulmifolius* Schott-مضاد التكاثر الخلوي  
الأكسد -

## REMERCIEMENTS

*Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

*Mes remerciements vont particulièrement à :*

*Ma promotrice M<sub>me</sub> SAÏDI.F responsable de poste graduation et chef d'option Genie biologique pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de m'encadrer, en suite pour ses conseils précieux, ses orientations judicieuses et ses directives efficaces, pour m'avoir ouvert les portes des laboratoires, pour réaliser une grande partie de mon travail. Veuillez accepter mes sincères remerciements.*

*Ma co-promotrice M<sub>me</sub> BRAHIM ERRAHMANI DALILA d'avoir bien voulu diriger et encadrer ce travail avec une grande rigueur scientifique, en suite pour ses conseils précieux, ses orientations judicieuses et ses directives efficaces, ainsi que pour sa contribution et son aide concernant la réalisation des analyses.*

*Mr MOHAMED SAIDR, d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, qu'il trouve ici l'expression de mes profondes sympathies.*

*Mr BOUKHATEM M.Nd'avoir accepté de faire partie du jury. Votre présence dans ce jury m'honore beaucoup, trouvez ici mes sincères remerciements.*

*Mes remerciements s'adressent également à Mr et Mme ABDELHADI pour leur soutien, leur encouragement et leur aide dans ce modeste travail.*

*Mes plus vifs remerciements, ma reconnaissance et mes grâtes vont à mes enseignants à qui je leur doit mon présent et mon future.*

*Je remercie l'ensemble des personnes qui m'ont aidé par leur travail, par leur patience et soutien moral : tous les membres du laboratoire post graduation de biologie, du laboratoire des projets de fin d'étude (PFE) et le laboratoire de biologie végétale.*

## **DEDICACES**

*Je dédie ce mémoire :*

*A mes très chers parents pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements tout au long de mes études.*

*A mes frères, mes sœurs, ma belle-sœur et mon beau frère*

*A mon oncle Malek*

*A mes amies, mes collègues de travail.*

*Mes neveux Rayan et Farah.*



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
<b>Tableau N° I :</b> Composition chimique de la partie aérienne	13
<b>Tableau N° II:</b> Composition chimique du fruit	13
<b>Tableau N° III:</b> Rendement d'extraction méthanolique partie aérienne et fruit.	31
<b>Tableau N° IV :</b> Composants phytochimiques des extraits méthanolique fruit et partie aérienne de la plante <i>Rubus ulmifolius</i> Schott	32
<b>Tableau N° V :</b> Contenu en polyphénols des extraits méthanoliques de <i>Rubus ulmifolius</i> Schott	33
<b>Tableau N° VI:</b> l'activité antioxydante mesuré par pourcentage d'inhibition de DPPH	34
<b>Tableau N° VII:</b> Pourcentage d'inhibition des cellules viables de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> par les différents extraits méthanoliques partie aérienne et fruits	38

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
<b>Figure N° 01 :</b> Aspect générale de <i>Rubusulmifolius</i>	10
<b>Figure N° 02 :</b> Répartirions mondiale de la ronce ( <i>Rubusfruticosus</i> L. agg)	11
<b>Figure N° 03 :</b> Les Principales étapes de la cancérogenèse	15
<b>Figure N° 4 :</b> Aspect du fruit (a) et de la partie aérienne (d) après séchage et broyage	21
<b>Figure N° 5:</b> Coupe transversale dans la tige de <i>Rubus ulmifolius</i> observée sous microscope photonique G : 40 x. (Photos originales 2014)	27
<b>Figure N° 6 :</b> Coupe transversale dans la feuille de <i>Rubusulmifolius</i> observée sous microscope photonique G : 40 x. (Photos originales 2014)	29
<b>Figure N° 7 :</b> Aspect de l'extrait méthanolique du fruit (a) et de la partie aérienne (b).	30
<b>Figure N° 8 :</b> Rendement d'extraction de la partie aérienne et fruit	31
<b>Figure N° 09 :</b> Comparaison du contenu en polyphénols de la partie aérienne et fruit	33
<b>Figure N° 10:</b> Comparaison de l'activité antioxydante du fruit, partie aérienne (tiges et feuilles) et Vitamine C	35
<b>Figure N° 11:</b> Aspect des cellules <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sous microscope photonique GX40 (Photos originales 2014)	38





## SOMMAIRE

### Chapitre I Bibliographie

I.1. Les plantes médicinales.....	1
I.1.1. Phytothérapie.....	1
I.1.2. Historique .....	1
I.2. Méthodes de préparation des plantes médicinales.....	2
I.3. Principes actifs des plantes médicinales.....	3
I.3.1. Métabolites secondaire.....	3
a)- Les isoprénoïdes : (Stéroïdes et Terpénoïdes) ou saponines.....	3
b)- Les composées phénoliques.....	4
I.4.1. L'histologie Organographique.....	5
I.5. Généralité sur la plante.....	6
I.5.1 La famille des Rosacée.....	6
I.5.2. Le genre Rubus.....	6
I.5.3 <i>Rubus ulmifolius</i> Schott .....	7
I.6. Effet thérapeutique de la plante.....	12
I.6.1. Activité antiproliférative.....	12
I.6.2.Activité anti-oxydante.....	14

### Chapitre II matériel et méthodes

II.1. Matériel :.....	17
II.1. Matériel biologique .....	17
II.1.1. Matériel végétal .....	18
II.1.2. Matériel microbiologique .....	18
II.2. Méthode.....	18
II.2.1. Technique d'étude histologique.....	19
II.2.2. Préparation des extraits méthanoliques.....	20
II.2.3. Etude phyto-chimique de la plante .....	21
II.2.4. Dosage des composés phénoliques .....	22
II.2.5. l'évaluation de l'activité antioxydante .....	22

II.2.6. Etude de l'activité antiproliférative .....	24
---	----

### **Chapitre III résultats et discussion**

III.1. Etude histologique de la plante .....	26
III.2. Rendement d'extraction.....	39
III.3. Etude phytochimique de l'extrait méthanolique .....	31
III.4. Dosage des polyphénols .....	32
III.5. L'évaluation de l'activité antioxydante .....	33
III.6. Etude de l'activité antiproliférative.....	37
Conclusion .....	40

### **Chapitre IV références bibliographiques**

Annexe

## GLOSSAIRE

Ephédrine	Issue de l'éphédra, utilisée en médecine traditionnelle chinoise contre les maladies respiratoires telles que l'asthme, les rhinites et les rhumes des foins
Chaulmoogra	<i>Hydnocarpuskurzii</i> ou <i>Taraktogenoskurzii</i> . Désigne aussi l'huile produite par cet arbre.
allélopathiques	interactions biochimiques directes ou indirectes, positives ou négatives, d'une plante sur une autre (micro-organismes inclus) au moyen le plus souvent de métabolites secondaires tels les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les alcaloïdes. Lorsque ces interactions sont négatives, on parle d'amensalisme.
Pollinisation	Le transport du pollen des étamines au pistil
Xénobiotiques	Se dit d'une molécule étrangère à un organisme vivant (additif alimentaire par exemple) et considérée comme toxique.
Astringence	Se dit d'une substance qui resserre et assèche les tissus, et peut faciliter leur cicatrisation.
Etrusque	Est une ancienne civilisation qui s'est développée dans le nord de la botte italienne pendant l'antiquité avant l'ascension du monde romain.
Attique	Dialecte ionien, qui était la langue de la cité d'Athènes
Glabres	Organes végétal dépourvu de poil
Viridaplantae	Plante verte
Tracheophyta	Plante vasculaire
Spermatophytina	Plante à graine
Angiospermae	Plante possédant des fleurs
Magnoliopsida	Dicotylédone
Étamines	Les étamines sont des pièces florales (appareil reproducteur mâle). Formés d'un filet (tige) et l'anthère contenant le pollen. L'ensemble constitue l'androcée
Tomenteuse	Velue, poilue
Folioles elliptique	Ressemblent à de petites feuilles ovales

Thrombocytémie      Augmentation du nombre des plaquettes dans le sang.  
Api web              Logiciel d'identification des microorganismes

### **LISTE DES ABREVIATIONS**

CoA                    Co-enzyme A

UV                    Ultra-Violet

ADN                    Acide DésoxyriboseNucléique

ERO                    Espèce Réactive de l'Oxygène

NFκB                    Nuclearprotein Kappa-B ; protéine de transcription

RX                    Rayon X

Ps                    Poids Sec

EM                    ExtraitMéthanolique

DPPH                    2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

DO                    Densité Optique

HPLC                    Chromatographie liquide a haute performance

RMN                    Résonance Magnétique Nucléaire

## I. INTRODUCTION

Les radicaux libres générés par le stress oxydatif sont des espèces chimiques instables avec un électron libre. Pour se stabiliser ils se lient aux macromolécules biologiques comme les lipides, les protéines et l'ADN et provoquent leur endommagement en conséquence l'apparition de maladies chroniques tel que le cancer.

Les fruits et légumes sont particulièrement riches en une variété d'antioxydants dites composant phytochimiques « les polyphénols »

Les composés phénoliques sont largement distribués dans le règne végétal. Considérés comme étant les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes.

Au cours des dernières années, l'identification et le développement de composés phénoliques ou des extraits de différentes plantes est devenu un domaine de recherche important de santé.

Plusieurs recherches s'orientent vers les plantes médicinales considérées comme source énorme de multiples substances phytothérapeutiques et qui peuvent être l'arme permettant de faire face aux maladies chroniques.

Dans le présent travail nous sommes intéressés à l'étude d'une plante médicinale *Rubus ulmifolius* Schott connue par ces nombreuses vertusthérapeutiques qui sont dus à ses composants phytochimiques essentiellement les polyphénols.

De ce fait notre travail vise un double objectif :

- L'estimation de l'activité antioxydante au DPPH (in vitro) de l'extrait méthanolique de la partie aérienne (tige et feuilles) et celle du fruit de *Rubus ulmifolius*
- L'évaluation de l'activité antiproliférative in vitro de la partie aérienne et celle du fruit en comparaison avec un médicament de référence l'hydroxychloroquine.

# CHAPITRE I CHAPITRE I

## BIBLIOGRAPHIE



## **I.1. Les plantes médicinales**

### **I.1.1. Phytothérapie :**

« Les plantes nous offrent gratuitement plus de composés nouveaux que tous les chimistes du monde ne pourraient jamais en synthétiser pendant mille ans d'efforts... Non seulement les composés fabriqués par les plantes sont infiniment plus variés que ceux dont nous disposons à l'heure actuelle; mais ils sont toujours mieux tolérés par l'organisme, parce qu'ils sont le produit naturel de la chimie de la vie... » (**Bardeau, 1973**)

Le mot phytothérapie provient de 2 mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes ».

### **I.1.2. Historique :**

Des preuves archéologiques indiquent que les humains utilisaient des plantes médicinales au cours de l'air Paléolithique, il y a environ 60000 ans. (**Elumalai, 2012**)

L'étude des plantes remonte à plus de 5000 ans, les Sumériens, ont créé des tablettes gravées de listes de centaines de plantes médicinales.

En 1500 avant JC, les Egyptiens ont écrit le Papyrus Ebers, qui contient des informations sur plus de 850 plantes médicinales.

En Chine, Le Pen Tsao (base de données de plantes) répertorie 365 plantes médicinales et leurs usages.

Le Monastère bénédictin était la principale source de connaissances médicales en Europe et en Angleterre.

À partir du 9<sup>ème</sup> siècle dans le monde islamique médiéval, les écoles de médecine connues comme Bimaristan ont commencé à apparaître dans les pays des Perses et Arabes, qui était généralement plus avancé que l'Europe à l'époque médiévale.



## I.2.Méthodes de préparation des plantes médicinales

- **Décoction** : utilisé pour extraire les principes actifs des racines, de l'écorce, des tiges et des baies.

Une décoction consiste à faire bouillir dans de l'eau les plantes sèches ou fraîches, préalablement coupées en petits morceaux.

Les décoctions sont généralement réalisées à partir des racines, d'écorce et de baies, auxquelles, on ajoute parfois des feuilles et des fleurs (**Iseran, 2001**). Ce type d'extraction relativement simple et classique, se réalise sur une quantité d'environ 1kg de matière végétale. Les parties fragiles de la plante doivent être ajoutées dans le récipient, hors du feu, lorsque la décoction commence à tiédir et enfin, filtrer la préparation. (**Bensegueni-tounsi, 2001**)

- **La sonication**: Implique l'utilisation d'ultrasons à des fréquences allant de 20 kHz à 2000 kHz; ce qui augmente la perméabilité de la paroi cellulaire et produit la cavitation. (**Dai, 2009**)

-**La macération** :C'est l'action d'un liquide froid (eau, alcool, vin, huile) sur une ou plusieurs plantes pendant plusieurs heures, pour en extraire les principes actifs ; le produit obtenu s'appelle un macéré.

C'est un mode de préparation qui est employé notamment avec les racines, dans ce cas, il faut les écraser avant macération pour assurer une meilleure diffusion des principes actifs (**Fort, 1976 et Chiej, 1982**). Cette méthode est le mieux adapté pour les produits thermolabiles (**Ncube et al.,2008**)

- **Percolation type soxhlet** :

C'est une lixiviation qui se réalise à chaud, le percolateur type soxhlet est composé d'un réfrigérant, d'un soxhlet et du ballon, le tout monté sur une source de chaleur.

La drogue se trouve dans une cartouche poreuse à l'intérieur du soxhlet, la matière à extraire ne se trouve pas au contact de la source de chaleur (**Negrette et al.,1987**).

### **I.3.Principes actifs des plantes médicinales :**

Les plantes médicinales doivent leur action à un ou plusieurs principes actifs que l'on peut analyser chimiquement et qu'il est indispensable de connaître pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme.

#### **I.3.1.Métabolites secondaire :**

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 allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (**Juddetal.,2002**).

leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral (**Makkaretal.,2007**).

#### **I.3.2. Classification des métabolites secondaires :**

a. Les isoprénoides : (Stéroïdes et Terpénoides) ou saponines :

Issus des mêmes précurseurs, et formés à partir de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (polymères de l'isoprène), les terpénoides et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires. Comme les dérivés des acides gras, tels les acétogénines, les terpènes ont pour origine biosynthétique l'acétylCoA ou le malonylCoA. Néanmoins, ils ne sont pas spécifiques des végétaux puisque le squalène, le cholestérol ou encore de sesquiterpènes et des diterpènes se rencontrent chez les animaux. Cependant, l'extrême diversité des terpénoides chez les végétaux contraste avec le petit nombre détecté chez les animaux.

Le nombre d'unités isopréniques définit les différentes classes de terpènes : monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterterpènes (C25), triterpènes (C30) et tétraterpènes (C40). Les terpènes simples en C10 et C15 sont certainement apparus tardivement au cours de l'évolution et caractérisent les plantes vasculaires ayant développé des appareils sécréteurs. (**Crozier et al.,2006**)

**b- Les composés phénoliques :**

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol  $C_6H_5OH$  qui est un monohydroxybenzène. Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et écorce. La couleur et l'arôme, ou astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ces composés représentent 2 à 3% de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% et même d'avantage.

Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides.

Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins).

Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes (D'archivio et al.,2007).

- **Les Flavonoïdes :** présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales : Antioxydants, maintiennent une bonne circulation, propriétés anti-inflammatoires et antivirales etc. (Crozier et al.,2006)

.

- **Les Phénols :** appelé acide hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique L'acide salicylique molécule donnant par synthèse l'aspirine.

Les phénols ont un effet anti-inflammatoire et antiseptique. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (Isrin, 2001 ; Fresco, 2006).

- **Les Tanins :** sont des composés polyphénoliques ayant la propriété de tanner la peau, c'est à dire de la rendre dure et imputrescible, en se fixant sur les protéines :

Cependant on a deux grands groupes de tanins :

✓ Les tanins hydrolysables ;

- ✓ Les tanins condensés, non hydrolysables ou tanins catéchiques.

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation.

Les tanins stoppent les hémorragies, luttent contre les infections, drainent les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée, et réparent les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure (Fresco, 2006).

- **Les anthocyanes** ou **anthocyanines** (du grec anthos = fleur, kyaneos = pourpre) sont des pigments naturels solubles dans l'eau allant tout le long du rouge au bleu. Les anthocyanes apparaissent principalement dans les fruits mais aussi dans les feuilles et les racines. Ils sont principalement localisés dans les cellules des couches extérieures de l'épiderme.

Les quantités sont assez importantes: un kg de mûres en contient par exemple 1,15 g, les légumes rouges et noirs en contiennent environ 20 mg/g.

Environ 2% de tous les hydrocarbures fixés par la photosynthèse sont transformés en flavonoïdes et leurs dérivés tels que les anthocyanes. Ce qui fait environ 10 milliards de tonnes par an (Sava et al., 2006)

#### **I.4. L'histologie Organographique :**

L'étude anatomique des plantes vasculaires permet de mettre en évidence un certain nombre de tissus, c'est-à-dire d'assemblages de cellules différenciées dans l'accomplissement d'une même fonction.

À l'origine des tissus différenciés, se trouvent des ensembles de cellules jeunes, très actives, à parois minces, gros noyau et petites vacuoles : ce sont les méristèmes. La multiplication des cellules méristématiques selon des règles bien déterminées, leur élongation et leur différenciation, donnent naissance aux tissus différenciés.

Ces tissus sont répartis dans les trois organes fondamentaux de la plante : racine, tige et feuille, dans une disposition propre à chaque organe.

L'histologie végétale est la partie de la biologie végétale qui étudie la structure microscopique des tissus végétaux.

Chez les plantes vasculaires, les principaux tissus sont en outre réunis en unités plus grandes en fonction de leur continuité dans l'ensemble de la plante. Ces unités plus grandes, les systèmes histologiques ou systèmes de tissus, se reconnaissent aisément, souvent à l'œil nu. Il existe trois systèmes de tissus et leur présence dans la racine, la tige et la feuille traduit à la fois la similitude fondamentale entre les organes de la plante et la continuité de l'organisme.

Les trois systèmes sont :

- 1- Tissus fondamentaux de trois types: le parenchyme, le collenchyme et le sclérenchyme ;
- 2- Tissus conducteurs comprenant le xylème et le phloème ;
- 3- Tissus protecteurs représentés par l'épiderme, enveloppe protectrice externe de la structure primaire, puis par le péri derme dans les parties de l'organisme qui possèdent un épaissement secondaire (**Raven et al.,2007**).

## **I.5. Généralité sur la plante :**

### **I.5.1 La famille des Rosaceae :**

Le mot anglais rose vient du latin et l'ancien français. Le mot Latin rosa peut-être une forme étrusque de grec Rhodia, "en provenance de Rhodes." Le mot grec attique de rose est Rhodon, dans le dialecte grec 'wrodon'. Dans l'Avesta, la langue perse, "rose" est Varda et en arménien 'vard'(Foltaetal.,2009)

### **I.5.2. Le genre Rubus :**

Rubus, Rosaceae, connus communément sous le nom : des ronces,

Le genre *Rubus* peut se découper en 3 sous-genres :

- Les framboises avec leurs fruits rouges, recouverts de nombreux poils courts, c'est le « sous-genre *idaeobatus* ».

- Le petit *Rubus* qui donne des fruits rouges vifs avec peu de drupéoles (petites boules qui forment le fruit) toutes glabres qui forme à lui seul le « sous-genre *Cylactis*».
- Sous-genre des ronces qui donnent comme fruit ce que nous appelons les mûres et qui se nomme « sous-genre *Rubus* ». (Folta et al., 2009 ; Hummer, 2010)

### **I.5.3 *Rubus ulmifolius* Schott :**

#### **Etymologie :**

*Rubus ulmifolius* Schott, un nom latin qui signifie Ronce à feuille d'orme.

(Dumesnil, 1821)

*Rubus* : ronce

*Ulmifolius* : feuille d'orme.

**Nom scientifique :***Rubus ulmifolius* Schott

**Ancienne appellation :***Rubus fruticosus* L (Halimi, 1997 ; Hammer et al.,2004 ; Benhamza, 2008)

**Synonymes :**(Evans et al., 2007)

Plusieurs synonymes sont attribués à la plante :

- *Rubus rusticanus*
- *Rubus ulmifolius* var. *Inermis*
- *Rubus discolor*
- *Rubus ulmifolius* var. *Ulmifolius*
- *Rubus ulmifolius* var. *anoplothyrus*

**Noms vernaculaires :**(Halimi, 1997.,Babaaissa 2000 )

- Nom Algerien : El oleig, Woirdiate, Indjel (Thizouel)
- Nom Français:Ronce
- Nom anglais : Elm-leafblackberry
- Nom espagnol:Zarzamora

**Systématique : (Evans et al, 2007)**

*Rubus ulmifolius* Schott fait partie de la famille des rosaceae, la systématique est comme suite :

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous règne</b>	Viridiaeplantae
<b>Division</b>	Tracheophyta
<b>Sousdivision</b>	Spermatophytina
<b>Infradivision</b>	Angiospermae
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordre</b>	Rosales
<b>Famille</b>	Rosaceae
<b>Genre</b>	Rubus L
<b>Espèce</b>	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott

**Description botanique :(InBelhacen, 2009)**

Sous-arbrisseaux vivaces, espèce caractérisée par des aiguillons arqués, très vulnérants, rougeâtres et recouverts de pruine.

**Les feuilles** : feuilles 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, chiffonnés. 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.



← Feuille à limbe denté

← Nervure secondaire

← Nervure principale



05 folioles vertes et  
glabrescentes face en dessous

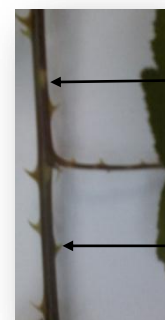
05 folioles Blanches-  
tomenteuses  
Face en dessous



← Sépale



← Pétale



← Tige

← Epine



← Fruit composé de  
drupéoles

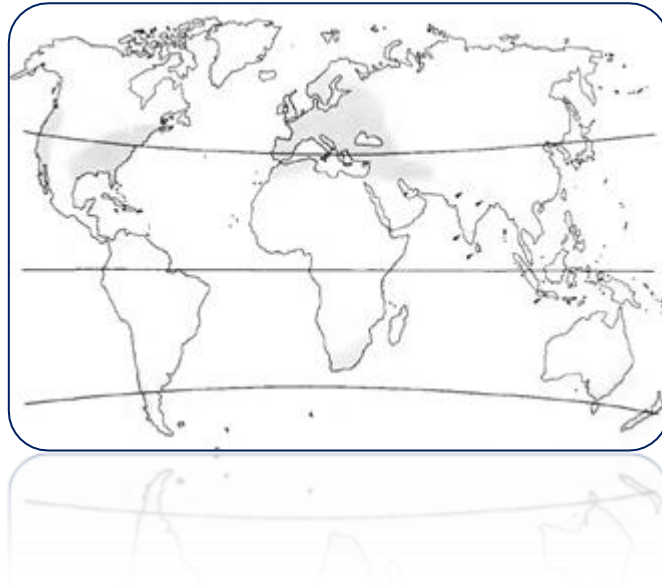


← Etamines

**Figure N° 01 :** Aspect générale *Rubus ulmifolius* Schott (InBelhacen, 2009)

**Répartition et habitat :** L'Europe, l'Asie, l'Afrique (Atlas), l'Afrique australe, le Sud-est de l'Australie, la Nouvelle-Zélande, les Etats-Unis le Chili et l'équateur. C'est une plante des haies, des lisières de forêts ou des taillis supportant aussi bien les milieux ombragés frais qu'ouverts et ensoleillés. C'est la ronce la plus répandue du département depuis la plaine jusqu'à l'étage montagnard et ce dans beaucoup de milieux différents ruines. (InSerboub, 2012)





**Figure N° 02 :** Répartirions mondiale de la Ronce (*Rubus fruticosus* L. agg.)

(Wehrlen, 1985)

**Organe utilisé:**les feuilles, fleurs en boutons, jeunes pousses (turions), fruits Humides.(InSerboub, 2012)

**Préparation de la plante :**

- On bout les feuilles desséchées dans l'eau pendant 20 minutes, on filtre, on ajoute du miel et on boit à raison d'un verre trois fois par jour jusqu'à la guérison des maladies suivantes: les inflammations de l'appareil digestif, l'appareil génito-urinaire, les colites de l'estomac, les diarrhées et les règles abondantes.
- On bout l'écorce des racines dans l'eau pendant 20 minutes, on filtre et on boit un verre trois fois par jour jusqu'à la guérison des maladies des reins.
- Prendre les fruits contre les inflammations l'appareil digestif. (InSerboub.,2012)
- Préparer un décocté des feuilles de la ronce, faire bouillir 40 g de feuilles dans de l'eau pendant 2 min, laissé reposer 10min ensuite boire. Facilite la digestion, guériele diabète, les angines, stoppe l'hémorragie.
- Les bourgeons jeunes sont cueillis en mois de printemps mis dans un conteneur ensuite on les expose au soleil, la ronce excrète un liquide utilisé pour guérir et cicatrisé les plaies.(Halimi, 1997)

En Italie, la plante est utilisée pour le traitement des abcès, des furoncles et les ulcères, tandis que la décoction de feuilles est utilisée pour guérir la conjonctivite, les hémorroïdes et les inflammations intestinales. (Uncinimanganelletal., 1999).

Dans la médecine traditionnelle chilienne, *Rubus ulmifolius* est utilisé pour son effet hypoglycémiant démontré expérimentalement chez le rat. (Lemus et al., 1999).

### Composition chimique :

Le contenu et la composition en polyphénols, dans le genre *Rubus*, sont déterminés par plusieurs facteurs :(Samuel-peterson, 2013)

- ✓ Génétique
- ✓ Environnement
- ✓ Méthode de culture
- ✓ Climat
- ✓ Période de cueillette
- ✓ Temps et conditions de stockage

**Tableau N° I :** Composition chimique de la partie aérienne

✓ Saponine	(Chaban et al., 2014)
<b>Composés phénoliques :</b>	<b>(Panizzi et al., 2001 ; Sisti et al., 2008 ; Martini et al., 2009)</b>
✓ Acide caféique	✓ Tanins hydrosoluble (ellagitanins)
✓ Acide férulique	✓ Tannins condensé (proanthocyanes)
✓ Acide gallique	✓ Flavonoles : rutin, acide ellagique, Kaempferol
✓ Acide coumarique	✓ Quercetin
✓ Anthocyanine	

**Tableau N° II:** Composition chimique du fruit

✓ Fibre	<b>(Sariburun et al., 2010)</b>
✓ vitamine : C, K	
✓ Minéraux	
<b>Composés phénoliques :(Hager et al.,2008 ; Kylli, 2011)</b>	
✓ Tannins condensé (proanthocyanes)	✓ Flavan-3ols
✓ Tanins hydrosoluble (ellagitanins)	✓ anthocyanine
✓ Quercetin	✓ Cyanidines
✓ Flavonoles : rutin, acide ellagique, Kaempferol	

### I.6. Effets thérapeutiques de la plante :

*Rubus ulmifolius*, nommé actuellement « super fruits » pour leurs effets thérapeutiques dus essentiellement aux composés phénoliques qu'elles contiennent :

- ✓ Activité antimicrobienne (**Panizzi et al., 2001 ; Chabane et al., 2014**)
- ✓ Activité antifongique (**Sisti et al., 2008**)
- ✓ Activité anti-inflammatoire (**Rupesh et al., 2013**)
- ✓ Activité antioxydante (**Dall'acqua et al., 2008**),

#### I.6.1. Activité antiproliférative :

##### Le cancer :

Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformations pouvant se dérouler pendant plusieurs années, donc la cancérogénèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer (**Pincemaital., 1999**).

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus

récemment desrecherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Decloitre, 1993 et Hertog, 1996)

### **Déroulement du cancer :**

Le cancer est la seconde cause de mortalité aux états unis et dans d'autres nations.

Le développement de cette maladie est divisé en différentes étapes (Beattie et al., 2005):

- **Etape d'initiation** : Elle débute quand des agents carcinogènes se fixent sur l'ADN ou à la suite de lésions par radiations ionisantes ou de rayonnements UV.

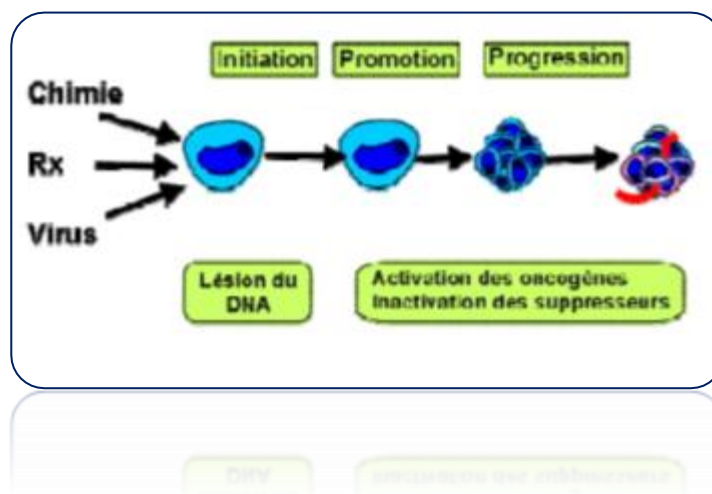
Des ERO entraînent des mutations au niveau de l'ADN des cellules somatiques.

Ils peuvent également agir en tant que messagers secondaires en modifiant dans la cellule la régulation redox du glutathion, agent antioxydant important, en activant la thiorédoxine qui active elle-même le NFκB normalement inactif. Il y a donc synthèse de nombreux médiateurs impliqués dans le processus du développement du cancer.

- **Promotion** (stimulation de l'expansion de la tumorigenèse). Elle peut se prolonger pendant plusieurs années. La cellule se transforme en cellule pré-néoplasique avec maintien du caractère immortel.

- **Phase de propagation ou progression** (conversion de la tumeur en cancer malin).

La cellule pré-néoplasique se transforme en cellule néoplasique ou cancéreuse non reconnue par l'organisme comme cellule anormale (In Tabat, 2011)



**Figure 03 :** Les principales étapes de la cancérogenèse (In Tabat, 2011)

## Etude de l'activité antiproliférative in vitro :

### *Saccharomyces cerevisiae* :

*Saccharomyces cerevisiae* est une espèce appartenant à la famille *Saccharomyces cerevisiae* (Kurtzman, 2003)

Considérée comme l'organisme eucaryote le mieux étudié ; ses gènes sont conservés de manière significative au cours de l'évolution. Au moins 5596 gènes du génome de *Saccharomyces cerevisiae* codant pour des protéines entièrement séquencé (Otero et al., 2010). Par conséquent, la levure *Saccharomyces cerevisiae* est largement utilisée comme modèle pour étudier les mécanismes cellulaires fondamentaux.

Les fonctions biochimiques et physiologiques des gènes eucaryotes (organismes supérieurs) sont expliquées via des études réalisées sur la souche *Saccharomyces cerevisiae*. Il existe une analogie des gènes de *Saccharomyces cerevisiae* et la cellule eucaryote. (Foury, 1997).

*Saccharomyces cerevisiae* est facile à mettre en culture et en grandes quantités, le cycle cellulaire et facilement manipulées génétiquement et physiologiquement à la fois .En conséquence, la levure apparaît comme un modèle attractif pour la recherche des composés ayant une caractéristique antiprolifératif, étudier leur mécanisme d'action. De plus, *Saccharomyces cerevisiae* est une cellule moins complexe que les cellules cancéreuses et il existe un degré élevé de similitude entre elles. Ce micro-organisme est un excellent système modèle pour les cellules cancéreuses (Matuo et al., 2012).

### **I.6.2. Activité anti-oxydante :**

Il existe des mécanismes de défense cellulaires qui détruisent les radicaux oxygénés (Peroxydases cellulaires) ou qui piègent les radicaux libres (molécules anti-oxydantes). Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substances biologiques. Ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Boyd et al., 2003)

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (électron non apparié) sur leur couche externe. La présence d'un électron célibataire leur confère une grande réactivité (Halliwell et Whiteman, 2004).

### **Origine des radicaux libres :**

Les RL sont produits par un grand nombre de mécanismes tant endogènes qu'exogènes. Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux, pollutions diverses, produits chimiques ainsi que des contaminations par des métaux lourds ou certaines carences nutritionnelles (Priyadarsini, 2005).

Certaines de ces productions sont volontairement programmées par l'organisme (Halliwell, 2006).

D'après D'ACOSTA (2003), les principaux radicaux libres qu'on rencontre dans le corps Humain sont : l'anion super oxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) ; le radical hydroxyle  $OH\cdot$  ; Le radical alcoyle ( $RO\cdot$ ) ; l'oxyde nitrique ( $NO\cdot$ ) et le radical hydro-pyroxyle  $HOO$ .

### **Rôle physiologique des radicaux libres :**

Ils remplissent de très nombreuses fonctions utiles : La phagocytose, participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes (Favier, 2003).

Exemple :

- Le radical monoxyde d'azote possède une fonction régulatrice.
- Le radical super-oxyde  $O_2^{\cdot-}$  module la signalisation cellulaire et intervient dans les régulations métaboliques, lorsqu'il est produit par le réticulum endoplasmique lisse avec  $H_2O_2$ , ils interviennent dans la régulation redox de certaines fonctions

essentielles de ce compartiment cellulaire telles que l'adressage et la sécrétion des protéines (Valko et al., 2007)

Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé. (Koua et al., 2009).

### **Stress oxydant et ses conséquences biologiques :**

En plus des fonctions biologiques, la réactivité particulière des RL ajoute des propriétés toxiques et diversifiées. En effet, toutes les macromolécules cellulaires sont desibles potentielles des radicaux libres.

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes.

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques). L'accumulation des espèces oxygénées réactives a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Smirnov, 2005).



CHAPITRE II  
CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES  
MATERIEL ET METHODES



Notre étude s'est étalée sur une période de 6 mois de janvier à juin 2014.

Les différentes expérimentations ont été effectuées dans les structures suivantes :

- Laboratoires du département de microbiologie et physico-chimique de Novapharm –trading :(Société de production pharmaceutique sise à Tipaza).
- Laboratoire de post graduation Blida I.
- Laboratoire de biologie végétale et de PFE de l'université de Blida I.

## II.1. Matériel :

### II.1. Matériels biologique :

#### II.1.1. Matériel végétal :

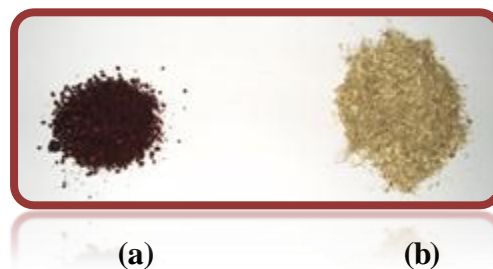
*Rubus ulmifolius* L. a été récoltée au mois de février 2014 à Chréa (W de Blida),

L'identification de la plante a été effectuée au niveau :

- De l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) d'El Harrach
- Du département d'agronomie de l'université de Blida 1.
- Par les clés d'identification de (**Quezel et Santa,1962**).

Pour nos expérimentations nous avons utilisés la partie aérienne de la plante (tiges et feuilles) environ 1kg et environ 500 gpour le fruit.

La plante a été séché à l'air libre et à l'abri de la lumière et de l'humidité, le fruit a été séché à l'étuve à 30 °C pendant une semaine le tout est réduit en poudre à l'aide d'un broyeur mécanique puis conservé dans des bocaux en verre fermants hermétiquement jusqu'à utilisation.



**Figure N° 04** :Aspect du fruit (a) et de la partie aérienne (b) après séchage et broyage.

### II.1.2. Matériel microbiologique :

La souche de levures utilisés est la levure instantanée du commerce *Saccharomyces cerevisiae* référence lot (050213).

Avant utilisation, un test d'isolement et identification de la souche est effectué.

Voir chapitre II.2.7

### II.1.3. Matériel non biologique :

Verrerie et produits chimique (voir annexe)

## II.2. Méthodes

### II.2.2. Technique d'étude histologique

Une série de coupes transversales effectuées à l'aide d'un microtome (Gabe, 1963), au niveau de la tige et de la feuille de *Rubus ulmifolius* fournissent une vue d'ensemble sur la structure de l'organe, la position et l'importance respective des tissus. Les plus fines sont alors sélectionnées pour la coloration.

### Microtomie :

- ✓ Fixation : Mettre l'échantillon dans la solution FAA (Formol 1, acide acétique 1, éthanol 70% 8) (v, v, v) pendant 24h à 48h,
- ✓ Déshydrations : consiste à éliminer toute l'eau ou le fixateur qui se trouve dans les tissus destinés à être inclus dans la paraffine.
  - Ethanol 95 % pendant 1 h
  - Ethanol 95 % pendant 1 h
  - Ethanol 100 % pendant 1 h
  - Ethanol 100 % pendant 1 h
  - Ethanol 100 % pendant 1 h ou une nuit.
- ✓ Imprégnation :cet étape permet d'éliminer toute trace d'éthanol, et cela pour une meilleure pénétration de la paraffine dans les tissus :
  - Toluène + alcool (1v/1v) pendant 30 min à  $58-60 \pm 3C^{\circ}$ .
  - Toluène pur pendant 1 h à  $58-60 \pm 3C^{\circ}$ .

- Toluène pur pendant 1 h à  $58-60 \pm 3^\circ\text{C}$ .
  - Toluène pur pendant 1 h à  $58-60 \pm 3^\circ\text{C}$ .
  - Toluène + paraffine fondue (1v/1v) pendant 30 min à  $58-60 \pm 3^\circ\text{C}$ .
- ✓ Inclusion : se fait à la paraffine pure qui est coulée à chaud  $64 \pm 4^\circ\text{C}$  dans un modèle de moule (métallique).
- Identifier les moules(feuilles et tiges).
  - Couler la paraffine.
  - Déposer l'échantillon
  - Rajouter de la paraffine
  - Déposer la cassette
  - Rajouter de la paraffine de manière qu'elle pénètre dans les perforations de la cassette.
  - Déposer l'ensemble sur une plaque réfrigérante pendant 10 min pour durcir.
  - Nous obtenons à la fin des blocs et des cassettes ou les fragments sont parfaitement inclus.
- ✓ Réalisation des coupes au microtome : à l'aide d'un microtome réalisé des coupes sériées à une épaisseur de  $7 \mu\text{m}$ . Les coupes obtenues sont contenu dans un ruban de paraffine.
- Utiliser des lames propres mises préalablement dans l'éthanol 95 % puis séchée avec du papier hygiénique.
  - Numéroter les lames, étaler au-dessus l'eau gélatineuse à 0,001 %.
  - Etaler le ruban contenant les coupes sur les lames.
  - Mettre les lames sur une plaque chauffante réglée à  $(40 \pm 2^\circ\text{C})$  afin d'étaler les coupes sans plissement.
- ✓ Déparaffinage : consiste à éliminer la paraffine des tissus pour faciliter la pénétration des colorants.
- Bain de toluène pur pendant 15 min sur plaque chauffante.
  - Bain de toluène pur pendant 10 min sur plaque chauffante.
  - Bain de toluène pur pendant 10 min sur plaque chauffante.
- ✓ Réhydratation : a pour but de préparer les coupes à l'action du colorant miscible à l'eau.

- 3 bains d'alcool absolu pendant 10 min chacun.
  - Un bain d'alcool pur/formol (4v/1v) pendant 5 min.
  - Rincer à l'eau courante.
- ✓ Double coloration :
- Aide acétique dilué à 1 % pendant 15min.
  - Laver à l'eau courante.
  - Colorer 10 à 20 min dans le vert de méthyl.
  - Laver à l'eau courante.
  - Colorer 5 à 10 min dans le rouge congo.
  - Laver à l'eau courante.
- ✓ Observation microscopique : observer au microscope photonique grossissement G x 40.

### **II.2.3 Préparation des extraits méthanoliques :**

Le matériel végétal broyé (50 g) est soumis à une extraction par sonication dans un bain ultrason dans le méthanol (5 fois 100 ml).

L'extrait est ensuite évaporé sous pression réduite à sec (à de 40°C) par un évaporateur rotatif (Dall'acqua et al., 2008 ; Dai, 2009).

#### **Rendement d'extraction :**

Le rendement d'extraction est calculé selon la formule suivante :(InFalleh et al.,2008)

$R (\%) = 100 \text{ Mext/Méch.}$  Où :

- R est le rendement en %;
- Mext est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg
- Méch est la masse sèche de l'échantillon végétal en mg.

## **II.2.4. Etude phytochimique de la plante :**

### **II.2.4.1. Identification des composés phénoliques et de saponine :**

#### **- Identification des phénols :**

A l'extrait rajouter quelques gouttes de la solution chlorure ferrique à 5%. La formation d'une couleur vert noirâtre indique la présence des composés phénoliques. (Saxenamamta et al., 2012)

#### **- Identification des flavonoïdes**

Réaction au réactif alcalin : A l'extrait, rajouté la solution de NaOH à 10%. La formation d'une couleur jaune intense indique la présence de Flavonoïde.

#### **- Identification des anthocyanes**

A 2ml de l'extrait rajouter 2ml d'HCL (2N) et  $\text{NH}_4$ , l'apparition de couleur rose rouge qui vire au bleu violacé indique la présence d'anthocyane (Ashvinetal.,2013).

#### **- Identification saponines**

Une quantité de 0.5 g d'extrait et agitée avec 2 ml d'eau. La formation d'une mousse persistante pendant 10 min, indique la présence de saponines. (Prashanttiwarietal., 2011)

#### **- Identification des tanins**

Une fine quantité d'extrait est bouillie avec 5 ml de la solution d'éthanol à 45% pendant 5 minutes, après filtration, on prend 1ml du filtrat qu'on dilue dans de l'eau distillée. Ajouter quelques gouttes de chlorure ferrique. Une couleur vert noir indique la présence de Tannins. (Dharmendraetal., 2012)

### II.2.5. Dosage des composés phénoliques:

#### Protocole :

Les composés phénoliques sont déterminés par la méthode de Folin-ciocalteux (Fazio et al., 2012)

A 100 µl de la solution d'extrait méthanolique (1mg/ml), on rajoute 1ml de réactif folin-ciocalteux dilué au 1/10, agiter pendant 1min. Rajouter 800µl de bicarbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 10%, Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir d'un volume finale de 5ml. Laisser reposer la solution pendant 2h à température ambiante. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 760nm.

Le résultat est estimé à partir de la courbe d'étalonnage préparé avec de l'acide gallique, le résultat est exprimé en mg équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec de la plante.

### II.2.6.L'évaluation de l'activité antioxydante :

Pour étudier l'activité anti-radicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 517 nm (**Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)**)

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphénylpicryl-hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 517 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance.(LUE et al ; 2010 ; ABDELHADI et al., 2014))

#### Préparation des solutions

##### Préparation de la solution du DPPH

Préparer une solution de 0,1 Mm de DPPH. Solubiliser 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol absolu. Le mélange est conservé à l'abri de la lumière.

##### Préparation de l'extrait

Une solution mère est préparée en dissolvant 1 mg d'extrait méthanolique dans 1 ml de méthanol absolu (1mg/ml). A partir de cette solution, on réalise une série de dilution de l'ordre du µg/ml (10, 50, 100, 250, 500, 600 et 1000 µg/ml)

L'essai au DPPH

- Dans des tubes secs stériles, introduire 3 ml de la solution de DPPH, faire réagir avec 1ml de l'extrait dilué dans le méthanol.
- Laisser reposer pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Une solution standard vitamine C, préparée en suivant les mêmes étapes que précédemment. La lecture de la densité optique se fait à 517 nm.

Expression des résultats.

L'activité antioxydante exprime la capacité de piéger le radical libre. Elle est estimée par le pourcentage(%) de décoloration du DPPH en solution dans du méthanol selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left( \frac{\text{Abs}_{\text{blanc}} - \text{Abs}_{\text{test}}}{\text{Abs}_{\text{blanc}}} \right) \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{blanc}}$  : absorbance du blanc

$\text{Abs}_{\text{test}}$  : absorbance de l'échantillon

Le blanc est composé de 1ml de méthanol et 2 ml de solution de DPPH. On effectue 3 répétitions pour chaque essai. Chaque valeur de l'activité oxydante est donc calculée sur la moyenne de trois répétitions. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures  $\pm$  l'écartype.

La valeur EC50 (appelée aussi IC 50) est déterminée pour chaque extrait. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH.

Les valeurs EC50 moyennes ont été calculées par régressions linéaires ou polynomiales sur les courbes qui portent en abscisse, la concentration des composés testés, et en ordonnée, l'activité antioxydante en pourcentage (**Mensor et al.,2001**)

**II.2.7. Etude de l'activité antiproliférative :**

L'activité antiproliférative est déterminée par le test de la viabilité effectué sur un organisme modèle : la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Housseinpour et al., 2013 ; Periyamayagam et al., 2013)

**a. Préparation de l'inoculum de *Saccharomyces cerevisiae* :**

- ✓ Diluer 5 g de la levure commerciale *Saccharomyces cerevisiae* dans 100 ml de bouillon nutritif.
- ✓ Incuber à 37 °C pendant 24h. (suspension mère)
- ✓ Identifier la souche par le test rapide galerie biochimique Api biomérieux.  
La lecture des tests biochimiques positifs ou négatifs se traduit par un code qui sera introduit dans la base de données dite APIWEB pour confirmer la souche *Saccharomyces cerevisiae*. Voir Annexe
- ✓ A partir de la suspension mère, réaliser une série de dilution de 1/10<sup>ème</sup> jusqu'à obtenir 24,5 x 10<sup>4</sup> ufc/ml (moyenne).

**b. Préparation de l'extrait :**

- ✓ Diluer les extraits méthanoliques du fruit et de la partie aérienne dans de l'eau stérile pour obtenir une concentration de 100 mg/ml.
- ✓ Préparer, à partir de la solution mère, différentes concentrations : 4, 5 et 6 mg/ml.
- ✓ Préparer une solution à 3 mg/ml du médicament Hydréa (500mg).  
Hydréa utilisé dans le traitement de différents cancers et de certaines maladies rares (thrombocytémie essentielle).

**c. Etude de la viabilité des cellules par la méthode de coloration au bleu de méthylène :**

- ✓ A 1 ml des différentes concentrations préparées, rajouter 2,5 ml de bouillon déxtrose à la pomme de terre et 0,5 ml de l'inoculum de la souche *Saccharomyces cerevisiae*
- ✓ Préparer un témoin sans extrait.



- ✓ Incuber à 37°C pendant 24h.
- ✓ Calculer le nombre des cellules totales selon la formule suivante :  
**N° totale des cellules = nombre moyen de cellule par rectangle\* facteur de dilution \*10<sup>5</sup>.**
- ✓ Calculer le nombre de cellules viable selon la formule suivant :  
**N° de cellules viables = nombre moyen de cellule viables par rectangle\* facteur de dilution \* 10<sup>5</sup>.**
- ✓ Calculer le pourcentage de viabilité selon la formule suivante :  
**% de viabilité = (Nombre totales de cellules viables / nombre de cellules totale) \* 100**
- ✓ Calculer le % d'inhibition selon la formule suivante :

**% d'inhibition = 100- % de viabilité**

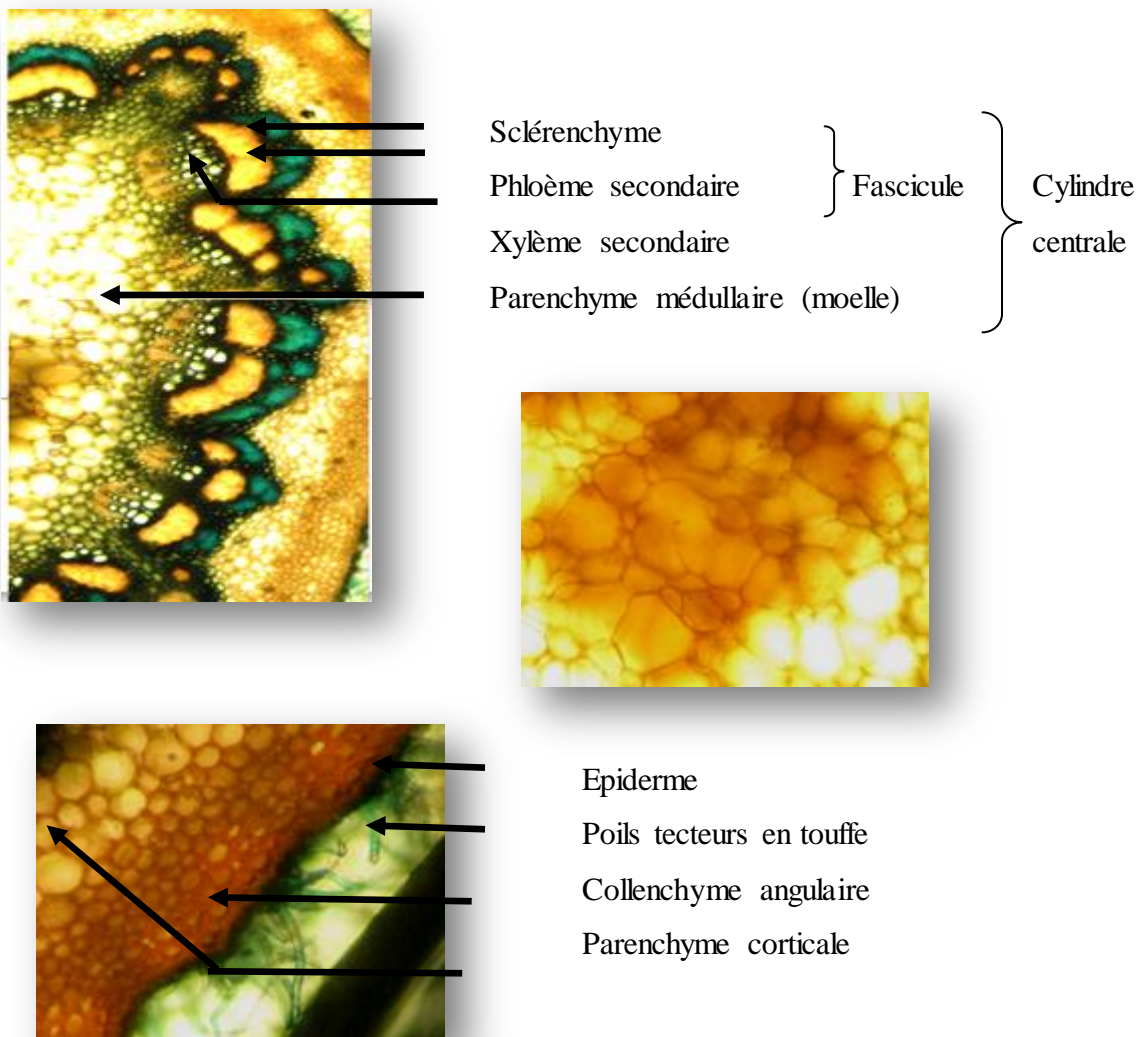
CHAPITRE III  
CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSIONS



### III-1. Etude histologique de la plante :

Les coupes histologiques au niveau de la feuille et de la tige de la plante *Rubus ulmifolius* Schott sont observées sous microscope photonique grossissement X40 puis prises en photos. Voir ci-dessous :



**Figure N° 5:** Coupe transversale dans la tige de *Rubus ulmifolius* observée sous microscope photonique G : 40 x. (Photos originales 2014)

Selon la figure ci-dessus, nous observons de l'extérieur vers l'intérieur, dans la tige de *Rubus ulmifolius*, les tissus suivants :

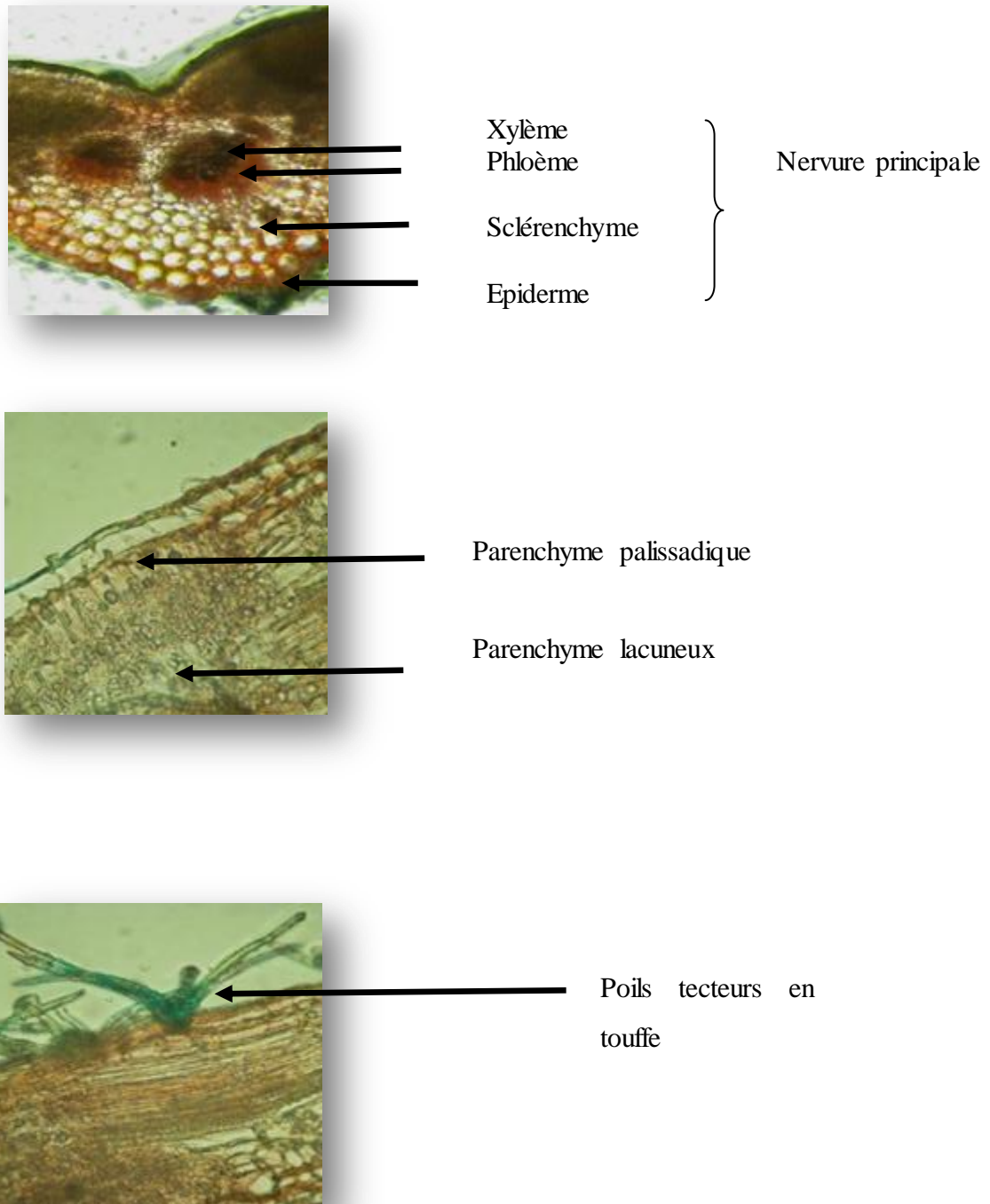
**a)- L'écorce :** est constituée par :

- Un épiderme :
- Un anneau de collenchyme : formé de plusieurs assises de cellules vivantes, dont l'épaississement cellulosique est en forme angulaire.
- Un parenchyme cortical : formé par des cellules plus ou moins arrondi à méats, les parois sont cellulosiques et minces.
- Un anneau de sclérenchyme : formé par des cellules mortes dont l'épaississement est formé par la lignine.

**b)- Le cylindre central :** est constitué par :

Des tissus conducteurs formés par :

- Le phloème secondaire.
- Le xylème secondaire
- Le phloème et le xylème forment un fascicule, entre deux fascicules on observe l'apparition d'une pachyte discontinue, c'est une assise génératrice libéroligneuse, qui donne ensuite naissance au bois et du liber.
- Un parenchyme médullaire ou moelle.



**Figure N° 6:** Coupe transversale dans la feuille de *Rubus ulmifolius* observée sous microscope photonique G : 40 x. (Photos originales 2014)

Suivant la figure ci-dessus, on peut observer dans la feuille de *Rubus ulmifolius* les tissus suivants :

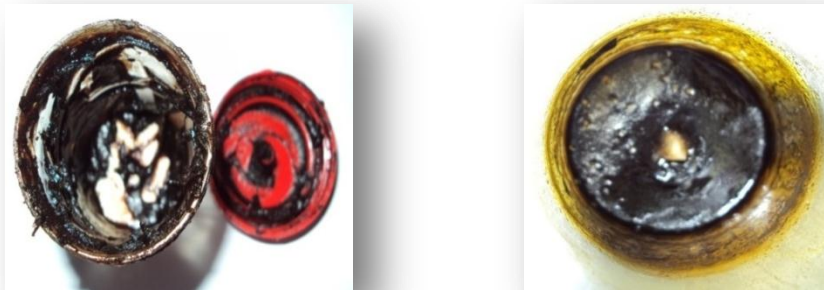
**a- un épiderme** : la feuille est recouverte d'un épiderme ventral et un épiderme dorsal. Seul l'épiderme dorsal présente des stomates, et menus de poils tecteurs.

**b- un mésophile** : constituée par deux types de parenchyme : un parenchyme palissadique et un parenchyme lacuneux. C'est un mésophile hétérogène.

**c- une nervure principale** : elle abrite les éléments conducteurs formés par le xylème et le phloème.

### III.2. Rendement d'extraction :

L'extrait méthanolique après passage au rotavapor a un aspect de caramel.



(a)(b)

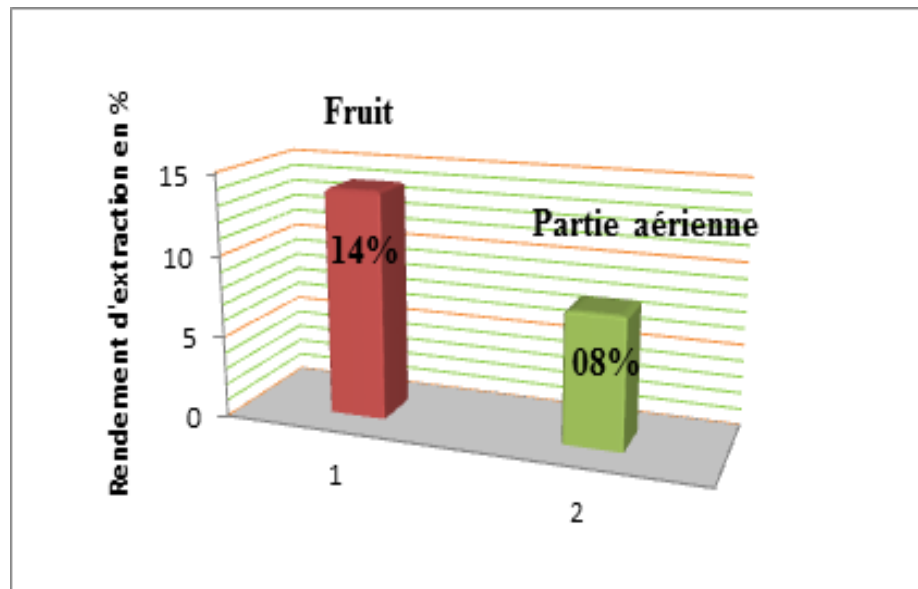
**Figure N° 7** : Aspect de l'extrait méthanolique du fruit (a) et de la partie aérienne (b).

Les rendements en extraits bruts (en %) dans la partie aérienne et le fruit de la plante sont obtenus en moyenne  $\pm$  l'écartype et sont présentés au tableau N° III et figure n°9:

**Tableau N° III** : Rendement d'extraction méthanolique partie aérienne et fruit.

Echantillon	Masse de l'extrait en g	Rendement d'extractions en % (m/m)*
Extrait fruit	04± 0,35	08
Extrait partie aérienne	07 ± 0,26	14

\*masse / masse

**Figure N° 08** : Rendement d'extraction de la partie aérienne et fruit

D'après le tableau et la figure N° 09, le rendement de l'extrait fruit (14%) est nettement supérieur de celui de la partie aérienne (8%).

Selon une étude menée par DAL AQUA et al(2008) sur la même espèce, le rendement en extrait brut de la partie aérienne est de 7,5 % ce qui concordeavec notre résultat (8%).

### III-3. Etude phytochimique de l'extrait méthanolique :

Les résultats de l'étude d'identification des composants phytochimiques effectuée sur l'extrait méthanolique fruit et partie aérienne est illustrée dans le tableau Tableau N° IV. Le signe (+) désigne la présence du composant à identifier tandis que le signe (-) désigne l'absence de ce dernier.

**Tableau N° IV:** Composants phytochimiques des extraits méthanoliques fruit et partie aérienne de la plante *Rubus ulmifolius* Schott

Composants phytochimiques	Extrait méthanolique Fruit	Extrait méthanolique Partie aérienne (tiges feuilles)
Alcaloïde	-	-
Flavonoïde	+	+
Anthocyane	+	+
Tannin	+	+
saponine	-	+

On note la présence des tanins, flavonoïdes et anthocyanes au niveau de la partie aérienne et le fruit.

La présence de saponines uniquement au niveau de la partie aérienne (tiges et feuilles).

L'absence des alcaloïdes au niveau de la partie aérienne (tiges et feuilles) et fruit.

Les résultats de l'étude phytochimique concordent avec ceux obtenus par **Panizzi et al., 200** ; **Sisti et al., 2008** ; **Hager et al., 2008** ; **Martini et al., 2009** ; **Kylli., 2011** ; **Chabane et al., 2014**.

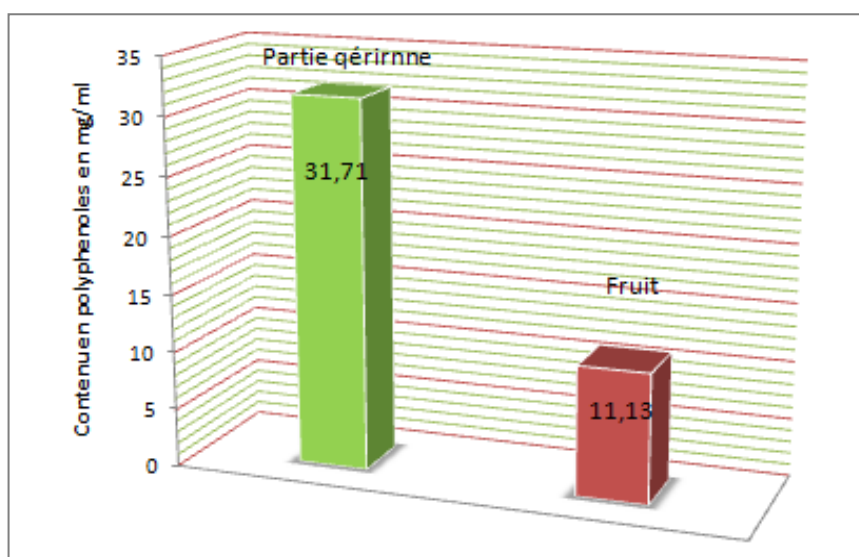
### III-4. Dosage des polyphénols :

Les résultats du contenu en polyphénols des extraits méthanoliques fruit et partie aérienne (tiges et feuilles) sont résumés dans le tableau N° V.



**Tableau N° V:** Contenu en polyphénols des extraits méthanoliques de *Rubusulmifolius*

Echantillon	Contenu en polyphénols (mg EAG/g de poids sec)
Extrait méthanolique Fruit	<b>11,13 ± 0,02</b>
Extrait méthanolique Partie aérienne (tiges feuilles)	<b>31,71 ± 0,02</b>

**Figure N° 09:** Comparaison du contenu en polyphénols de la partie aérienne et fruit

La teneur en polyphénols correspondante est rapportée en mg équivalent d'acide gallique / g d'extrait de plante en poids sec et déterminée par l'équation de type :  $y = a x + b$  voir annexe.

Le dosage des polyphénols de la partie aérienne, à donner une teneur de **31, 71± 0,02** mg EAG /g Ps supérieur à celle du fruit **11,13 ± 0,02** mg EAG /g Ps.

La teneur en polyphénol de la partie aérienne (tiges et feuilles) obtenue concorde avec celle obtenue par **Dall aqua et al., 2008** sur la même espèce (**27,6 ± 0.8** mg EAG/g Ps) contre **167,6 ± 6,1** mg EAG/g Ps résultat obtenu par **Luis et al., 2011**.

La quantité en polyphénols estimée au niveau du fruit est inférieure à celle obtenue par **Luis et al., 2011** (**54,5± 0,6** mg EAG/g Ps).

Nos résultats concordent avec ceux de **Dai, 2009** qui a travaillé sur le fruit du genre rubus (blackberry) et a trouvé une teneur en polyphénols allant de **12,00 ± 0,77** jusqu'à **14,81 ± 1,59** mg EAG/g Ps).

### III-5. L'évaluation de l'activité antioxydante :

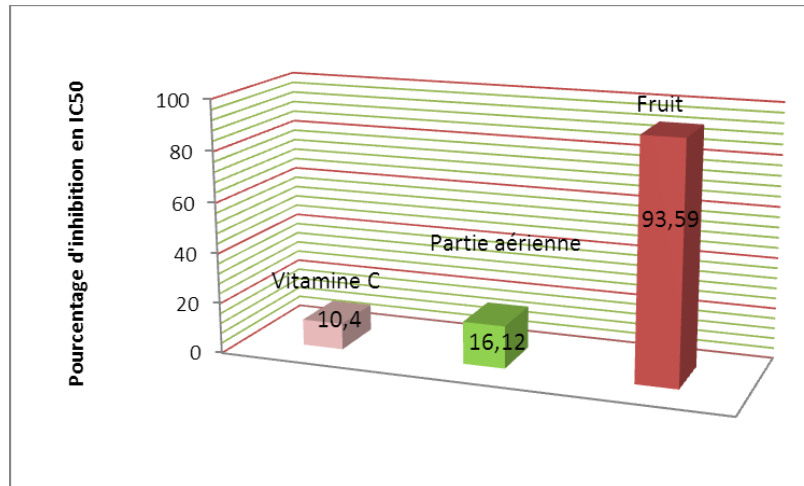
Le résultat de l'activité antioxydante des extraits méthanolique fruit et partie aérienne est exprimé en pourcentage d'inhibition de DPPH (IC50), correspondant à la concentration de l'extrait méthanolique capable de piéger 50% de DPPH est calculée selon l'équation :

$y = a \ln x + b$  pour la partie aérienne et  $y = a \ln x - b$  pour le fruit voir annexe.

Les résultats sont présentés dans le tableau N° VI et figure N° 10 :

**Tableau° VI:** L'activité antioxydante mesurée par pourcentage d'inhibition de DPPH

Echantillon	DPPH IC 50 (µg/ml)
Extrait méthanolique Fruit	93,59 ± 0,32
Extrait méthanolique partie aérienne (tiges et feuilles)	16,12 ± 0,92
Standard vitamine C	10,4 ± 1,40



**Figure N° 10:** Comparaison entre l'activité antioxydante du fruit, partie aérienne (Tiges et feuilles) et le standard vitamine C.

A partir de la figure ci-dessus nous constatons que la plante *Rubus ulmifolius* Schott présente une activité antioxydante et qui est inférieure à celle de la vitamine C.

Nous remarquons que la partie aérienne (tiges et feuilles) montre une très forte activité antioxydante estimée par IC 50 et égale à **16,12 ± 0,21 µg/ml** contre une activité modérée **93,59 ± 0,32 µg/ml** obtenu par fruit. L'étude statistique (voir Annexe) démontre qu'il y a une différence significative entre l'activité antioxydante du fruit, de la partie aérienne et l'acide ascorbique.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par **Luis et al., 2011** (**17,13 ± 1,2 µg/ml** pour les feuilles, **14,7 ± 1,2 µg/ml** pour la tige, **78,8 ± 5,9 µg/ml** pour le fruit).

L'extrait de la partie aérienne (tiges et feuilles) montre une activité inférieure à celle observée par **Dalacqua, 2008** (**8,3 ± 0,5 µg/ml**).

L'extrait fruit montre une activité supérieure comparativement à celle de **Martinez-cruz, 2011** (**148 µg/ml**) chez *Rubus adenotrichus* Schltdl.

La différence de l'activité antioxydante entre le fruit et la partie aérienne (tiges et feuilles) est attribuée à la différence en la nature et le contenu en polyphénols et saponines comme démontrés dans plusieurs études :

Selon **DAL AQUA (2008)**, l'activité antioxydante est liée à la nature des composés phénoliques (acide ferulique, acide caféique, quercetins, kaempferol)

**MARTINI et al (2009)**, qui a travaillé sur la même plante, confirme que : l'acide ferulique, l'acide caféique, quercetins, kaempferol, l'acide gallique, rutin et l'acide ellagique sont dotés d'activité antioxydante.

Selon **Luis et al (2011)**, les composants phénoliques de la partie aérienne et le fruit de la plante *Rubus ulmifolius* possèdent une activité antioxydante. Qui est due à la présence des composants phénoliques du fruit sont : acide vinylique, acide caféique, acide chlorogénique, acide Syringique, acide *p*-Coumarique, acide ferulique, acide ellagique, quercétin, flavonoïdes et de la partie aérienne qui sont : acide gallique, acide vinylique, acide caféique, acide chlorogénique, acide Syringique, acide *p*-Coumarique, acide ferulique, acide ellagique, quercétin, flavonoïdes et tannins.

La partie aérienne (tiges et feuilles) de la plante *Rubus ulmifolius* est plus riche en polyphénols, tanins et flavonoïdes ce qui explique l'activité antioxydante élevée par rapport au fruit.

Selon **Rice-evans et al (1996) ; Liet al (2009)**, Les acides phénoliques sont dotés d'une capacité antioxydante appréciable, qui augmente dans l'ordre suivant: acide protocatechique > acide caféique > acide *p*-hydroxybenzoïque > acide ferulique > acide vinylique > acide *p*-coumarique.

Les anthocyanes sont des flavonoïdes dotés d'un pouvoir antioxydant « scavengers de plusieurs oxydant comme : le radical hydroxyle (OH), radical peroxy (OOR), radical anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) du au groupe catéchol en conjonction avec plusieurs groupe hydroxyles (**Mates et al., 2011**).

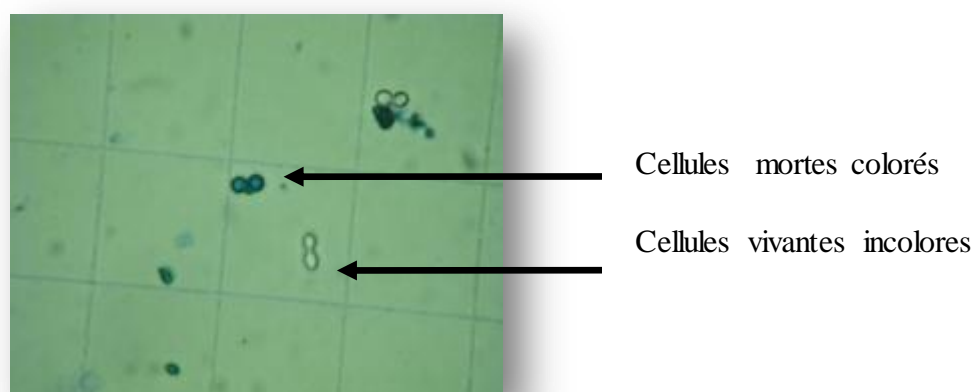
Les tannins condensés, classe importante de métabolites secondaires, présents d'une façon ubiquitaire dans les plantes gymnospermes et angiospermes, sont dotés d'une activité antioxydante (**Zhang et al., 2008**)

Les tannins et les flavanols présentent une forte activité antioxydante comparé aux certaines composants phénoliques (**Rice-evans et al., 1996; Chun et al., 2003; Cai et al., 2004**).

**Huonget al (1998)**, les saponines présentent une action protectrice contre les radicaux libres in vivo et in vitro.

### III-6. Etude de l'activité antiproliférative :

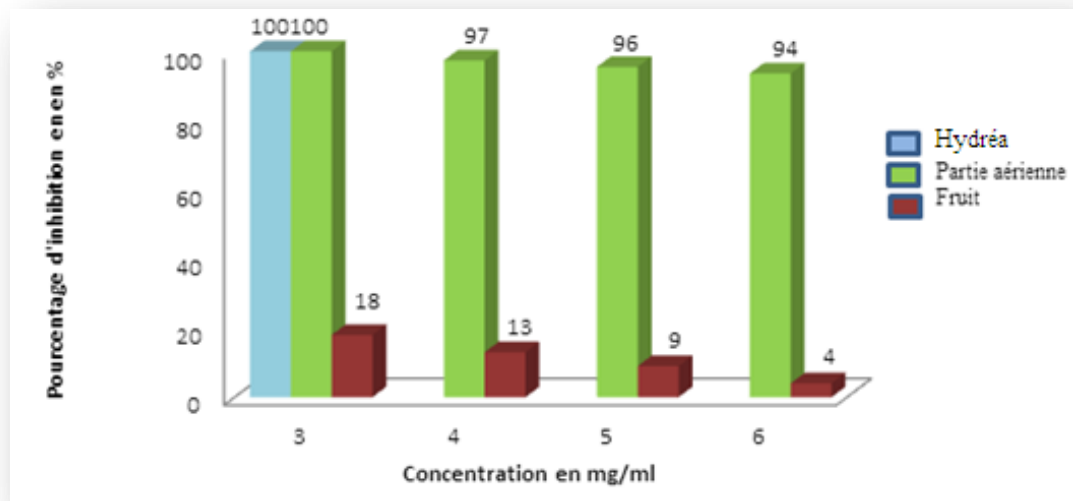
L'activité antiproliférative des extraits fruit et partie aérienne est exprimé en pourcentage d'inhibition. Sous microscope photonique GX 40, l'aspect des cellules mortes de *Saccharomyces cerevisiae* sont colorées en bleu et les cellules vivantes sont incolores. Voir résultats ci-dessous :



**Figure N° 11 :** Aspect des cellules *Saccharomyces cerevisiae* sous microscope photonique GX40. (Photos originales 2014)

**Tableau N° VII :** Pourcentage d'inhibition des cellules viables de la levure *Saccharomyces cerevisiae* par les différents extraits méthanoliques

Echantillon	% d'inhibition des cellules viables
Témoin	0
Hydréa	100
EM fruit 3mg	18
EM fruit 4mg	13
EM fruit 5mg	9
EM fruit 6mg	4
EM partie aérienne 3mg	100
EM partie aérienne 4mg	97
EM partie aérienne 5mg	96
EM partie aérienne 6mg	94



**Figure N° 12:** Histogramme pourcentage d'inhibition des différents extraits

Le fruit et la partie aérienne (tiges et feuilles) de la plante *Rubus ulmifolius* possèdent une activité antiproliférative démontrée dans la figure N° 12.

L'extrait fruit inhibe les cellules de *saccharomyces cerevisiae* le pourcentage d'inhibition des cellules varie de 18 à 4 % pour des concentrations variant de 3 à 6 mg/ml d'extrait.

La partie aérienne (tiges et feuilles) possède une activité antiproliférative (inhibitrice) plus importante que celle du fruit et qui varie de (97 % à 94 %) pour les mêmes concentrations alors qu'elle est comparable à celle du produit témoin Hydrea avec un pourcentage d'inhibition de 100% pour une concentration de 3 mg/ml d'extrait)

L'activité antiproliférative de la partie aérienne (tiges et feuilles) à donner un %d'inhibition des cellules de 97% pour une concentration de 4mg contre 48% pour la même concentration pour une étude qui a été faite sur *Vitisvinifera* ( **Hosseinpour et al., 2013** ) et sur *Matricaria chamomilla*.

L'extrait fruit possède une activité antiproliférative moins importante comparé aux travaux prés-cité.

L'activité antiproliférative du genre *Rubus* est liée à la nature des composants phytochimiques essentiellement les polyphénols : les flavonoïdes (anthocyanines, flavonols et flavanols) et les acides phénoliques (acides hydroxy benzoïques et hydroxy cinnamiques) (**Emma et al., 2012**).

Des études faites sur la propriété anticancéreuse du fruit de la ronce bleu et le fruit de la ronce en général, attribuent cette propriété aux anthocyanes (**Brown et al., 2012 ; Dekok et al., 2012; Varoni et al., 2012; Mates et al., 2011; Stan et al., 2008**).

D'après **GALATI et al (2004)**, l'étude démontre que les tannins sont dotés d'une activité anticancéreuse (cancer du sein, leucémie, prostate).

Selon **Tommasiet al (2000)**, deux saponines triterpéniques connues, ont été évaluées pour leurs activités antiprolifératives contre trois lignées de cellules (J774, HEK-293 et WEHI-164).

L'activité antiproliférative élevée donnée par la partie aérienne comparativement au fruit est due à la richesse en contenu polyphénolique.





C O N C L U S I O N

### Conclusion

Le présent travail vise la valorisation d'une plante connue sous le nom de *Rubus ulmifolius* Schott à travers la détermination de certaines propriétés pharmacologiques.

L'étude phytochimique a mis en évidence la présence : des tannins, des anthocyanes et des flavonoïdes, dans la partie aérienne ainsi que dans le fruit. La présence de saponine a été révélée uniquement dans la partie aérienne. La partie aérienne de la plante *Rubus ulmifolius* Schott possède une teneur en polyphénols, une activité anti-radicalaire supérieur à celle de la vitamine E et une activité antiproliférative plus importante que celle du fruit et comparable à celle du standard Hydrea.

De ce fait, *Rubus ulmifolius* Schott, peut être recommandée dans la prévention du cancer et des pathologies impliquant une production excessive de radicaux libres. Cependant, la mise au point de phyto-médicament à base de ces extraits, nécessite des études complémentaires en vue d'isoler et identifier les composés responsables des effets. Une étude de la toxicité in vivo est nécessaire pour déterminer la dose létale 50 %.

En perspective :

- Une étude plus précise et détaillée des composant phytochimiques avec des moyens plus performants tel que l'HPLC/MS et RMN qui permettra de mettre en évidence les composants phytochimiques responsable des activités antiprolifératives et antioxydants.
- Etudier l'activité antioxydante in vivo par le dosage des enzymes antioxydants tel que : glutathion, xanthine, oxydase etc...
- Réalisation des de l'activité antiprolifératives sur des cellules cancéreuses.



A N NEXE

## I.1. Coupes histologiques :

### Materiel

- Verres de montre
- Pince
- Lames porte objets
- Lames couvre objets
- Passoire
- Microscope
- Microtome
- Cassette
- Moule
- Plaque chauffante

### Réactif

- Paraffine
- Ethanol
- Toluène
- Formol
- Acide acétique
- Eau de javel
- Eau distillée
- Vert de méthyle
- Rouge Congo



Cassette avec échantillon parrainé



Microtome



Microscope

## I.2. Extraction

### Matériel

- Becher de 500 ml
- Bain ultrason
- Rotavapor



Bain ultrason

### Réactif

- Méthanol



Rotavapor

### I.3. Etude phytochimique

#### Réactif

- Chlorur ferrique 5 %
- NaoH 10 %
- Amonique
- Acide chloridrique 2 N (Normalité)
- Clorure ferrique concentré.
- Ethanol 45%

### I.4. Dosage des polyphenoles

#### Materiel

- Fiole jaugé de 5ml.
- Micropipette de 100 $\mu$ l
- Micropipette de 1000ml
- Balance analytique
- Spectrophotomètre UV-Visible perkinelmert



Balance analytique

#### Réactif

- Folin-ciocalteux.
- Bicarbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 10%.
- Eau distillée.



Spectrophotomètre UV-Visible

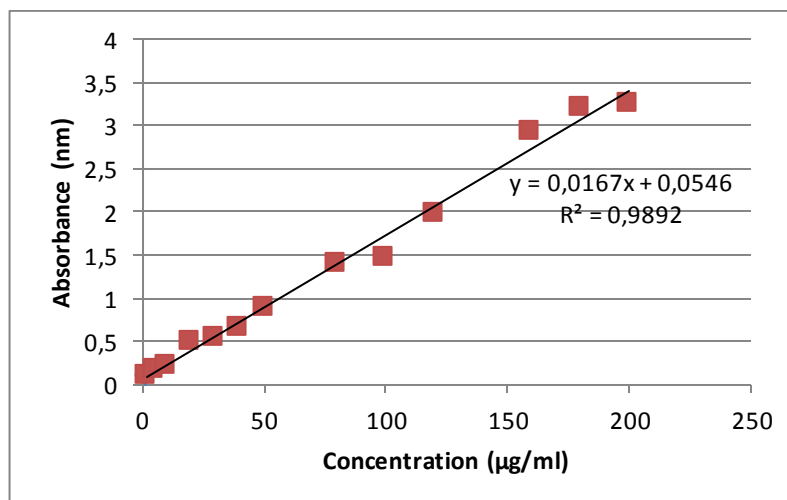


Figure N° 13: Courbe d'étalonnage d'acide gallique

### I.5. Etude de l'activité antioxydante

#### Matériel

- Fiole jaugé de 5ml.
- Micropipette de 100µl
- Micropipette de 1000ml
- Balance analytique
- Spectrophotomètre UV-Visible perkinelmer

#### Réactif

- Folin-ciocalteux.
- Bicarbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 10%.
- Eau distillée.

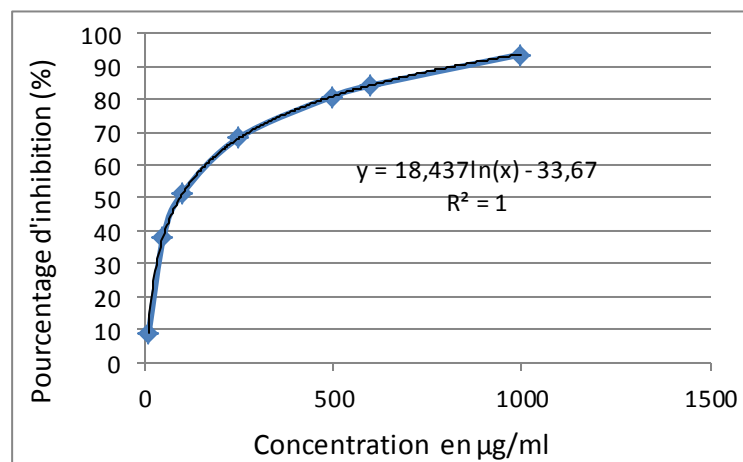


Figure N° 14 : Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait fruit

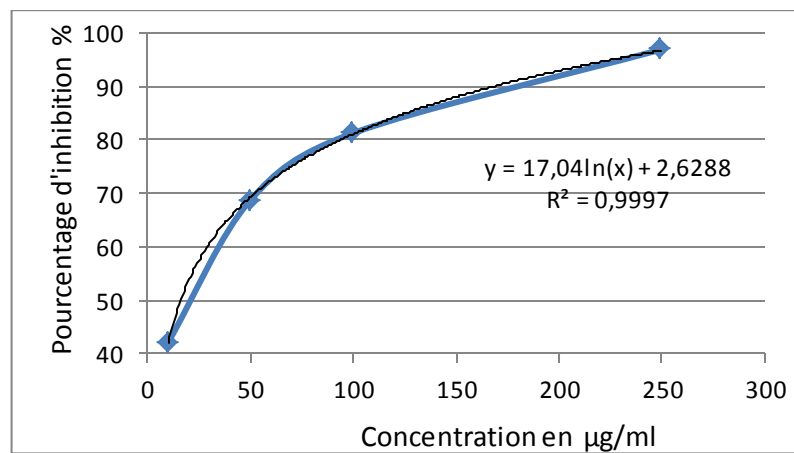


Figure N° 15 : Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait de la partie aérienne  
Aérienne (tiges et feuilles)



**Tableau N° VIII** : Etude statistique de l'activité antioxydante des extraits méthanoliques fruit, partie aérienne (feuille et tiges) et le standard vitamine C

Analyse de variance: un facteur

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
fruit	3	280,777	93,592333	0,0014651
feuille	3	48,3732	16,1244	0,0182276
vitamine C	3	31,2	10,4	0,01

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	12955,01	2	6477,5069	654453,09	9,63213E-17	5,1432528
A l'intérieur des groupes	0,059386	6	0,0098976			
Total	12955,07	8				

## I.6. Etude de l'activité antiproliférative

### Materiel

- Cellules Malassez
- Microscope
- Micropipettes
- Balance
- Agitateur
- Tubes à essai
- Logiciel API web

### Milieux de culture

- Bouillon à la pomme de terre.
- Eau distillée stérile.
- Gélose à la pomme de terre

### Réactif

- Bleu de méthylène.
- Galerie API d'identification biochimique (galerie Candida).



Logiciel apiweb



Médicament hydréa 500 mg



Cellule de malacessez

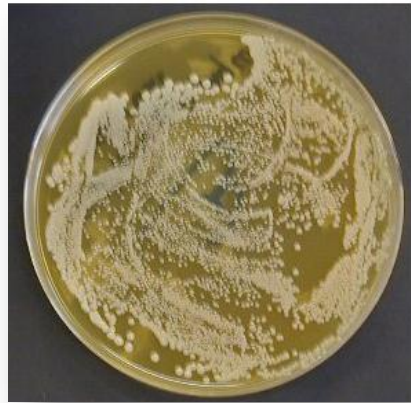


Figure N° 16 : Aspect de *Saccharomyces cerevisiae* sur milieu gélosé

BONNE IDENTIFICATION				
Galerie	ARI CANDIDA V2.1			
Profil	7300			
Note(s)				
Taxons significatif(s)	% ID	T	Test(s) à l'encontre	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98.8	1.0		
Taxon suivant	% ID	T	Test(s) à l'encontre	
<i>Candida famata</i>	1.0	0.51	RAF	1%

Figure N° 17: Identification biochimique *Saccharomyces cerevisiae* avec logiciel apiweb

udephytochimique :

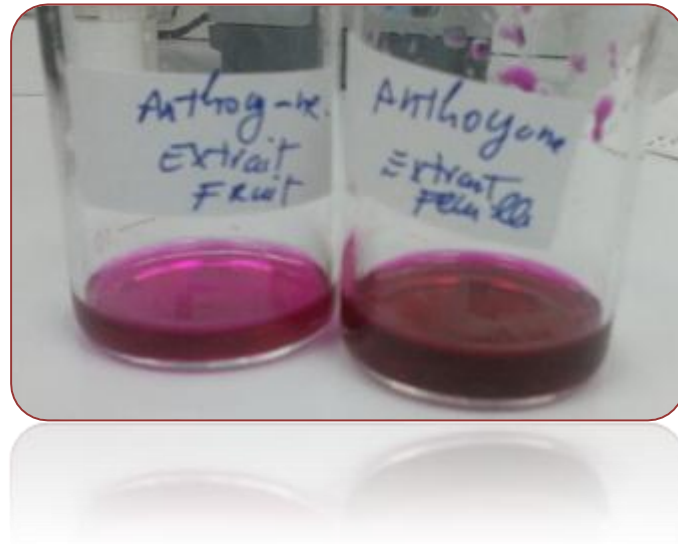


Figure : Identification des anthoyanes au niveau des la partie aérienne et le fruit chez *rubusulmifolius*schott

CHAPITRE IV  
CHAPITRE IV

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES  
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



## A

- Abdelhadi M., Meullemiestre A., Gelius A., Hassani A., Reaoug S.D, 2014. Intensification of *Hypericum perforatum* L. oilisolation by solvent-free microwave extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, v : 1556, 11p
- Beattie J., Crozier A et Duthie G.G, 2005.Potential health benefits of berries. *CurrNutr Food Sci*,vol : 1, 71-86 p

## B

- Bardeau F.,197 .La pharmacie du Bon Dieu. Paris, édition Stock, vol : 01, 334 p
- Bensegueni- tounsi L., 2001. Etude in vitro de l'effet antimicrobien et antifongique de l'*Inulaviscosa*..Thèse de magister en Médecine vétérinaire. Université de Constantine.
- Benhamza L, 2008.Effets biologiques de la petite centaurée *erythraeaentaurium (l.)pers*.Thèse de doctorat.
- Boyd N. F., et McGuire , 1991.The possible role of lipid peroxidation in breast cancer risk. *Free Radic.Biol.Med*, vol :10. 185-190 p
- BrownaE.M ., Gilla C.I.R., Mcdougallb G.J. et Stewart D,2012. Mechanisms Underlying the Anti-Proliferative Effects of Berry Components in *In Vitro* Models of Colon Cancer.*Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol : 13. 200-209 p
- Billy C, 1991. Glossaire de botanique. Ed : Paris, Lechevalier. 272 p
- Brand-Williams W. W., Cuvelier M. E., et Berset C, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, vol : 28. 25–30 p.

## C

Chabane D et Saidi F, 2014. Antimicrobial activity of leaves of *Rubus ulmifolius* Schott against some pathogenic bacteria and fungi and evaluation of the acute toxicity. Int j pharm bio sci, vol: 5, n° 2. 689-695 p

Chiej R, 1982. Les plantes médicinales. Collection ; Guide vert, ed : Solar. 446 p

Crozier A., Clifford M.N et Ashihara H, 2006. Plant Secondary Metabolites Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Ed : Blackwell Publishing. 372p

Chun O.K., Kim .D et Lee C.Y, 2003. Superoxide radical scavenging activity of the major polyphenols in fresh plums. J. Agric. Food Chem., vol : 51, n° :27. 8067-8072 p.

## D

Dai J, 2009. Preparation and characterization of blackberry extracts and their anticancer and anti-inflammatory properties. University of Kentucky doctoral dissertation.

D'archivio M., Cfilesi R., Dibenedetto R., Gargiulo C., Giovannini., et Masella R, 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist Super Sanita, Ed : Horace, Perse et juvéna, vol: 43, n°: 4. 348-61 p.

## E

Elumalai A et Chinnaeswariah M, 2012. International journal of phytotherapy, vol : 2. 96-105 p.

Evans K.J., Symon D.E., Whalen M.A., Hosking J.R., Barker R.M. et Oliver J.A, 2007. Systematics of the *Rubus fruticosus* aggregate (Rosaceae) and other exotic *Rubus* taxa in Australia. *Australian Systematic Botany* 20. 187-251p.

## F

Falleh H., KsouriR., ChaiebK., Karray-bouraouiN., TrabelsIN., BOULAABA M et AbdelyC, 2008. Phenolic composition of *Cynaracardunculus*L. organs, and their biological activities, Compt. Rend. Biol, vol : 331. 372-379 p.

Folta K M et GardinerS.G, 2009. Genomics. Genetics and economics of rosaceae. Ed : springer, vol :6. 617 p.

Fort G,1976. Guide de traitement par les plantes médicinales et phyto-cosmétologie. Ed : Heures de France, vol : 0. 655 p.

Fresco P., Borges F., Diniz. C et Marques M.P.M, 2006. New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. Medicinal Research Reviews, vol: 26. n°: 6. 747-766 p.

## G

Gabe M, 1968 . Technique histologique. Ed : Masson. 1113 p.

Gardindumesnil M, 1821. Synonyme latin, et leur differentes significations.

Griffith C, 2011. The materiamedica. Ed :watkins publishing, vol : 02. 509 p.

Galati G., O'Brien P., 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. Free RadicBiolMed ,vol : 37. 287–303 p.

## H

Hager T.J., Howard., L.R., Liyanage R., Lay J.O et Prior R.L, 2008. Ellagitannin composition of blackberry asdetermined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. J.



Halimi A, 1997. les plantes médicinales. Compte rendu. 290 p.

Hammer K., Ceffareli S., Perrino P et Laghetti G. Dynamics of *rubusulmifoliusanoplothyrsussudre* and other cultivated blackberries in italy. Generic ressources and grop evolution, vol: 51. 237-239 p

Hosseinpour M., Mobini-dehkordi M.,Saffar B et Teimori H, 2013. Antiproliferativeeffects of *Matricariachamomilla* on *Saccharomyces cerevisiae*. J HerbMedPharmacol, vol : 2 n° 2. 49-51 p.

Hummer K, 2010. *Rubus* Pharmacology: Antiquity to the Present. Hortscience, vol: 45 n° 11. 1587-1591 p.

Huong N. T., Matsumoto K ., Kasai R., Yamasaki K ., et Watanabe H, 1998. In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components. BiolPharm Bull, vol :21. 978-981p.

#### 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.

#### K

Kouamé J ., Gnoula C., Palé E ., BassoléH., Guissou i P., SimporéJet Nikiéma J. B, 2009 . Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guierasenegalensis* J. F. Gmel(Combretaceae),vol : 32, n° 1 et 2. 09-23 p.

Kylli P, 2011. Berry phenolics: isolation, analysis, identification, and antioxidant properties.Thèse de doctorat. EKT-series 1502.University of Helsinki. Department of Food and Environmental Sciences. 90p.

#### L

Lue B.M., Nina Nielsen S., Jacobsen C., Hellgren, L., Guo Z., Xu,X., 2010.

Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. *Food Chem*, v : 123, 221–230 p.

## M

Makkar H.P.S., Siddhuraju P et Becker K, 2007. *Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology* 393, ed: HUMANA PRESS. 67-111 p.

Martínez-cruz N.S., Arévalo-niño K., Verde-star M.J., Rivas-morales C., Oranday-cárdenas A., Núñez-gonzález A et Morales-rubio E , 2011. Anthocyanins and anti free-radical activity of *Rubus adenotrichus* Schldl (blackberry). *Revumexicaine des sciences pharmaceutiques*. vol : 42, n° : 4.

Martin S., D'addario C., Colacevich A., Focardi s., Borghini F., Santucci A., Figura N et Rossi C, 2009. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1-46 p.

Mensor L.L., Menezes F.S., LEITÃO G.G., REIS A.S.; SANTOS T.C., Coube C.S.; Leitão S.G, 2001. "Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method". *Phy. Tother. Res.* 127-130 p.

## N

Negrette R., Backhouse N et Bravo B, 1987. Quelques flavonoïdes de *Centaurea flosca*. *Plantes médicinales et phytothérapie* T.21, n°2. 168-172 p.

## P

Pincemail J., Meurisse M., LIMET R., Defraigne J.O, 1999. Espèces oxygénées activées, antioxydants et cancer, *Medi-Sphere*, vol : 97. 29-33p.

Pandeyrupehet Pandeyravindrashuklass, 2013. Potentiel anti-inflammatoire of ethanol

extract of *Rubusulmifolius* (Schott). Research Journal de Pharmacie et de la technologie, vol : 06, n° : 06. 300-303 p.

Panichayupakaranant P etKaewsuwan S, 2004. Bioassy-guided isolation of the antioxidant constituents from cassia alata L. leaves”, SongklanakariniSci.Tec, vol : 26 n° 1. 103-107 p.

Panizzi L.,Caponi C., Catalano S.,Cioni P.L et MorelliniI, 2001,- vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubusulmifolius*. Journal of Ethnopharmacologyvol, vol: 79. 165–168 p.

Periyamayagam K., kasirajan B., Karthikeyan V., Indumathi R et KumudaT , 2013. vitisvinifera.l (vitaceae) leaves towards antimitotic and antiproliferative activity in anticancer drug discovery. Innovare Journal of Health Sciences, vol:1, n° : 3. 32-35 p.

## R

Rice-evans C.A., MILLER .N.J eTPaganga G, 1996,-Structureantioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, Free Radic. Biol. Med, vol :20, n° : 07. 933-956 p.

Rice E L, 1984 . *Allelopathy*. Ed : Academic Press. 422 p.

## S

Samuel-peterson N, 2013. Cultural Competence in the Prevention and Treatment of Cancer: The Case of Blueberries in North America, scientific reseach,vol :3. n°: 2. 65-70 p.

Sariburun E., Sahin S., Demir C., Türkben C et Uylaşer. V , 2010 . Phenolics content and antioxydant activity of raspberry and blackberry cultivars. J. Food Sci,vol : 75 n°: 4. 328-335 p.

Sava C., Sirbu R et Dumitrescu C, 2006. Analyse qualitative et quantitative des anthocyanes dans des produits naturels. scientificstudy&research, vol: 4. 785-798 p.

Sersoub D, 2012. Aménagement et Sauvegarde de la Biodiversité de la Vallée d'Oued BousselemSétif, thème de magistère.142 p.

Sisti M., De Santi M., Fraternali D., Ninfali P., Scoccianti. V etBrandi. G, 2008. Antifungal activity of Rubusulmifolius Schott standardized in vitro culture. LWT - Food Sci. Tech, vol: 41. 946-950 p.

## T

Tommasi.,Autore G., Bellino A., Pinto A., Pizza C., Sorrentino R et Venturella P, 2000. Antiproliferativetriterpenesaponins from Trevesiapalmata. J Nat Prod,vol : 63. 308-314 p.

## U

Uncinimanganelli R.E., Tomei P.E, 1999. Ethnopharmabotanical studies of the Tuscan arcipelago. Journal of Ethnopharmacology, vol : 65. 181–202 p.

## W

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

## Z

Zhang L.L et Lin.Y.M, 2008. HPLC, NMR and MALDI-TOF MS Analysis of Condensed Tannins from *Lithocarpus glaber* Leaves with Potent Free Radical Scavenging Activity, *Molecules*, vol :13. 2986-2997 p.

**Site internet (base de donnée reconnues):**

[www.tela-botanica.org](http://www.tela-botanica.org) fiche eFlore de *Rubus ulmifolius*

<http://www.ncbi.nih.gov/Taxonomy/Browser/>

<http://www.itis.gov/servlet/SingleRp>: integrated taxonomic information System

<http://obsolete.uniprot.org/taxonomy/75099>

<http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=an&id=152902>

African Plant Database