

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES
DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MAGISTER EN BIOLOGIE**

Option : « Produits naturels : Activités biologiques et synthèses »

Présentée par

ATTOU Amina

***Contribution à l'étude phytochimique et activités
biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis*
(Fidjel) de la région d'Ain Témouchent***

Soutenue publiquement le

devant le Jury composé de :

Président

Mme. ATIK née BEKKARA F.

Professeur

Promoteur

Mr. BENMANSOUR A.

Professeur

Examineur

Mr. LAZOUNI H.A.

Maître de conférences

Examineur

Mr. ABDELOUAHED D.

Professeur

Année universitaire : 2010-2011

RESUME

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et des activités antioxydant et antimicrobienne de *Ruta chalepensis* de quatre stations de la wilaya d'Ain Témouchent.

Ruta chalepensis L. est une plante aromatique, appartenant à la famille des rutacées, appelée communément par la population locale « Fidjel ». Elle est spontanée, largement répandue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie.

La rue est une plante aromatique médicinale encore utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, abortif, antiépileptique, emménagogue et pour le traitement de pathologies cutanées.

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence de coumarines, flavonoïdes, d'alcaloïdes, tanins et de stérols et triterpènes. Cette richesse est confirmée par des rendements comprises entre 5.7-32.15%, 1-5.6% et 0.26-2.39 successivement pour les extraits bruts, des flavonoïdes et des alcaloïdes qui sont extraits à partir des trois parties de la plante par des solvants appropriés (le méthanol absolu pour l'extrait brut, mélange alcool/eau à 70% et l'acétate d'éthyle/eau : V/V pour l'extraction des différents types de flavonoïdes mise en évidence, extraction par l'acide acétique/éthanol à 10% des alcaloïdes puis leur précipitation par l'ammoniac).

Les extraits bruts, flavoniques et alcaloïdiques ont montrés des pouvoirs moyens de réduction de Fer et de piégeage de radical libre DPPH. Les IC50 sont comprises entre 1 et 12 mg/ml.

Les huiles essentielles de la partie aérienne de la plante, obtenues par hydrodistillation ont révélés des rendements importants (avant floraison : 0.40-1.80, pendant floraison : 0.48-1.90) comparativement parlant aux études réalisées sur la même espèce dans d'autres pays.

Les huiles essentielles des quatre stations ont de bonnes activités antibactériennes. L'huile essentielle de la station d'Ain Tolba est la plus active contre *Pseudomonas sp* (19 mm de diamètre d'inhibition). Celle de la station de Sidi Safi est la plus active contre *Staphylococcus sp* et *Candida albicans*, et celle de Beni Rhanane est plus active contre *Bacillus sp* et *Escherichia sp* (CMI de 15 et 125 µg/ml successivement).

Mots clés : *Ruta chalepensis*, métabolites secondaires, huile essentielle, pouvoir antioxydant, FRAP, piégeage du DPPH, activité antimicrobienne.

SUMMARY

Our work focuses on the study of phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activities of *Ruta chalepensis* from four stations in the wilaya of *Ain Temouchent*.

Ruta chalepensis L. is an aromatic plant belonging to the family of Rutaceae, commonly called by locals “Fidjel”. It is spontaneous, largely spread in North Africa, especially Algeria.

The rue is a medicinal aromatic plant still used in traditional medicine in many countries as a laxative, anti-inflammatory, analgesic, antispasmodic, abortifacient, antiepileptic, emmenagogue and for the treatment of skin diseases.

The phytochemical screening revealed the presence of coumarins, flavonoids, alkaloids, tannins and sterols and triterpenes.

The preparation of crude extracts, of flavonoids and alkaloids from the three parts of the plant by specific solvents and the extraction of essential oil of the whole plant have revealed significant returns.

These extracts (crude extracts, flavonoids and alkaloids) have shown a medium powers to reduce Iron and free radical scavenging (DPPH), which means the IC50 is between 1 and 12 mg / ml. The essential oil of the four stations has a good antibacterial activity against several species including *Bacillus sp*, *Escherichia sp*, *Staphylococcus sp* and even against *Pseudomonas sp*, especially the essential oil of the station of Ain Tolba. The essential oil of Sidi Safi has the most activity against *Staphylococcus sp* and *Candida albicans* and the Beni Rhanane’s one is the most active against *Bacillus sp* and *Escherichia sp*.

Keywords: *Ruta chalepensis*, secondary metabolites, essential oil, antioxidant power, FRAP, free radical scavenging DPPH, antimicrobial activity.

ملخص

عملنا يركز على دراسة المواد الكيميائية النباتية المضادة للأكسدة و مضادات الميكروبات لنبتة السذاب في أربع محطات من ولاية عين تموشنت.

السذاب نبات عطري ينتمي إلى عائلة Rutacées ، يطلق عليه السكان المحليون اسم الفيجل أو الفيجن ، ينتشر إلى حد كبير في شمال افريقيا والجزائر خصوصا.

السذاب أو الشذاب من النباتات الطبية العطرية لا تزال تستخدم في الطب التقليدي في كثير من البلدان باستخدامه كمسهل ، مسكن مضاد للالتهابات ، مضاد للتشنج ، مجهض ، مطمئ ولعلاج الأمراض الجلدية.

وكشف الفحص الكيميائي النباتي وجود ، كومارينات، الفلافونات، الفلويدات، التانينات، الستيروول والتربينات الثلاثية.

وقد كشف استخراج المستخلص الخام، الفلافونويدات و قلويدات من الأجزاء الثلاثة للنبتة بالمذيبات وكذلك الزيوت الأساسية للجزء الهوائي للنبتة عائدات معتبرة، حيث أنها تتأثر سواء بالجزء النباتي المستعمل أو ظروف محطة الجني.

كما أظهرت هذه المستخلصات (الخام ، قلويدات و الفلافونويد) قدرة متوسطة للحد من صلاحيات الحديد والمجموعات الذرية الحرة (DPPH)، مما يعني تركيزات لصيد 50 بالمئة من الجذور الحرة متوسطة تتراوح بين 1 و 12 ملغم / مليلتر.

فيما اظهر الزيت الطيار نشاطا جيدا ضد أنواع عديدة من البكتيريا من بينها العصويات ، الاشيريشيا، الستافيلوكوك و حتى البسودومونا.

كلمات البحث : السذاب ، المواد الأيضية الثانوية، زيوت طيارة، والمجموعات الذرية الحرة، مضاد للأكسدة ، مضاد للنشاط البكتيري.

DEDICACE

A mes parents,

Pour vos mains qui ont tant travaillées,

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour vos yeux qui furent parfois mouillés,

Pour vous qui m'avez tant aimé.

A mes sœurs : Amel, Ghania, Soria et Aicha.

A mes frères: Djamel, Amar et Larbi.

A mes belles sœurs.

A mes beaux frères.

A mes neveux et nièces.

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université: Aicha,

Asmaa, Imene, Nadia, Wafaa,

Sans oublier : Zahera, Latifa et Naziha

A mes amies de la promotion de magister de Produits Naturelles : Ikram, Khadidja, Meriem, Nabila et

Malika.

A: Wahiba, Nacera, Fouzia, Meriem, Ilham, Tarek et Yasser

A tous qui me connaissent de près ou de loin.

REMERCIEMENTS

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

Avant toute chose, je remercie **Dieu**, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.
الحمد لله الذي أعانني على إنهاء هذا العمل و سخر لي القوة لإتمامه فكل توفيق منه وحده و كل سهو أو خطأ فمني
و من الشيطان.

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur **BENMANSOUR Abdelhafid**. Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse au sein du laboratoire de Produits Naturelles : activités biologiques et synthèse à l'Université **Abou Bekr Belkaid Tlemcen**. Merci pour votre encadrement sans faille tout au long de ces trois années.

A Madame **CHAOUCHE née HADDOUCHI Farah**, qu'il fut agréable et motivant d'avancer dans ce long et périlleux travail de thèse mais tellement enrichissant et stimulant avec toute ta bienveillance, ta disponibilité, et ton savoir.

Je remercie le Professeur **ATIK née BEKKARA F.** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Qu'il soit assuré de ma plus entière reconnaissance pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie vivement Mr. **LAZOUNI H.A.** maître de conférences à l'université de Tlemcen pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie du jury de cette thèse. C'est un très grand honneur et un très grand plaisir d'avoir pu faire votre connaissance et de pouvoir aujourd'hui vous soumettre mes travaux de recherche.

J'adresse mes profonds remerciements à Mr. **ABDELOUAHED D.** pour avoir accepté de juger ce travail et de faire partie de mon jury de thèse. Consciente de vos nombreuses responsabilités, je suis particulièrement touchée du temps que vous m'avez accordé.

C'est un grand merci que j'adresse à tous les membres du Laboratoire de Produits Naturelles : activités biologiques et synthèse de l'Université de Tlemcen pour leur gentillesse, leur écoute et leurs conseils: Professeurs, maîtres de conférences, techniciens et secrétaires et étudiants.

Je remercie tout particulièrement ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix, et qui été présente chaque fois que cela a été nécessaire. Merci Maman, Merci Papa, Merci mes Sœurs, mes Frères. C'est avec vous que j'ai partagé mes joies, mes peines, vous m'avez soutenu grâce à votre présence, à votre sourire, à votre amitié.

Et enfin, il y a les compagnons de route, ceux avec qui l'on partage les joies du quotidien, les doutes, je suis heureuse de vous avoir rencontré. Un grand merci à Aïcha, Asmaa, Imene, Nadia, Wafaa, Zahera, Latifa et Naziha. A ma promotion de magister, et à tous les étudiants du Laboratoire de Produits Naturelles Tlemcen.

TABLEAUX
FIGURES
PHOTOS
ABBREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n° 1: Les différentes classes des composés phénoliques.	9
Tableau n° 2: Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes Biologiques.	31
Tableau n° 3 : Situation géographique des quatre stations d'étude.	37
Tableau n° 4: Les souches microbiennes.	48
Tableau n° 5: Influence du lieu de récolte et la partie de la plante sur la teneur en eau (exprimée en %).	50
Tableau n° 6: Les groupes chimiques dans la poudre de feuilles de <i>Ruta</i> dans les 4 stations d'études.	51
Tableau n° 7: Les groupes chimiques caractéristiques de la poudre de tige des quatre stations.	51
Tableau n° 8: Les groupes chimiques dans la poudre de fleur.	52
Tableau n° 9: Rendement en extraits bruts.	53
Tableau n° 10: Rendements en extraits flavoniques (%).	54
Tableau n° 11: Rendements en extraits alcaloïdiques.	54
Tableau n° 12: Rendement en huile essentielle (en %).	55
Tableau n° 13: Les indices physicochimiques de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> .	56
Tableau n° 14: les indices physicochimiques de l'huile essentielle de <i>R.chalepensis</i> de la région de Tlemcen (Beni Mester) obtenus par l'étude de MERGHACHE et al, 2009.	56
Tableau n° 15: Valeurs des IC50 (en mg/ml) des extraits de <i>Ruta chalepensis</i> et de l'Acide Ascorbique.	64
Tableau n° 16: Les souches microbiennes.	67
Tableau n° 17: Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) par la méthode de disques.	67
Tableau n° 18: Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles des quatre stations.	68
Tableau n° 19: Classification biochimique des huiles essentielles.	88

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : <i>Ruta chalepensis</i> .	5
Figure n° 2: Classification biogénétique des alcaloïdes des Rutacées.	7
Figure n°3 : La rutine.	8
Figure n° 4: Biosynthèse des terpènes.	10
Figure n° 5: Biosynthèse des composés azotés.	10
Figure n° 6: Biosynthèse des métabolites secondaires.	11
Figure n°7: Structure des différentes classes des flavonoïdes.	12
Figure n°8: L'origine biosynthétique du squelette flavonique.	12
Figure n° 9: Biosynthèse des flavonoïdes.	13
Figure n°10: Schéma général de synthèse d'alcaloïdes.	17
Figure n°11: Schéma des étapes de l'hydrodistillation.	21
Figure n°12: Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur de l'eau.	22
Figure n°13 : Schéma du système d'extraction CO2 des solides.	23
Figure n° 14: Formation d'IPP par la voie de l'acide mévalonique.	24
Figure n° 15: Formation d'IPP à partir du deoxyxylulose phosphate.	25
Figure n°16 : Biosynthèse des terpènes à partir d'IPP.	26
Figure n°17 : Le passage entre les différents types de terpènes.	26
Figure n°18: Illustration de la méthode des aromatoigrammes sur boîte de Pétri.	28
Figure n°19 : Illustration de la méthode des microatmosphères.	29
Figure n°20 : Les principales sources cellulaires des espèces oxygénées réactives.	32
Figure n°21: Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives.	33
Figure n°22: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants.	34
Figure n°23 : Schéma du mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification enzymatique.	35
Figure n° 24: La carte de situation des différentes zones d'études.	37
Figure n° 25: Protocole d'extraction des flavonoïdes.	41
Figure n°26 : Protocole d'extraction des alcaloïdes.	42
Figure n°27: Schéma d'utilisation d'une microplaque.	49
Figure n° 28: Pouvoir réducteur des extraits bruts et de l'acide ascorbique.	57
Figure n° 29: Pouvoir réducteur des extraits flavoniques et de l'acide ascorbique.	57
Figure n° 30: Pouvoir réducteur des extraits alcaloïdiques et de l'acide ascorbique.	58

Figure n° 31: Pouvoir réducteur de tous les extraits de <i>Ruta chalepensis</i> .	58
Figure n° 32: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	59
Figure n° 33: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'Acide Ascorbique.	59
Figure n° 34: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits bruts des tiges.	60
Figure n° 35: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits bruts des feuilles.	60
Figure n° 36: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits bruts des fleurs.	61
Figure n° 37: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits flavoniques des tiges.	61
Figure n° 38: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits flavoniques des feuilles.	61
Figure n° 39: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits flavoniques des fleurs.	62
Figure n° 40: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits alcaloïdiques des tiges.	62
Figure n° 41: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits alcaloïdiques des feuilles.	63
Figure n° 42: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits alcaloïdiques des fleurs.	63
Figure n° 43: Les IC50 des différents extraits de <i>Ruta chalepensis</i> et de l'acide ascorbique.	64
Figure n° 44: Biogramme aromatique.	87
Figure n° 45: Distillateur de l'ère moyenne.	87

LISTE DES PHOTOS

Photo n°1: Montage d'hydrodistillation.	43
Photo n° 2: Réduction du fer ferrique en fer ferreux.	47
Photo n° 3: Réaction de cyanidine positive.	91
Photo n° 4: Réaction de WAGNER et MAYER positive.	91
Photo n° 5: Réaction de Stiasny positive pour les tanins catéchiqes.	91
Photo n° 6: Réaction de Lieberman-Burchard positive.	91
Photo n° 7: Spectrophotomètre.	92
Photo n° 8: Rotavapor.	92
Photo n° 9: Centrifugeuse.	92
Photo n° 10: Balance analytique.	93
Photo n° 11: Etuve.	93
Photo n° 12: Activité huile essentielle contre <i>Bacillus cereus</i> .	94
Photo n° 13: Activité huile essentielle contre <i>Escherichia coli</i> .	94

Photo n° 14: Activité huile essentielle contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	95
Photo n°15: Microplaque avec les CMI.	89
Photo n°16: Station d'Ain Tolba.	90
Photo n°17: Station de Sidi Safi.	90
Photo n°18: Station de Beni Rhanane.	90
Photo n°19: Station de Sidi Ben Adda.	90
Photo n°20: Les huiles essentielles des quatre stations.	91
Photo n°21: Extraits bruts de tige (T), feuille (F) et fleur (Fl) de la station de Sidi Ben Adda (4).	91
Photo n°22: Extraits flavoniques de tige (T), feuille (F) et fleur (Fl) de la station de Sidi Safi (2).	91
Photo n°23: Extraits alcaloïdiques de tige (T), feuille (F) et fleur (Fl) de la station de Sidi Ben Adda (4).	91
Photo n°24: Tous les extraits réalisés sur <i>Ruta chalepensis</i> .	92

LISTE DES ABREVIATIONS

O.M.S : Organisation Mondiale de la Santé

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

% : Pourcent

m : Mètre

cm : Centimètre

CO₂ : Dioxyde de carbone

INSA : Institut Scientifique d'Aromatologie

H.E.B.B.D : Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie

IPP : Isopentenyl pyrophosphate

°C : Degré Celsius

K⁺: Ion potassium

ATPase: Adénosine triphosphatase

AMP: Adénosine monophosphate

ADP: Adénosine diphosphate

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

O₂^{•-}: Anion superoxyde

OH[•]: Radical hydroxyle

NO[•]: Monoxyde d'azote

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

HOCl: Acide hypochlorique
 $^1\text{O}_2$: Oxygène singulier
 ONOO^- : Peroxynitrite
RO: Radical alcoxy
ROO: Radical peroxy
SOD: Superoxyde dismutase
CAT: Catalase
GPx: Glutathion peroxydase
GSH: Glutathion
GR: Glutathion réductase
 H_2O_2 : Eau oxygénée
Fe : Fer
Cu : Cuivre
Mn : Manganèse
CAT : Catalase
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 Fe^{2+} : Fer ferreux
 Fe^{3+} : Fer ferrique
 Cu^{2+} : Ion cuivrique
 Cu^+ : Ion cuivreux
UV: Ultra violet
g : Gramme
ml: Millilitre
 H_2SO_4 : Acide sulfurique
KI: Iodure de potassium
 HgCl_2 : Chlorure de mercure
 I_2 : Iode
N: Normal
mn: Minute
 NH_4OH : Ammoniac
 FeCl_3 : Chlorure de fer
NaOH: Hydroxyde de sodium
HCl : Acide chlorhydrique
 T° : Température
m/V : Masse à Volume
V/V : Volume à Volume

KHz : Kilohertz

NaHCO₃ : Bicarbonate de sodium

mole/l : Mole par litre

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

nm: Nanomètre

M: Molaire

K₃Fe (CN)₆ : Ferricyanure de potassium

H₂O : Eau

µl : Microlitre

IC₅₀ : Concentration inhibitrice de 50 %

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

UFC : Unité formant colonie

µg : Microgramme

mm : Millimètre

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CA-SFM: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

DMSO: Dimethylsulfoxyde

IM: Indice de Mousse

CG: Chromatographie en phase gazeuse

CG/SM: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

TABLE DE MATIERES

Résumé	<i>i</i>
Dédicace	<i>iv</i>
Remerciement	<i>v</i>
Liste des tableaux	<i>vi</i>
Liste des figures	<i>vii</i>
Liste des photos	<i>viii</i>
Liste des abréviations	<i>ix</i>
Table de matières	<i>xii</i>
Introduction	<i>1</i>
Première partie : Synthèse bibliographique	
Introduction à la phytothérapie	<i>2</i>
I. Description de plante	<i>3</i>
1. Rutaceae	<i>3</i>
2. Ruta (rue)	<i>3</i>
3. Ruta chalepensis	<i>4</i>
4. Systématique	<i>5</i>
5. Usage et toxicité	<i>6</i>
6. Composition chimique	<i>7</i>
II. Métabolites secondaires	<i>9</i>
1. Définition et fonction	<i>9</i>
2. Classification des métabolites secondaires	<i>9</i>
2.1. Les composés phénoliques	<i>9</i>
2.2. Les isoprénoïdes : (stéroïdes et terpénoïdes)	<i>10</i>
2.3. Les composés azotés (dérivés des acides aminés) : alcaloïdes	<i>10</i>
3. Biosynthèse des métabolites secondaires	<i>11</i>
4. Les flavonoïdes	<i>11</i>
4.1. Définition, classification et biosynthèse	<i>11</i>
4.2. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes	<i>14</i>
5. Les alcaloïdes	<i>15</i>
5.1. Définition, classification et distribution des alcaloïdes	<i>15</i>
5.2. Activités pharmacologiques	<i>16</i>
5.3. Biosynthèse des alcaloïdes	<i>17</i>
6. Les huiles essentielles	<i>18</i>
6.1. Introduction à l'aromathérapie	<i>18</i>

6.2. <i>Qu'est-ce qu'une huile essentielle?</i>	19
6.3. <i>Comment utiliser les huiles essentielles?</i>	20
6.4. <i>Les méthodes d'extraction</i>	21
6.4.1. <i>L'hydrodistillation</i>	21
6.4.2. <i>Extraction par entraînement à la vapeur d'eau</i>	22
6.4.3. <i>L'expression au solvant volatil</i>	22
6.4.4. <i>Expression à froid</i>	22
6.4.5. <i>L'enfleurage</i>	23
6.4.6. <i>L'extraction au CO₂ supercritique</i>	23
6.5. <i>Critères de qualité des huiles essentielles</i>	23
6.6. <i>La biosynthèse</i>	24
6.7. <i>Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles</i>	27
6.7.1. <i>Activité antimicrobienne liée à la composition chimique</i>	27
6.7.1.1. <i>L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles</i>	27
6.7.1.2. <i>Les principes actifs antibactériens</i>	29
6.7.1.3. <i>Le mode d'action antimicrobienne des huiles essentielles</i>	30
III. Radicaux libres et antioxydants	31
1. <i>Les radicaux libres dans les systèmes biologiques</i>	31
2. <i>Implications pathologiques des espèces oxygénées réactives</i>	32
3. <i>Stress oxydant et ses conséquences biologiques</i>	33
4. <i>Les antioxydants</i>	33
4.1. <i>Systèmes enzymatiques</i>	34
4.2. <i>Systèmes non enzymatiques</i>	35
5. <i>Antioxydants naturels</i>	35
5.1. <i>Les flavonoïdes</i>	35
5.2. <i>Les tanins</i>	36
5.3. <i>Les coumarines</i>	36
5.4. <i>Les phénols</i>	36
5.5. <i>Les xanthones</i>	36
Deuxième partie : Matériels et méthodes	
I. <i>Le matériel végétal</i>	37
II. <i>Les tests phytochimiques</i>	38
1. <i>La teneur en eau</i>	38
2. <i>Les alcaloïdes</i>	38
3. <i>Les dérivés anthracéniques</i>	39
4. <i>Les saponosides</i>	39

5. Les coumarines	40
6. Les stérols et triterpènes	40
7. Les tanins	40
8. Les flavonoïdes	40
8.1. Anthocyanes	40
8.2. La réaction à la cyanidine	40
III. L'extraction des principes actifs	41
1. Préparation de l'extrait brut	41
2. Préparation de l'extrait flavonique	41
3. Préparation de l'extrait alcaloïdique	42
4. L'extraction d'huile essentielle	43
IV. Les indices physicochimiques des huiles essentielles	44
1. Les indices chimiques	44
1.1. L'indice d'acide	44
1.2. L'indice d'ester	44
1.3. L'indice de peroxyde	45
2. Les indices physiques	45
2.1. La miscibilité à l'éthanol	45
2.2. La densité relative à 20 °C	45
2.3. L'indice de réfraction	46
V. L'évaluation de l'activité antioxydante	47
1. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	47
2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	47
VI. Tests de l'activité antimicrobienne	48
1. Souches	48
2. Evaluation de l'activité sur milieu gélosé	48
3. Détermination des CMI (concentration minimale inhibitrice)	49
Troisième partie : Résultats et discussion	
I. Phytochimie de <i>Ruta chalepensis</i>	50
1. Teneurs en eau	50
2. Groupes chimiques caractérisés	50
3. Rendement des extractions	53
3.1. Extrait brut méthanolique	53
3.2. Extraits flavoniques	54
3.3. Extraits alcaloïdiques	54
3.4. Huile essentielle	55

4. Les indices physicochimiques de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i>	56
II. Tests, <i>in vitro</i> , de l'activité antioxydante	57
1. Réduction du fer (FRAP)	57
2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl)	59
2.1. Acide ascorbique	59
2.2. Extraits bruts méthanoliques	60
2.3. Extraits flavoniques	61
2.4. Extraits alcaloïdiques	62
3. Calcul des IC50	64
4. Conclusion de l'activité antioxydante	65
III. Evaluation de l'activité antibactérienne	67
Conclusion	70
Références bibliographiques	71
Annexes	82

INTRODUCTION

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base tels que, nourriture, abris, vêtements et aussi pour ses besoins médicaux. Les plantes possèdent d'extraordinaires vertus thérapeutiques. Leurs utilisations pour le traitement de plusieurs maladies chez les êtres vivants et en particulier l'homme est très ancienne et a toujours été faite de façon empirique (SVOBODA et SVOBODA, 2000).

De nos jours, nous comprenons de plus en plus, que les principes actifs des plantes médicinales sont souvent liés aux produits des métabolites secondaires. Leurs propriétés sont actuellement pour un bon nombre reconnues et répertoriées, et donc mises à profit, dans le cadre des médecines traditionnelles et également dans la médecine allopathique moderne (BOURGAUD *et al.*, 2001 ; KAR, 2007).

Aujourd'hui, on estime que les principes actifs provenant des végétaux représentent environ 25% des médicaments prescrits. Soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes. En Afrique, près de 6377 espèces de plantes sont utilisées, dont plus de 400 sont des plantes médicinales qui contribuent pour 90% du traitement médical. Jusqu'en 2004, on a estimé que près de 75% de la population africaine ont toujours recours aux plantes pour se soigner. De plus ce type de soin est considéré souvent comme faisant partie de la médecine douce (KAR, 2007).

Notre plante *Ruta chalepensis*, (Fidjel) est connue pour sa richesse en produits du métabolisme secondaire et particulièrement en huiles essentielles et alcaloïdes (BABA AISSA, 1999). Aussi dans notre étude, on se propose de :

- Faire un screening phytochimique des métabolites secondaires existant dans les différentes parties de la plante (fleurs, feuilles et tiges).
- Réaliser plusieurs extraits : extrait brut, flavonique, alcaloïdique et huile essentielle, pour les stations retenues dans notre étude, afin de pouvoir en faire des comparaisons.
- Etudier l'activité antioxydante, par deux méthodes, la réduction du Fer et le piégeage du radical libre DPPH pour les extraits : brut, flavonique, alcaloïdique;
- Etudier également le pouvoir antimicrobien de ses huiles essentielles.

PREMIÈRE PARTIE

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction à la phytothérapie

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes. Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives. A travers les siècles, les traditions humaines ont su développer la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales. Si certaines pratiques médicales paraissent étranges et relèvent de la magie, d'autres au contraire semblent plus fondées, plus efficaces. Pourtant, toutes ont pour objectif de vaincre la souffrance et d'améliorer la santé des hommes (SCHILLER et SCHILLER, 1994).

Toutefois, malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît.

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme (ISERIN ; 2001).

L'exploitation des ressources naturelles, et notamment du monde végétal, est encore capitale à l'heure actuelle. Elle est réalisée par :

Etude chimiotaxonomique qui consiste à rechercher des catégories de molécules dans les plantes en fonction de leur appartenance botanique. Ainsi les Apocynaceae, les Rutaceae, les Rubiaceae renferment souvent des alcaloïdes et c'est parmi ces familles que l'on recherche d'abord les alcaloïdes.

Etude ethnopharmacologique qui consiste à recueillir des renseignements sur l'utilisation des plantes auprès des populations vivant encore près de la nature en Amérique du Sud, dans les îles du Pacifique, en Afrique ou dans le Sud- Est Asiatique.

Etude pharmacologique est caractérisée par l'observation du comportement des plantes dans leur environnement naturel. Les interactions plantes-plantes (allélopathie), plantes-microorganismes, plantes-insectes, plantes-animaux sont associées à des signaux chimiques (BARNES et *al*, 2007).

I. Description de plante

1. Rutaceae (famille de la rue ou des agrumes) :

Généralement arbres ou arbustes, parfois à épines ou aiguillons ; à composés amers triterpéniques, à alcaloïdes, et composés phénoliques ; à lacunes sécrétrices disséminées (points translucides) contenant des huiles essentielles aromatiques (WIART, 2006).

Genres/espèces : 150/1500.

Principaux genres: *Zanthoxylum* (200 spp), *Agathosma* (180 spp), *Ruta* (60 spp).

Intérêt économique : plusieurs espèces de *Citrus* sont appréciées pour leurs fruits comestibles. *Ruta*, *Zanthoxylum*, *Citrus* et *Casimiroa*, ont des usages médicaux. Les résines caractéristiques des Rutacées sont inflammables d'où l'utilisation du bois comme carburant ou en torches (JUDD et al ; 2002).

2. Ruta (rue) :

Ruta vient du grec « rhyté » qui signifie sauvé, prévenir, ou de « reô » qui signifie qui coule faisant certainement référence à ses vertus emménagogues (DOERPER, 2008).

Ce genre comprend 8 espèces d'arbustes, de sous-arbrisseaux et de vivaces herbacées à souche ligneuse, caducs ou persistants, vivants dans les lieux secs et rocailleux, de la région méditerranéenne, et du nord-est de l'Afrique jusqu'au sud-ouest de l'Asie. Les fleurs et le feuillage aromatiques, sont le principal attrait des rues. Les feuilles sont alternes, parfois opposées, ovales, larges, arrondies et pennatiséquées ou pennées. Les fleurs, jaunes, fimbriées ou dentées, à quatre ou cinq pétales, s'épanouissent en cymes terminales (MIOULANE, 2004).

Le feuillage a parfois un usage médicinal. Ne consommer aucune partie de la rue, la plante entière étant toxique. Eviter de toucher le feuillage, sous peine de provoquer une réaction cutanée, se traduisant par des taches brunes (indolores) qui foncent au soleil (DODT, 1996).

- Rusticité : variable selon les espèces (MIOULANE, 2004).
- Culture : en plein soleil ou à l'ombre partielle, de même au sec, dans un sol assez riche, de préférence très bien drainé, mais la rue accepte bien les terres argileuses, fortes. La multiplication se fait par semi ou bouturage (DOERPER, 2008).
- Ennemis et maladies : pourriture des racines (*Phytophthora*) (MIOULANE, 2004).
- Appellations en différents langues :
 - En français : rue ;
 - En allemand : raute ;
 - En italien : ruta ;
 - En anglais : rue (BONNIER, 1999).
 - En espagnol : ruda (DUKE et al, 2008).

Les espèces de *Ruta* les plus connues sont très proches en forme, composition et en propriétés pharmacologiques :

- ***Ruta chalepensis*** (décrite ci-dessous).
- ***Ruta montana*** : c'est la rue des montagnes (synonymes : *Ruta legitima* Jacq. ; *Ruta tenuifolia* Gouan) ou bonne rue (BONNIER, 1999), appelée vulgairement en Algérie : ***fidjlet el-djbel*** (فيجلة الجبل) ou ***Fidjela*** (فيجلة), a une odeur fétide très intense, se trouve sur les coteaux arides et dans les endroits secs et pierreux de la région méditerranéenne (BABA AISSA, 1999).
- ***Ruta graveolens*** : [graveolens vient du latin « gravis » qui signifie fort et du verbe « olere » qui veut dire sentir, donc odeur forte et désagréable (DOERPER, 2008)]. Appelée aussi rue-officinale, rue-puante, rue fétide, rue des jardins, Herbe à la belle-fille, Rue des murailles (BONNIER, 1999) et également péganion (LE MOINE, 2001), cette espèce est appelée vulgairement ***Fidjen*** فيجن (ABDULBASSET et ABDE TAWAB, 2008).

3. ***Ruta chalepensis*** : (dans le reste du document le mot rue représente *Ruta chalepensis*)

La rue d'Alep, plante herbacée à tige ligneuse à la base, pouvant atteindre 1 m (BABA AISSA, 1999). Les feuilles de 6 à 12 cm de long, sont aromatiques, ovales, larges, pennatiséquées, bleu-vert, elles présentent de nombreux lobes oblongs, lancéolés ou aborales. En été, s'épanouissent des fleurs de 1 à 2 cm de diamètre, en coupe, de couleur jaune foncé, portant quatre ou cinq pétales frangés de longs poils. Elles sont réunies en cymes lâches (MIOULANE, 2004).

C'est une espèce méditerranéenne, relativement commune dans toute l'Algérie septentrionale (BABA AISSA, 1999), au nord-est de l'Afrique, sud de l'Europe et le sud-ouest de l'Asie (MIOULANE, 2004).

Appelée aussi: *Ruta angustifolia* / *Ruta graveolens* var. *angustifolia* (DUKE et al, 2008).

La rue est citée sous le terme de **سذاب *sadzab*** par ABDULBASSET et ABDE TAWAB, 2008, elle est aussi dite en berbère: **أورمي *ouermi***, **Issel, Issin** (BABA AISSA, 1999). Autres noms sont indiqués par DUKE et al en 2008: ***Al Shathap*** (الشذاب), ***Bou Ghans***, en grec : ***Pigam, zent***.

4. **Systématique:** (WIART, 2006; BONNIER, 1999; TAKHTAJAN, 2009)

Règne : *Plantae*

Sous règne : *Tracheobionta (plantes vasculaires)*

Super division : *Spermatophyta (plantes à graine)*

Division : *Magnoliophyta (plantes à fleurs)*

Sous division : *Angiospermae*

Classe : *Magnoliopsida (dicotylédons)*

Sous classe : *Rosidae*

Super ordre : *Rutanae*

Ordre : *Sapindales*

Famille : *Rutaceae*

Genre : *Ruta*

Espèce : *chalepensis*



Figure n°1: *Ruta chalepensis* (DUKE et al, 2008).

5. Usage et toxicité :

Plante ornementale des jardins, la rue est considérée comme mellifère et sa présence éloigne les vipères. Elle repousse les insectes (LE MOINE, 2001) et est utilisée contre la gale et les parasites de la tête (BONNIER, 1999).

Les parfumeurs utilisent son huile essentielle comme arôme. Dans le langage des fleurs, la rue est le *symbole de la grâce* (LE MOINE, 2001).

On récolte les feuilles toute l'année et les fleurs à la fin de l'été. Les feuilles fraîches, quoique très amères, sont comestibles, on les utilise dans des sauces et pour aromatiser le gibier ou le fromage blanc, mais en petite quantité ; c'est un condiment prisé des Anglo-Saxons. Elle entre dans la préparation d'un beurre aux herbes. Elle aromatisé aussi certaines boissons alcoolisées. Consommées fraîches de préférences, les tiges feuillues se conservent par séchage. On fabrique avec cette plante le « vinaigre de rue » et l'« huile de rue » en la faisant infuser dans du vinaigre ou dans l'huile (BILDERBACK, 2007).

Cultivée en Europe centrale depuis le X^{ème} siècle, elle servit de contre poison. Les Grecs considéraient qu'elle améliorait la vue (LE MOINE, 2001 ; BALCH et STENGLER, 2004) en utilisant l'essence extraite de la plante fraîche (SCHAUENBERG et PARIS, 1977). C'est une plante importante dans l'Islam, et très utilisée dans « le cure par le Coran » pour débarrasser le corps de l'influence du gin. C'est une plante à manier avec précaution car son huile essentielle est toxique. Elle contient des alcaloïdes, des flavonoïdes, de la vitamine C et des furo-coumarines. C'était autrefois une plante emménagogue et abortive (LE MOINE, 2001) en effet la rue exerce une action excito-motrice nette sur l'utérus (MERAD CHIALI, 1973). Sa sève irrite les peaux sensibles. On l'emploie pour les problèmes oculaires et en gargarisme pour les maux de gorge. Les feuilles soignent les phlébites et les varices. Son utilisation est déconseillée pour les femmes enceintes (LE MOINE, 2001).

L'essence est stupéfiante : c'est elle qui détermine une légère phase d'excitation puis rapidement ivresse lourde avec obtusion sensitivo-sensorielle, tristesse et somnolence. A très fortes doses c'est un véritable toxique. Le principe toxique est la méthylnonylcétone (MERAD CHIALI, 1973).

Plusieurs espèces de *Ruta* sont sources de diverses classes de produits naturels avec des activités : antifongiques, phytotoxique et antivénéneux (OLIVA et al, 2003).

Autres activités citées par (DUKE et al, 2008 ; GUTIERREZ-PAJARES et al, 2003 ; KONG et al, 1989 ; CHIU et FUNG, 1997 ; FOSTER et TYLER, 1999): Abortif ; Analgésique; Anti fertilité; Anti-inflammatoire; Antiseptique (contre : *Bacillus*, *Candida*, *Escherichia*, *Microsporium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*) ; Antispasmodique ; Aphrodisiaque; Arachnifuge; Bactéricide; Candidicide; Cardiotonique; Decongestant; Digestive; Émétique; Embryotoxique; Emménagogue; Fébrifuge; Immunomodulateur; Insectifuge; Molluscicide; Sédatif; Stomachique; Sudorifique; Vermifuge; Vulnérable ; antipyrétique, antiparasitaire, antihelminthique ; l'extraits aqueux de la rue a une activité hypotensive par un effet direct sur le système cardiovasculaire.

- **Utilisation populaire en Algérie :** La rue est très utilisée à des fins diverses : Fébrifuge, antivenimeux local, contre les nausées et les vomissements, dans les constipations, dans le paludisme, pour soigner les anémies (MERAD CHIALI, 1973), le rhumatisme, contre les douleurs gastriques, les vers intestinaux (BABA AISSA, 1999), dans les accouchements difficiles, les maux des yeux et des oreilles, dans l'asthme, les névroses (MERAD CHIALI, 1973).

6. Composition chimique :

✚ **Alcaloïdes (0.4- 1.4%) :** (FOSTER et TYLER, 1999)

Furoquinoline alcaloïdes : skimmianine, gamma-fagarine, dictamine, kokusagine, pteleine

Acridine alkaloids : arborinine- 2-arylquinoline, rutacridone, Gravacridiol (WATERMAN, 1975),

choloridone [4,5-dioxymethylene-11-methylfuro (2,3-c) acridin-6 (11H)-on] (ULUBELEN et TEREM, 1988).

Quinazoline alcaloïdes : comme l'arborine

Quinoline alcaloïdes : parmi eux: graveoline, graveolineine (WATERMAN, 1975).

- Alcaloïdes des Rutacées :

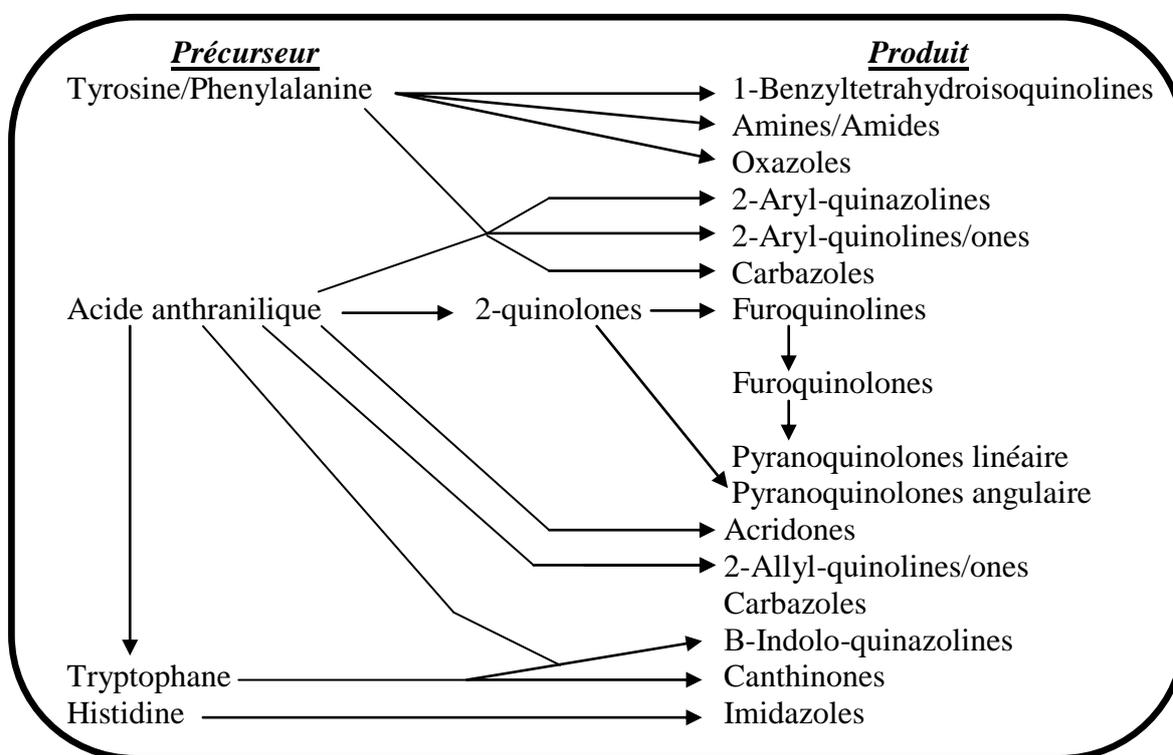


Figure n° 2: Classification biogénétique des alcaloïdes des Rutacées (WATERMAN, 1975).

✚ **Huile volatile (0.2-0.4%) :** (FLEMING et al, 2000)

Le rendement en huile essentielle et le composé majoritaire diffèrent selon le lieu de récolte mais généralement les composés les plus rencontrés sont le 2-nonanone et le 2-undécanone (MEJRI et al, 2010, MERGHACHE et al, 2009).

✚ Flavonoïdes:

Le composant majoritaire est la rutine (2-5%) (FLEMING et *al*, 2000): Tous les parties de la plante renferment un glucoside, la rutine, (BONNIER, 1999) ou rutoside qui est la vitamine P (SCHAUENBERG et PARIS, 1977 ; DEWICK, 2002) isomère de la quercitrine, identique à un glucoside qu'on trouve dans le Câprier (BONNIER, 1999).

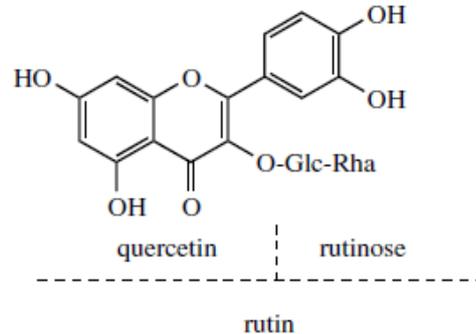


Figure n°3 : la rutine (DEWICK, 2002).

✚ Coumarines : (MILESI et *al*, 2001)

Hydroxy-coumarines: umbelliferone, herniarin, gravelliferon, rutacultin

Furo-coumarines: bergapten, psoralen, xanthotoxin, chalepensis, isopimpinellin, isoimperatorin, rutarin, rutaretine

Pyrano-coumarines: parmi eu: xanthyletine.

✚ Lignans : savinine, helioxanthine (FLEMING et *al*, 2000).

II. Métabolites secondaires:

1. Définition et fonction :

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 (JUDD *et al* ; 2002).

En général, les termes, métabolites secondaires, xénobiotiques, facteurs antinutritionnels, sont utilisés pour déterminer ce groupe, il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères. Comme ces composés ont des effets toxiques, leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral...), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement soit dose ou structure- dépendant (MAKKAR, SIDDHURAJU et BECKER, 2007).

2. Classification des métabolites secondaires :

2.1. Les composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol C₆H₅OH 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 l'écorce. La couleur et l'arome, ou l'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 (WALTON et BROWN, 1999). Plusieurs classes de composés polyphénoliques sont définies selon le squelette de base (tableau n°1).

Tableau n° 1: les différentes classes des composés phénoliques (DAAYF et LATTANZIO, 2008).

<i>Squelette carbonée</i>	<i>Classes de composés phénoliques</i>
C ₆	Phénols simples et benzoquinones
C ₆ -C ₁	Acides phénoliques
C ₆ -C ₂	Acétophénonnes et les acides phenylacétiques
C ₆ -C ₃	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes, chromons
C ₆ -C ₄	Naphthoquinones
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthonnes
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes et anthraquinones
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes et isoflavonoïdes
(C ₆ -C ₁) ₂	Tannins hydrolysables
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes et néolignanes
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoïdes
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines
(C ₆) _n	Catéchols
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tannins condensés

2.2. Les isoprénoïdes : (Stéroïdes et Terpénoïdes) :

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux, ils résultent de l'enchaînement de plusieurs unités isoprénique (BHAT, NAGASAMPIGI et SIVAKUMAR, 2005). Ils ont deux voies de biosynthèse : celle de l'acide mévalonique et du desoxyxylulose phosphate.

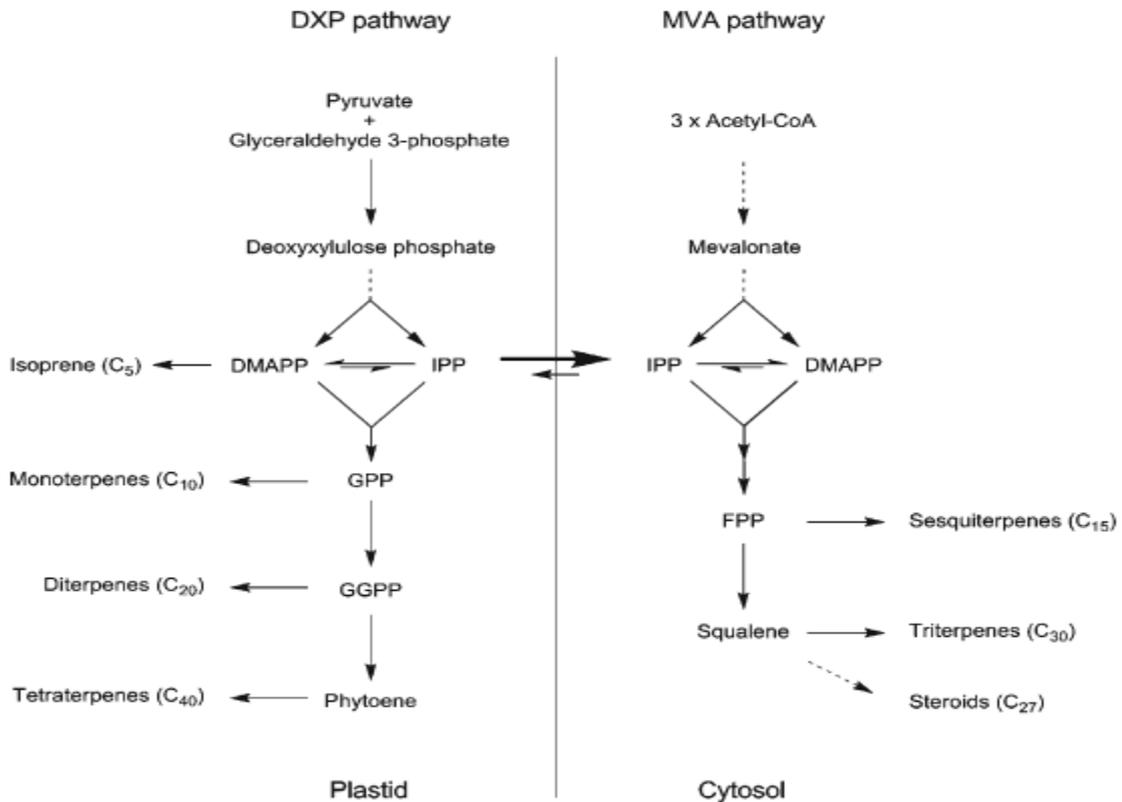


Figure n° 4: Biosynthèse des terpènes. DMAPP : dimethylallyl diphosphate ; DXP : desoxyxylulose phosphate ; FPP : farnesyl diphosphate ; GGPP : geranygeranyl diphosphate ; GPP : geranyl diphosphate ; IPP : isopentenyl diphosphate ; MVA : mevalonate (OSBOURN et LANZOTTI, 2009).

2.3. Les composés azotés (dérivés des acides aminés) : Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont les composés azotés les plus connus. Ils ont une distribution restreinte car ils sont rencontrés chez 20% des angiospermes seulement. En plus des alcaloïdes, on trouve dans ce groupe : les acides aminés non protéiques, les glycosides cyanogéniques et les glucosinolates (WALTON et BROWN, 1999).

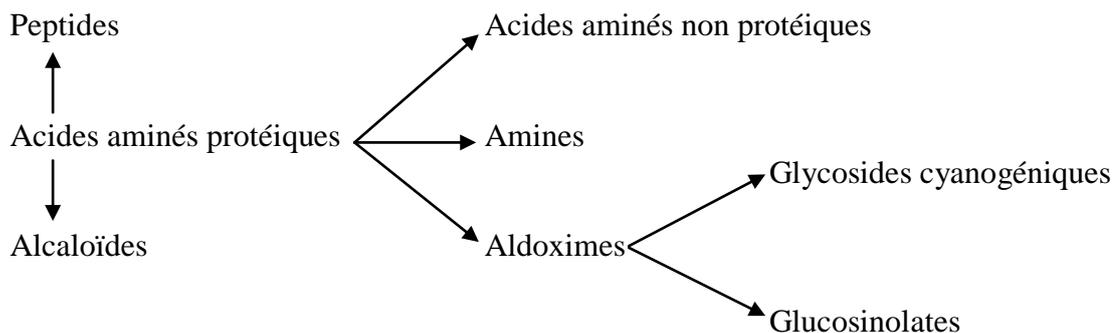


Figure n° 5: Biosynthèse des composés azotés (WALTON et BROWN, 1999).

3. Biosynthèse des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires résultent généralement de trois voies de biosynthèse : la voie de shikimate, la voie de mevalonate et du pyruvate (VERPOORTE et ALFERMANN, 2000).

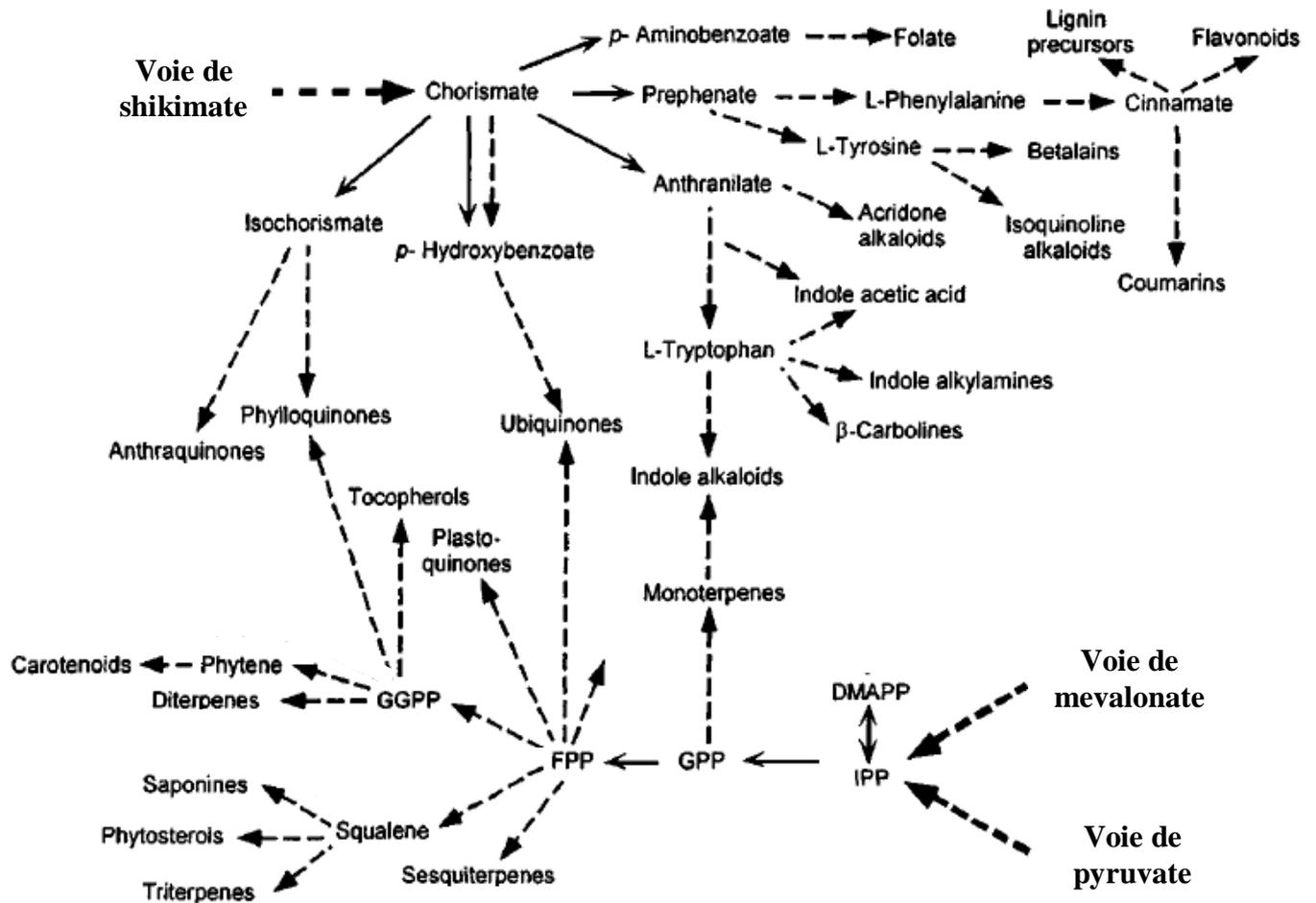


Figure n° 6 : Biosynthèse des métabolites secondaires (VERPOORTE et ALFERMANN, 2000 ; WINK, 2010).

4. Les flavonoïdes :

4.1. Définition, Classification et biosynthèse :

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (RICE-EVANS et PACKER, 1998).

Ce groupe de composés est défini par une structure générale en C₁₅, caractérisée par un enchaînement de deux noyaux aromatiques A et B liés une unité de trois carbones Ar (A)-C₃-Ar (B) (WALSH, 2003), les différentes classes sont déterminées par le degré d'oxydation de l'unité de liaison (C₃), tandis que, les composés de la même classe sont déterminés par le point d'hydroxylation, ou d'autre substitution, du noyau A ou B. Ils sont généralement soluble dans l'eau (VERPOORTE et ALFERMANN, 2000) et stocker dans des vacuoles ainsi que dans les chloroplastes (BRUNETON, 1987). Dans la nature, les flavonoïdes sont généralement glycosylés, ces sucres ainsi que les groupes hydroxyles augmentent leur solubilité dans l'eau, d'autres substitutions tels les méthyls et isopentyls, rendent les flavonoïdes lipophiles (CROZIER, CLIFFORD et ASHIHARA, 2006).

Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique commune. Les flavonoïdes comprennent les flavonoïdes au sens strict (flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones) et les isoflavonoïdes (CSEKE, KIRAKOSYAN *et al*, 2006).

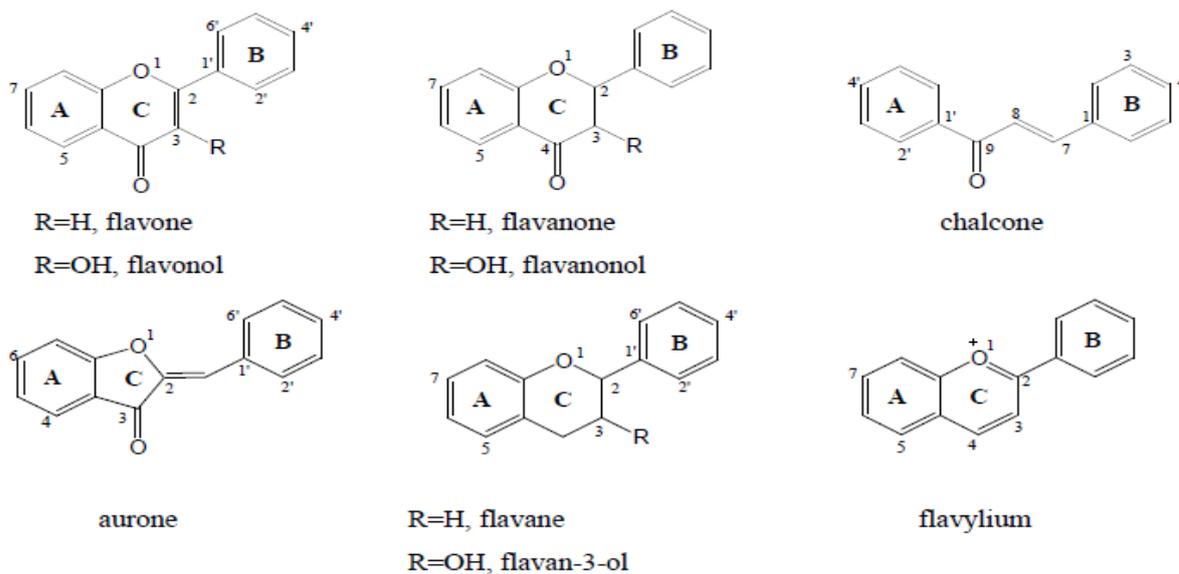


Figure n°7: Structure des différentes classes des flavonoïdes (MARTINEZ *et al*, 2005).

Les flavonoïdes dérivent d'une structure 1,3-diphénylpropane.

L'enchaînement propanique est le plus souvent sous forme d'hétérocycle pyranique, à l'exception de deux groupes : les chalcones et les aurones (VERPOORTE et ALFERMANN, 2000).

Au plan biosynthétique, l'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation de trois molécules de malonyl- CoA avec un ester du coenzyme A et d'un acide hydroxycinnamique, en règle générale le 4- coumaroyl-CoA, pour obtenir la 4, 2, 4', 6'-tetrahydrochalcone (réaction catalysée par la chalcone synthase). Dans les conditions physiologiques normales, cette chalcone tend à s'isomériser en flavanone sous l'action de la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à la seule (2S)-flavanone. Cette chalcone peut également se cycliser en aurone. Il est le précurseur de toutes les classes de flavonoïdes.

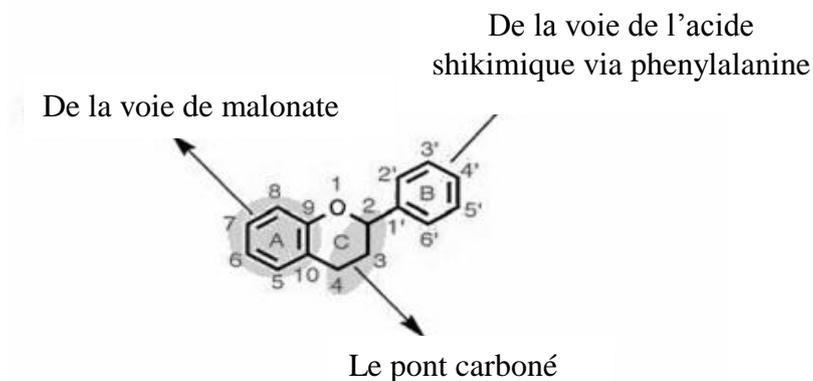


Figure n°8: L'origine biosynthétique du squelette flavonique (CROZIER, CLIFFORD et ASHIHARA, 2006).

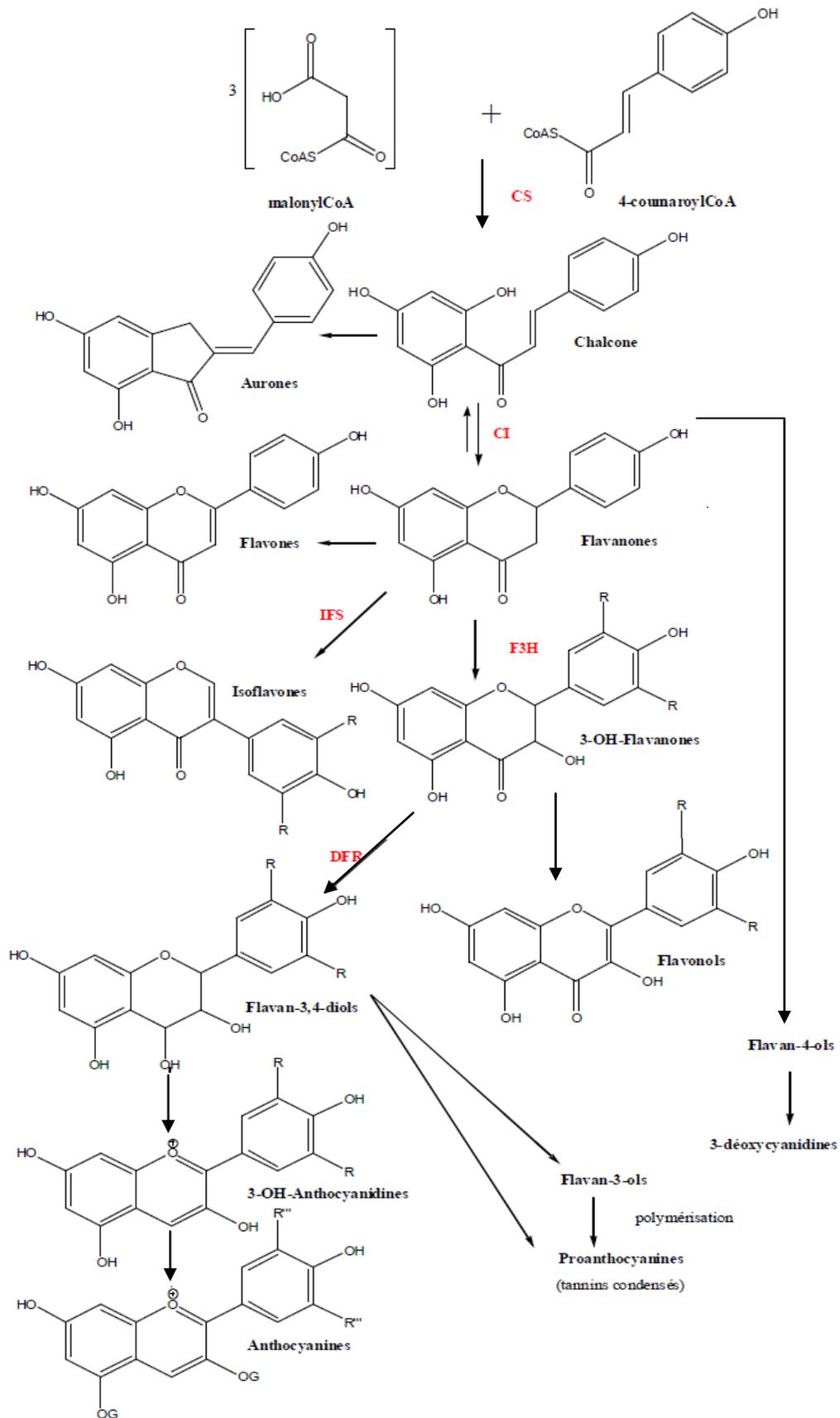


Figure n° 9: Biosynthèse des flavonoïdes.

CS : chalcone synthase ; CI : chalcone isomérise ; F3H : Flavanone 3-hydroxylase ; IFS : isoflavone synthase ; DRF : dihydroflavonol reductase ; FS : flavonol synthase ; AS : anthocyanin synthase. R=-H, -OH ou -OCH₃ et OG= -O-sucre (PORTET, 2007 ; GROTEWOLD, 2006).

4.2. Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes :

- L'activité la plus remarquable c'est qu'ils sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde par transfert d'hydrogène (VAN ACKER *et al*, 1996) ou par la chélation des ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives. Autres études aussi ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipooxygénase (DI CARLO *et al*, 1999).
- L'effet antiallergique des flavonoïdes sur la production de l'histamine, par l'inhibition des enzymes (l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Calcium-dépendante) responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles.
- Des études ont montré que certains flavonoïdes comme : quercétine, myricétine, l'apigénine et la chrysin ont des effets anti-inflammatoires par l'action inhibitrice des enzymes responsables du métabolisme de l'acide arachidonique.
- D'autres flavonoïdes : rutine et kaempférol ont montré une action inhibitrice sur le PAF (Platelet Activating Factor), agent ulcérogène potentiel, et ainsi la réduction des dommages gastro-intestinaux.
- Effets anticancéreux par différents modes : l'inactivation du t-PA (tissue-type plasminogen activator) en lui greffant la laminine, une molécule de la matrice extracellulaire qui joue un rôle important durant la mort cellulaire. Le blocage de certaines phases du cycle cellulaire ou des sites récepteurs des hormones, la stabilisation du collagène, l'altération de l'expression des gènes.
- Les flavonoïdes préviennent le diabète en inhibant l'aldose réductase.
- La réduction du risque des maladies cardiovasculaires en entravant l'athérosclérose.
- On attribue aux flavonoïdes d'autres propriétés: veinotonique, anti tumorale, analgésique, antispasmodique, antibactérienne, hépato-protectrice, etc. (TRINGALI, 2001).

5. Les Alcaloïdes :

Les alcaloïdes représentent un groupe de métabolites secondaires très diversifiés retrouvés chez les organismes vivants, ils ont un large rang de types structuraux, de voies de biosynthèse et d'activités pharmacologiques.

En 1803, DEROSNE a isolé le premier alcaloïde semi-pur du latex sec de l'opium (*Papaver somniferum*), une drogue utilisée depuis des siècles pour des propriétés analgésiques et narcotiques. En 1805, SERTÜRNER a caractérisé cet alcaloïde et la nommée morphine, et puis, entre 1817 et 1820 plusieurs alcaloïdes comme la strychnine, brucine, et quinine ont été isolés sous forme cristalline au laboratoire de PELLETIER et CAVENTOU en France (WALTON et BROWN, 1999).

5.1. Définition, Classification et distribution des alcaloïdes :

- Selon PELLETIER en 1983, les alcaloïdes sont des composés cycliques contenant un ou plusieurs atomes d'azote (ROBERTS et WINK, 1998), typiquement comme les amines primaires, secondaires, ou tertiaires et cela confère la basicité à l'alcaloïde, en facilitant leur isolement et purification comme sels solubles dans l'eau formés en présence des acides minéraux. Pourtant, le degré de basicité varie beaucoup, selon la structure de la molécule d'alcaloïde et la présence et l'endroit des autres groupes fonctionnels ;
- Cette définition inclue les alcaloïdes avec un azote inclue dans l'hétérocycle et aussi les alcaloïdes avec un nitrogène extra cyclique comme la colchicine, les alcaloïdes peuvent être de nature terpénique, stéroïdique ou aromatique ;
- L'activité biologique de beaucoup d'alcaloïdes dépend souvent de la fonction amine étant transformée en système quaternaire par ionisation aux pHs physiologiques (DEWICK, 2002). Alors quatre groupes de composés azotés sont définis :
 - Amines secondaires ou tertiaires qui sont hydrophiles à $\text{pH} < 7.0$ ou plus généralement lipophiles à $\text{pH} > 8.0$, se sont les alcaloïdes classiques.
 - Amines quaternaires, sont très polaires et chargés à n'importe quel pH, et sont isolés sous forme de sels, ex : berberine et sanguinarine.
 - Composés aminés neutres, incluent les amides-type alcaloïdes comme la colchicine, capsaïcine et la majorité des lactames comme la ricinine.
 - N-oxides, sont généralement très soluble dans l'eau, retrouvés dans plusieurs classes d'alcaloïdes, tel le groupe des pyrrolizidines.
- Depuis leur découverte et jusqu'à maintenant plus de 10.000 alcaloïdes ont été isolés ou détectés chez les plantes, les champignons et même les animaux, pour cela et à cause de la grande diversité de ce groupe de métabolites, leur classification est basée sur plusieurs critères : l'origine biologique, la voie de biosynthèse, la structure et les propriétés spectroscopiques/spectrométriques (chromophores dans la spectroscopie UV) (HESSE, 2002).

- La classification la plus adaptée est basée sur l'origine biogénétique, par exemple, les indoles dérivent du tryptophane, sous le même groupe on peut trouver les indoles non terpéniques et terpéniques (irridoïdes). Le groupe est après divisé en plusieurs sous groupes dépendant ainsi sur le mode de cyclisation de la partie non glucidique de l'alcaloïde.
- Les alcaloïdes ne sont pas tous dérivés des acides aminés, et ainsi quatre groupes sont reconnus :
 1. Les alcaloïdes dérivés des acides aminés comme l'ornithine/arginine, lysine, histidine, phénylalanine/tyrosine, tryptophane, l'acide anthranilique ou nicotinique ;
 2. Alcaloïdes purines, comme la xanthine caféine ;
 3. Terpènes aminés, ex : diterpène aconitine ou triterpène solanine ;
 4. Alcaloïdes poly-cétoniques où l'azote est inclus dans le squelette poly-cétonique comme la coniine et la coccinelline.

Remarque : Les deux derniers groupes sont rencontrés même chez les insectes et les organismes marins.

- Avant quelques années, la majeure source des alcaloïdes était les plantes à fleurs, les angiospermes, où 20% des espèces y contiennent (WALTON et BROWN, 1999). Actuellement, plusieurs alcaloïdes proviennent des animaux, insectes, organismes marins, microorganismes et les plantes inférieures, ex : muscopyridine de cerf porte musk, bufotaline du crapaud (amphibien), les **Arthropodes** sont aussi une bonne source des alcaloïdes qui jouent un rôle de phéromone, ex : phéromone de trace, methyl-4-methylpyrrole-2-carboxylase, d'*Atta.sp* (espèce de fourmi), les **microorganismes** y contiennent aussi : les alcaloïdes d'*Aspergillus*, pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*, chanoclavine-I de la moisissure de l'ergot (*Claviceps purpurea*) (ROBERTS et WINK, 1998).

5.2. Activités pharmacologiques :

Les alcaloïdes exercent généralement leurs activités pharmacologiques sur les mammifères comme l'Homme. Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs médicaments utilisés sont des alcaloïdes naturels, ils affectent chez l'être humain le système nerveux, particulièrement les transmetteurs chimiques tels l'acétylcholine, epinephrine, norepinephrine, acide γ -aminobutyrique (GABA), dopamine et la sérotonine.

Les alcaloïdes jouent plusieurs activités pharmacologiques :

Analgésique (cocaine), anti-cholinergique (atropine, scopolamine, galanthamine), anti-malaria (quinine), anti-hypertensive (reserpine), antitussive (codeine), dépressant cardiaque, stimulant centrale (caféine), diurétique, anesthésiant local (cocaine), narcotique (morphine), anti-tumeur, sympathomimétique (ephedrine), ect... (BHAT, NAGASAMPAGI et SIVAKUMAR, 2005).

Plusieurs alcaloïdes servent de model pour la synthèse d'analogues avec des propriétés meilleures.

6. Les huiles essentielles :

6.1. Introduction à l'aromathérapie :

L'**aromathérapie** (*étym* : lat « aroma », grec « arôma » = arôme; grec **therapeia** = soin, cure) est l'utilisation médicale des extraits aromatiques de plantes (essences et huiles essentielles). Cela la différencie de la phytothérapie qui fait usage de l'ensemble des éléments d'une plante (BELAICHE; 1979).

Le terme «aromathérapie» a été formulé en 1928, par René Maurice GATTEFOSSÉ, bâtisseur de la recherche scientifique sur les huiles essentielles, commença ses recherches sur le pouvoir de guérison des huiles essentielles après avoir brûlé sa main dans son laboratoire et l'avoir immergée dans l'huile de lavande. Il a été impressionné de la rapidité de guérison de sa brûlure (PITMAN, 2004). À partir des années 1970, quelques avancées scientifiques et thérapeutiques sur les huiles essentielles, démontrées par des chercheurs et des médecins (tels que VALNET, BELAICHE, DURAFFOURD, SEVELINGE, PELLECUER, PENOËL, FRANCHOMME, MAILHEBIAU, etc.), ont permis à l'aromathérapie de se positionner en tant que médecine de l'avenir et de sortir de son image d'utilisation issue de la tradition. Les chercheurs ont voulu lui donner une valeur scientifique en étudiant la composition des huiles essentielles et en attribuant aux molécules qu'elles contiennent des propriétés thérapeutiques (ZHIRI ; 2006).

L'aromathérapie consiste donc en l'utilisation des huiles essentielles pour prévenir ou traiter les maladies et améliorer la santé et le bien-être. C'est une thérapeutique naturelle d'une remarquable efficacité, qui repose sur la relation existant entre les principes actifs contenus dans les huiles essentielles et les propriétés thérapeutiques qui en découlent (WILSON; 2002).

L'aromathérapie scientifique est une science qui utilise les méthodes et les techniques scientifiques du laboratoire pour mettre en évidence la relation entre la structure chimique des molécules actives des huiles essentielles et leurs activités biologiques (ZHIRI ; 2006).

On appelle « **plantes aromatiques** » les plantes capables de synthétiser une essence. Parmi les 800.000 espèces végétales, seules environ 10% possèdent cette faculté. Selon les espèces, les organes sécréteurs d'essence peuvent se trouver dans les sommités fleuries, les graines, les fruits, les feuilles, les rhizomes, les racines, le bois, l'écorce ou encore l'oléorésine (CHASSAING; 2006).

6.2. Qu'est-ce qu'une huile essentielle ?

Selon sa profession, chacun répondra à la question d'une manière différente. Une huile essentielle peut être un ensemble de molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'un végétal pour un alchimiste (MORO BURONZA, 2008).

En réalité, une huile essentielle est l'ensemble de tout cela, car il s'agit d'un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (CLARKE, 2008).

Selon la monographie de la Pharmacopée européenne, la matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, à l'exception des fruits du genre Citrus qui sont toujours traités à l'état frais.

Les huiles essentielles peuvent subir un traitement ultérieur approprié. Elles peuvent être commercialement dénommées comme étant déterpénée, désesquiterpénée, rectifiée ou privée de « x ».

- ✓ Une huile essentielle déterpénée est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures monoterpéniques.
- ✓ Une huile essentielle déterpénée et désesquiterpénée est une huile essentielle privée, partiellement ou totalement, des hydrocarbures mono- et sesquiterpéniques.
- ✓ Une huile essentielle rectifiée est une huile essentielle qui a subi une distillation fractionnée dans le but de supprimer certains constituants ou d'en modifier la teneur.
- ✓ Une huile essentielle privée de « x » est une huile essentielle qui a subi une séparation partielle ou complète d'un ou plusieurs constituants (AFSSAPS ; 2008).

Pour être de qualité optimale, une huile essentielle doit être 100% naturelle (c'est-à-dire non dénaturée par des molécules de synthèse chimique), 100% pure (c'est-à-dire non mélangée avec d'autres huiles essentielles ayant des caractéristiques proches) et 100% intégrale (c'est-à-dire que le distillateur aura recueilli la totalité des molécules contenues dans la matière végétale distillée). La détermination du chémotype permet de le garantir (CHASSAING; 2006).

Une huile essentielle contient souvent de 50 à 100 molécules différentes et peut à l'extrême en comprendre jusqu'à 300 travaillant en synergie pour donner à l'huile essentielle ses propriétés (LAHLOU, 2004). Sa composition biochimique n'est par ailleurs jamais rigoureusement identique. Il est impossible de reproduire en laboratoire cette complexité présente à l'état naturel. C'est ce qui explique notamment la grande efficacité des huiles essentielles dans le cadre de la lutte contre les bactéries, les champignons ou les virus (CHASSAING; 2006).

Les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est en général

inférieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, entraînaibles à la vapeur d'eau, très peu solubles dans l'eau. Elles sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (AFSSAPS ; 2008). Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants variés en concentration variable dans des limites définies. Ces constituants appartiennent principalement mais pas exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les substances biosynthétisées à partir de l'acide shikimique (donnant naissance aux dérivés du phénylpropane) (PÉNOËL, 2002).

Les seules plantes aromatiques dont on peut extraire directement l'essence sont les agrumes (oranges, citrons, pamplemousses, mandarines ...). Cette extraction s'effectue par expression à froid des zestes frais. On parle dans ce cas d'essence d'orange, d'essence de citron, etc. Pour les autres plantes aromatiques, l'extraction s'opère par distillation à la vapeur d'eau des organes sécréteurs. On parle dans ce cas d'« huiles essentielles » (CHASSAING; 2006).

6.3. Comment utiliser les huiles essentielles ?

Les huiles essentielles peuvent réagir avec le corps via trois voies, quand vous ouvrez un flacon d'huile essentielle la première sens affecté c'est l'odorat ce qui excite l'appareil olfactif qui est directement lié au cerveau, donne à ces composés volatiles leur effet de soulager le corps.

Quand vous inhalez les huiles essentielles, ils entrent aussi à travers la voie respiratoire, dans les poumons quelques molécules peuvent réagir avec l'oxygène et ainsi pouvant gagner la circulation sanguine puis les cellules. La troisième voie où les huiles essentielles peuvent être absorbé c'est la peau, les minuscules molécules pénètrent via les pores des glandes sébacées, passent ainsi dans le fluide intercellulaire puis la circulation sanguine (en ce cas, elles sont appliquées sur une base d'huile végétale comme la noisette, amande, etc., à cause de leur effet irritant).

A travers ces capacités de pénétration, les huiles essentielles peuvent aider le corps à améliorer ses moyens de défense contre les agents stressants.

L'administration orale ou rectale, doit être suivie par un phytothérapeute ou un aromathérapeute, à cause de la complexité constitutive et la puissance de ces formes volatiles d'une plante (WILSON, 2002 ; WORWOOD, 1995 ; SNYDER et LINDQUIST, 2010 ; SCIMECA, 2006).

6.4. Les méthodes d'extraction :

6.4.1. L'hydrodistillation :

Cette méthode est réalisée en 2 étapes :

- La partie de la plante contenant la molécule à extraire est placée dans un ballon avec de l'eau et quelques morceaux de pierre ponce pour assurer le brassage de la solution. En chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, l'eau se condense et tombe dans un erlenmeyer où il est possible de distinguer 2 phases bien distinctes : l'huile essentielle et, dessous, l'eau aromatique (ou hydrolat) chargée d'espèces volatiles contenues dans la plante et ayant une densité plus élevée ;
- On récupère les 2 phases huile essentielle / eau aromatique, chargée d'espèces volatiles, dans une ampoule à décanter. Après avoir laissé reposer le contenu quelques secondes, il est possible d'éliminer totalement l'eau aromatique. Il ne reste alors plus que l'huile essentielle dans l'ampoule à décanter (LUCCHESI, 2005 ; MORO BURONZO, 2008).

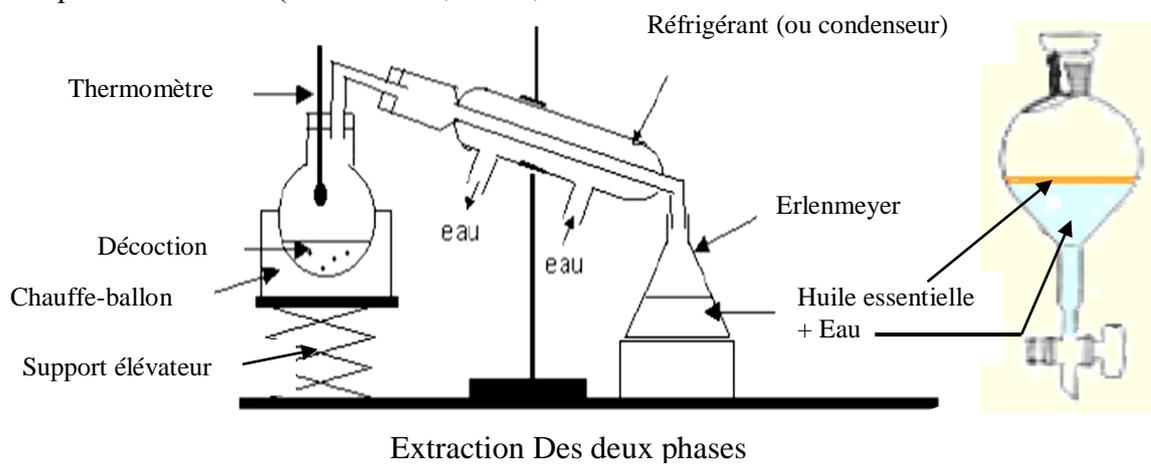


Figure n°11: schéma des étapes de l'hydrodistillation

(LAGUNEZ RIVERA ; 2006).

- Maintenant, d'autres méthodes d'hydrodistillation sont inventées, on peut citer :
 - **Hydrodistillation sous pression :** pour les essences difficilement distillables. Bien que le procédé sous pression conduise à une amélioration du rapport d'entraînement, donc, à des économies d'énergie, l'influence d'une température élevée (supérieure à 100°C) sur la qualité de l'huile essentielle donne lieu à certains artéfacts.
 - **Le système de thermopompage :** consiste à pomper la chaleur du condenseur et à l'utiliser pour la production de vapeur. Les économies d'énergie calorifique et d'eau de refroidissement se situeraient entre 60 et 90%.
 - **Turbodistillation :** Pour activer la distillation à la pression atmosphérique, l'alambic est équipé d'une turbine qui permet d'une part, la dilacération des matières végétales, d'autre part une agitation turbulente, d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation (CU et al, 1999).

- **L'hydrodistillation assistée par ultrasons** : Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement « pré » ou « post » opératoire. En effet, les micros cavitations générées par les ultrasons, désorganisent la structure des parois végétales, les rendements en huile essentielle sont augmentés et les cinétiques accélérées (SKARIA et al, 2007).

6.4.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées. L'injection de vapeur se fait à la base de l'alambic.

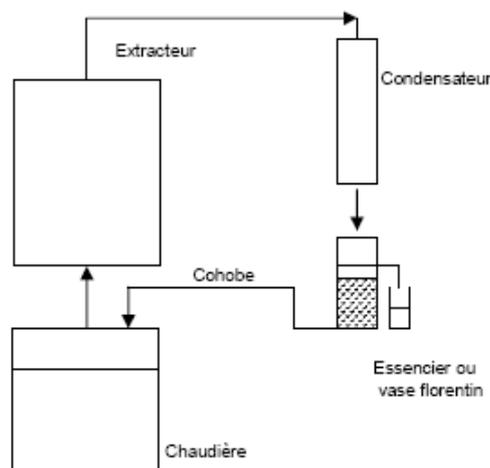


Figure n°12: Principe schématisé de l'appareillage d'extraction par entraînement à la vapeur de l'eau (PEYRON et RICHARD, 1992)

6.4.3. L'expression au solvant volatil :

Le matériel végétal dont on veut extraire une huile est placé sur des grilles puis dans des cuves appelées extracteurs. On les remplit de solvant et on effectue ainsi plusieurs lavages successifs. Le mélange est ensuite envoyé dans un décanteur où on le laisse reposer : cette phase de repos va permettre d'obtenir deux phases. Celle au fond contiendra l'eau contenue dans les plantes, l'eau étant plus lourde que le solvant celui-ci sera à la surface. Les huiles essentielles étant très solubles dans le solvant, elles se retrouvent dans la même phase. Il suffit donc d'éliminer l'eau. Ensuite on fait s'évaporer le solvant afin d'obtenir un composé pur (WERNER, 2002). En fonction de la technique et du solvant utilisé on obtient: **des hydrolysats, alcoolats, teintures, résinoïdes, oléorésines et des concrètes.**

6.4.4. Expression à froid :

Ce mode d'obtention ne s'applique qu'aux fruits d'agrumes (*Citrus spp.*) par des procédés mécaniques à température ambiante. Le procédé consiste à exercer sous un courant d'eau une action abrasive sur toute la surface du fruit. Après élimination des déchets solides, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par centrifugation (WILSON, 2002).

La plupart des installations industrielles permettent en fait la récupération simultanée ou séquentielle des jus de fruits et de l'huile essentielle (AFSSAPS ; 2008).

6.4.5. L'enfleurage :

Cette méthode se rapproche quelque peu de l'extraction par solvants volatils mais dans ce cas on utilise des graisses comme solvant, ces dernières ayant elles aussi une forte affinité avec les composés odorants, cette méthode peut être réalisée à froid ou à chaud, et on obtient ainsi des absolues de pommade (LARDRY et HABERKORN, 2007).

6.4.6. L'extraction au CO₂ supercritique :

Le terme supercritique signifie que le CO₂, sous pression et à une température de 31°C, se trouve entre l'état liquide et l'état gazeux. Lorsqu'il est dans cet état, il est capable de dissoudre les huiles essentielles. La matière végétale est chargée dans l'extracteur où est ensuite introduit le CO₂ supercritique sous pression et réfrigéré. Le mélange est ensuite recueilli dans un vase d'expansion où la pression est considérablement réduite. Le CO₂ s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle qui est proche du naturel et sans trace de solvant.

De plus le CO₂ est non toxique, incolore, inodore et ininflammable, ce qui permet des conditions de sécurité supérieures (KEVILLE et GREEN, 1995 ; BAYSAL et STARMANS, 1999).

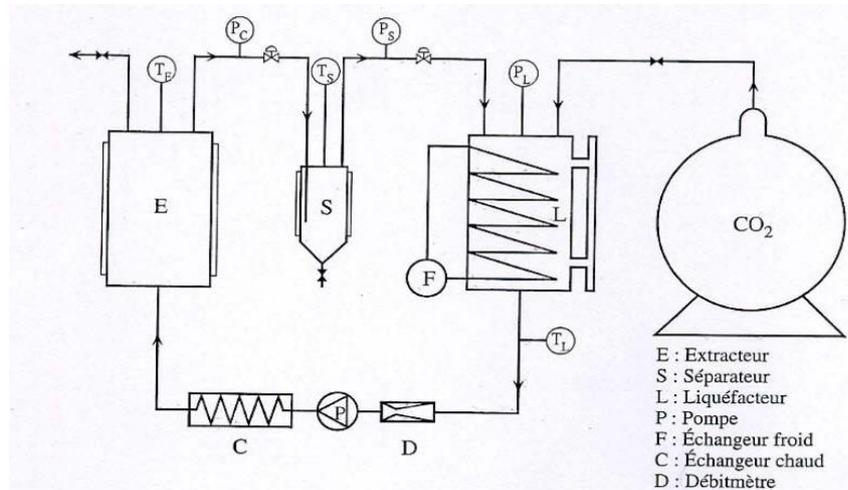


Figure n°13 : Schéma du système d'extraction CO₂ des solides (LAGUNEZ RIVERA ; 2006).

6.5. Critères de qualité des huiles essentielles:

Les caractéristiques physiques, organoleptiques, chimiques et chromatographiques des huiles essentielles sont définies par l'Institut Scientifique d'Aromatologie (INSA) qui a créé le label **H.E.B.B.D** : Huile Essentielle Botaniquement et Biochimiquement Définie. Exigez la mention de ce label. Il définit notamment trois critères certifiant l'origine et la nature exacte des huiles essentielles (GROSJEAN ; 2004).

Une même plante aromatique peut sécréter des essences de composition totalement différente dans ses différents organes (par exemple, l'essence contenue dans le zeste d'orange amer est différente de celle présente dans la fleur ou dans la feuille) ou selon le lieu géographique ou le biotope (nature du sol, climat, altitude, autres plantes présentes à proximité...) dans lequel elle est cultivée. Les essences sécrétées peuvent également varier en fonction du degré d'ensoleillement, de la saison ou du moment du

cycle végétatif (CHASSAING; 2006). D'où l'importance de connaître avec précision l'origine exacte d'une huile essentielle (type de plante, origine géographique, moment de la récolte, partie de la plante distillée, technique de distillation utilisée, etc.) avant d'en envisager une quelconque utilisation à des fins thérapeutiques.

6.6. La biosynthèse :

Il ya deux groupes de composés contenus dans une huile essentielle : les hydrocarbures et les hydrocarbures oxygénés, ainsi plusieurs groupes peuvent s'y existent (voir annexe n°1).

Le groupe le plus important est celui des terpénoïdes dérivant de la voie de mevalonate ou pyruvate via le précurseur isopentenyl pyrophosphate (IPP), et d'autres composés dérivant de la voie de shikimate (phényl-propanoïdes et dérivés) (CLARKE, 2008).

La synthèse des terpénoïdes est généralement associée à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface de tissus des plantes. Les principales structures cellulaires sont : des cellules à essence (Lauracées, Zingibéracées..), des poils sécréteurs stipités (Pelargonium) ou sessiles (Labiées), des poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées) ou schizolysigènes (Rutacées, Burséracées), soit enfin des canaux sécréteurs (Térébinthacées, Umbellifères) (MALEKEY ; 2008).

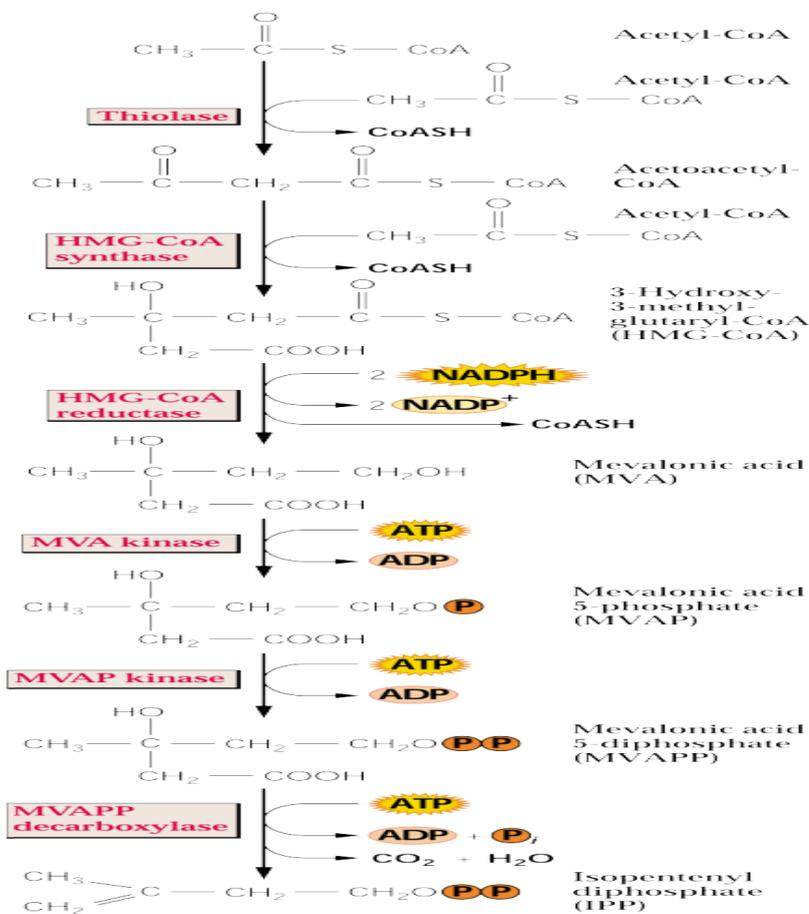
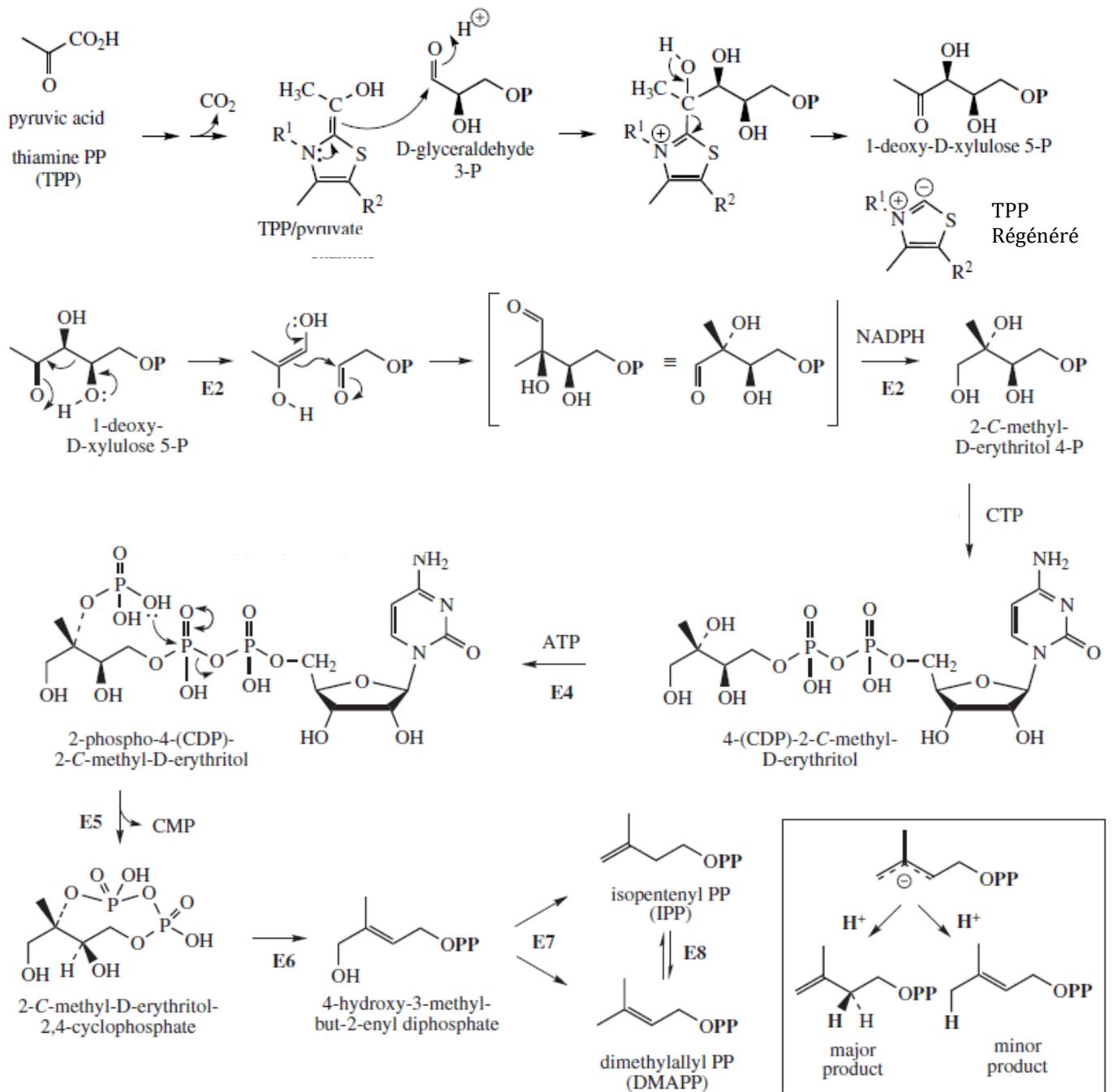


Figure n° 14: Formation d'IPP par la voie de l'acide mévalonique (DEWICK, 2002 ; VERPOORTE et ALFERMANN, 2000 ; BHAT, NAGASAMPAGI et SIVAKUMAR, 2005).



E1: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXP synthase)

E2: 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase;

1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (IspC)

E3: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase (IspD)

E4: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (IspE)

E5: 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF)

E6: 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (IspG)

E7: 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (IspH)

E8: isopentenyl diphosphate isomerase (IPP isomerase)

Figure n° 15: Formation d'IPP à partir du deoxyxylulose phosphate (DEWICK, 2002 ; HELDT, 2005).

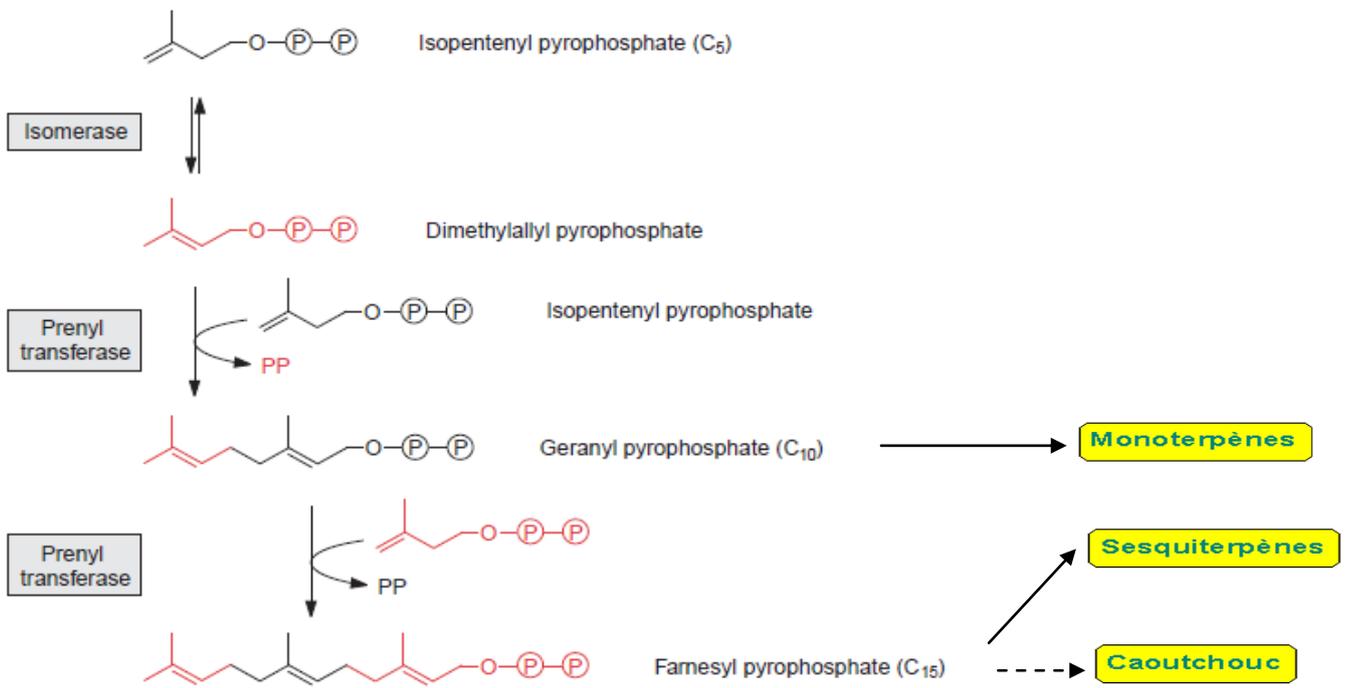


Figure n°16 : Biosynthèse des terpènes à partir d'IPP (MALEKEY ; 2008 ; HELDT, 2005).

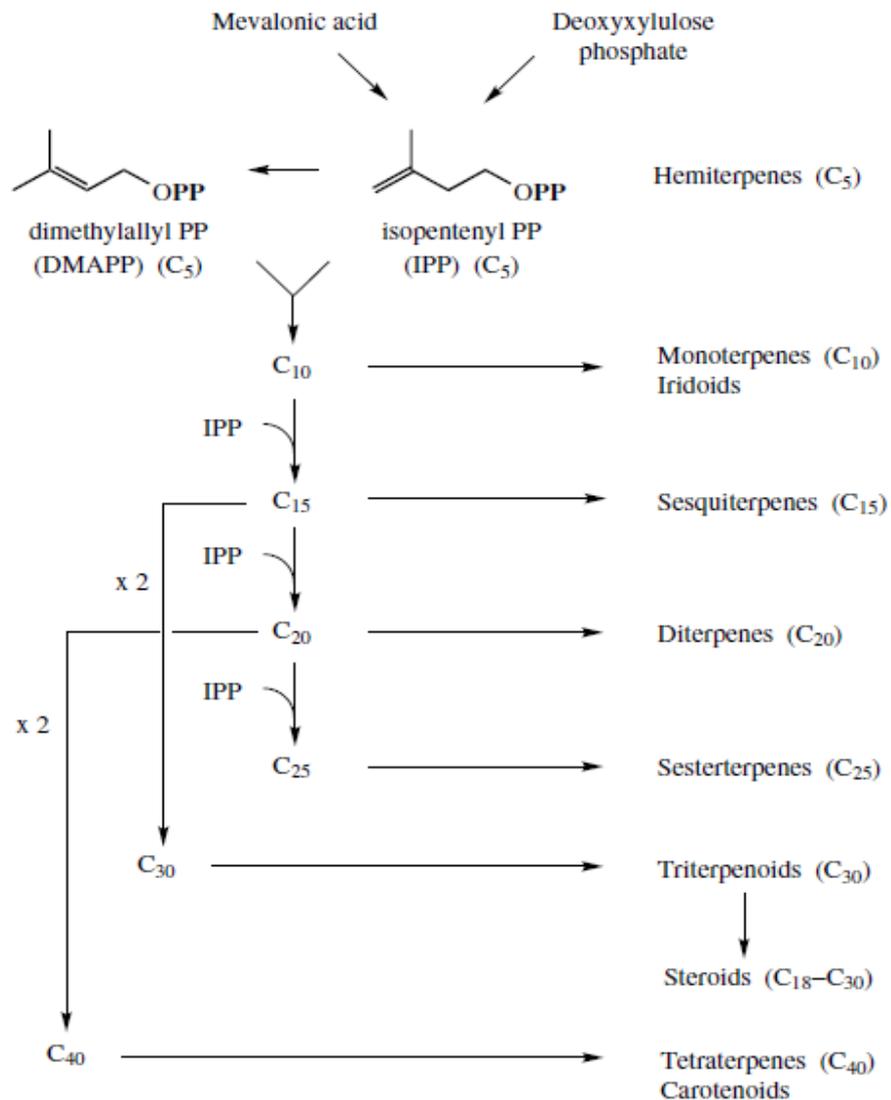


Figure n°17 : Le passage entre les différents types de terpènes (DEWICK, 2002).

6.7. Propriétés pharmacologiques des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont employées pour leur saveur et odeur en industrie des produits naturels et en industrie des parfums ;

Elles ont des propriétés antiseptiques pour les poumons et les reins ou comme bain de bouche, dépuratives, cicatrisantes, analgésiques et anti-inflammatoire, des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitaires et antihelminthiques; et aussi des propriétés antioxydantes (effet cleansing),

L'effet irritant/anesthésiant des huiles essentielles est utilisé pour soigner les douleurs rhumatismales;

Action stimulant sur l'utérus (exemple : l'huile essentielle de rue), effet abortif en cas d'intoxication ;

Action sur le système nerveux central, en exerçant des effets sédatif ou narcotique, relaxant et déstressant ;

Effet anticancer, en stimulant l'apoptose des cellules tumorales (CAPASSO *et al*, 2003; DANIEL, 2006; WORWOOD, 1995; HÜSNÜ CAN BASER et BUCHBAUER, 2010).

Plusieurs études ont montrés que l'utilisation d'huile essentielle peut diminuer les troubles menstruels, le stress post-partum ainsi que les troubles ménopausiques (LARDRY, 2007).

6.7.1. Activité antimicrobienne liée à la composition chimique :

Lorsque l'on parle d'activité antimicrobienne, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou bactéricide et une inhibition de la croissance ou activité bactériostatique. Le plus souvent l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des propriétés bactéricides.

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique aux groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) et à leurs effets synergiques (ZHIRI ; 2006).

6.7.1.1. L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :

✚ L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisés en microbiologie, est une explication de la variété des techniques d'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Les différents protocoles peuvent ainsi être classés : (PIBIRI ; 2005)

- selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle, soit liquide, solide ou gazeux,
- selon la nature du contact de l'huile essentielle avec le germe : diffusion sur disque, solution alcoolique ou dispersion dans un émulsionnant.

➤ L'aromatogramme :

« L'aromatogramme est à la Phytothérapie ce que l'antibiogramme décrit par la Pharmacopée française des antibiotiques est à la médecine ».

C'est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles chémotypées. Différents types d'aromatogrammes, en milieu solide, liquide, sont exploitables. Cependant, en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible (PIBIRI ; 2005).

Placés dans une étuve à 37,5 °C, dans des conditions optimales de culture, les germes pathogènes se développent rapidement sur le milieu nutritif. Sur ces colonies microbiennes, plusieurs séries (6 à 8 par boîte) de petits disques de papier buvard imprégné de différentes huiles essentielles à tester sont ensuite disposées. Après un temps de latence à 37,5 °C, le diamètre du halo d'inhibition entourant les disques est alors mesuré. Chaque halo, une zone claire, montre la destruction des germes pathogènes et donne une indication précise de l'activité antibactérienne des huiles utilisées.

L'aromatogramme représente cependant un point de repère essentiel puisque sa technique est identique à celle utilisée pour mesurer l'activité bactéricide des antibiotiques (ZHIRI ; 2006).

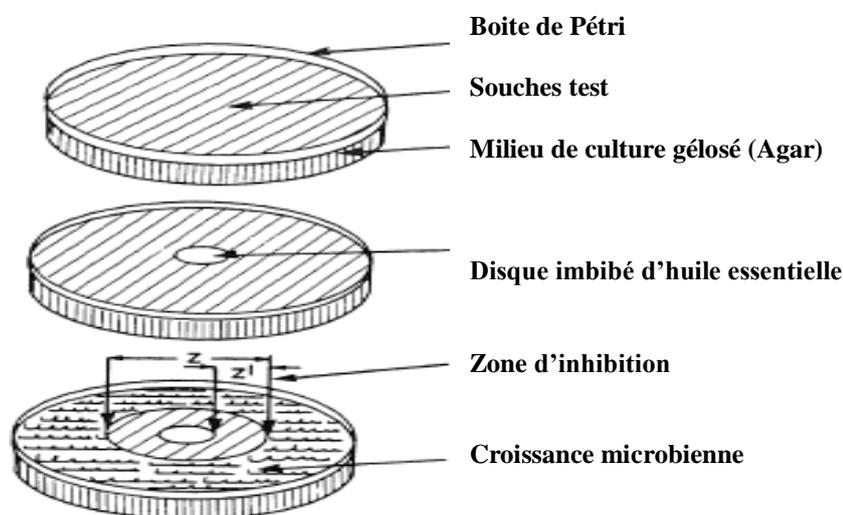


Figure n°18: illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri (PIBIRI ; 2005).

➤ Microatmosphères :

Dérivé de la méthode précédente le protocole des microatmosphères est techniquement proche de celle des aromatogrammes. La différence réside principalement dans la position du disque imprégné.

Dans cette technique, le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé (PIBIRI ; 2005).

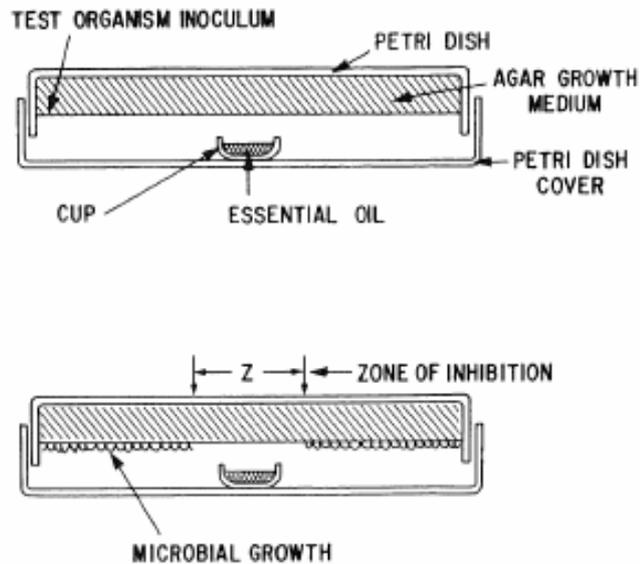


Figure n°19 : Illustration de la méthode des microatmosphères (PIBIRI ; 2005).

6.7.1.2. Les principes actifs antibactériens (ZHIRI ; 2006).

- Les phénols sont les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre: thymol, carvacrol et eugénol.

Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation.

Le thymol et l'eugénol sont responsables des activités fongicides et bactéricides des huiles essentielles qui en contiennent. La molécule de thymol exerce un effet inhibiteur et létal sur différentes souches et, parmi elles, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, sur lesquelles elle provoque des fuites d'ions potassium. Par contre, elle n'est pas active sur *Pseudomonas aeruginosa*.
- Les alcools avec 10 atomes de carbone (ou monoterpénols) viennent immédiatement après les phénols, en terme d'activité, avec le géraniol, linalool, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol pour les plus connus. Molécules à large spectre, elles sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes.
- Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment utilisés sont le néral et le géraniol (des citrals), le citronnellal et le cuminal.
- Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique.
- De nombreuses familles de molécules ont montré in vitro une activité antivirale et, parmi elles, les monoterpénols et les monoterpénals. Les virus sont généralement fortement sensibles aux molécules aromatiques et de nombreuses pathologies virales sévères montrent des améliorations importantes avec leur utilisation.

6.7.1.3. Le mode d'action antimicrobienne des huiles essentielles

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des huiles essentielles, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire.

- **Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs**, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K^+): ce mécanisme a été observé avec l'huile de l'arbre à thé sur les bactéries Gram+ (*Staphylococcus aureus*) et Gram -(*E. coli*) et levure (*Candida albicans*) in vitro.
- Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP. Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée.
- Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, ARN, des protéines et des polysaccharides.
- **Le mode d'action des huiles essentielles dépend aussi du type de microorganismes:** en général, les bactéries Gram - sont plus résistantes que les Gram + grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram - est plus riche en lipopolysaccharides et en protéines que ceux de Gram+ qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries (MALECKY ; 2008).

III. Radicaux libres et antioxydants :

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques. Les radicaux libres ne sont pas toujours néfastes ; en fait, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre les inflammations et de lutter contre les bactéries. Cependant, l'opération bénéfique des radicaux libres dépend d'un équilibre délicat qui peut être détruit par de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac, l'exercice excessif et le stress sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (DESCHEEMAER, 2004).

1. Les radicaux libres dans les systèmes biologiques :

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se produire dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de ces composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

Par définition, un radical libre est tout atome, groupe d'atomes ou molécules possédant un électron non apparié (célibataire), sur leur orbitale externe. Il s'agit d'espèces chimiques très réactives qui cherchent dans leur environnement un électron pour s'apparier (pour former une liaison chimique) (PASSWATER, 1997 ; JADOT, 1994).

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène ou radicaux primaires (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc...) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que l'oxygène singulier, le peroxyde d'hydrogène et le peroxy-nitrite peuvent être des précurseurs de radicaux libres (COOPER, 1997).

Tableau n° 2: Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (BARTOSZ, 2003 ; JADOT, 1994)

Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
Monoxyde d'azote	NO^{\cdot}
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	1O_2
Peroxy-nitrite	$ONOO^-$
Radical alcoxy	RO
Radical peroxy	ROO

L'instabilité des espèces oxygénées réactives rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures (BONNEFONT-ROUSSELOT et *al*, 2003). La durée de vie des espèces oxygénées réactives est extrêmement très courte de la nano à la milli seconde (LEHUCHER-MICHEL et *al*, 2001).

En effet, la toxicité des espèces oxygénées réactives n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité, dans plusieurs cas des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demie vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles où elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production (KOHEN et NYSKA, 2002). Les radicaux libres sont principalement produits par des sources endogènes, telles que les chaînes de transport d'électron, les peroxysomes et le système de cytochrome P-450.

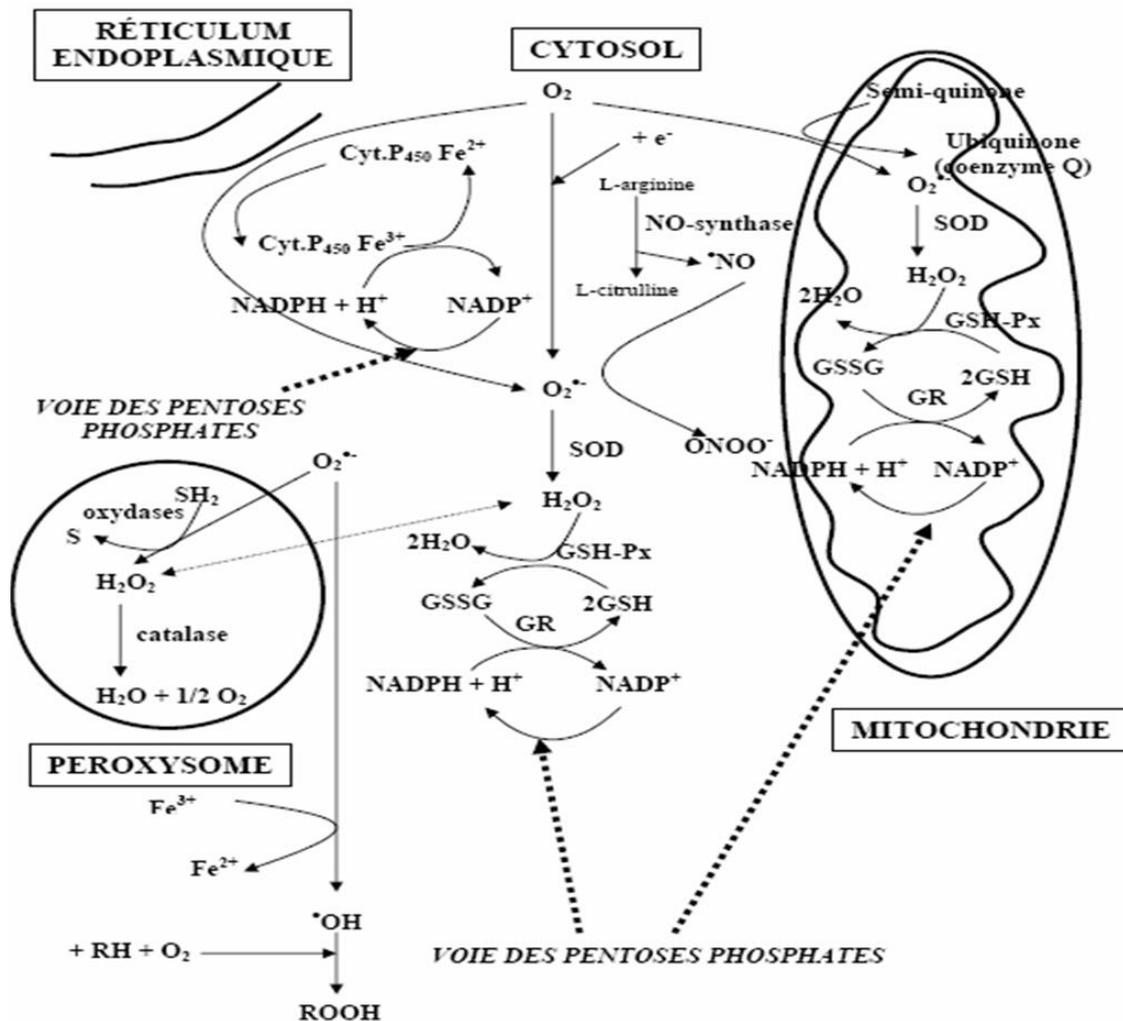


Figure n°20 : Les principales sources cellulaires des espèces oxygénées réactives (KOHEN et NYSKA, 2002).

2. Implications pathologiques des espèces oxygénées réactives :

Ces radicaux sont responsables de l'altération de l'ADN, du vieillissement cellulaire, et de diverses pathologies allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (CADENAS et PACKER, 2002).

3. Stress oxydant et ses conséquences biologiques :

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 (SMIRNOFF, 2005).

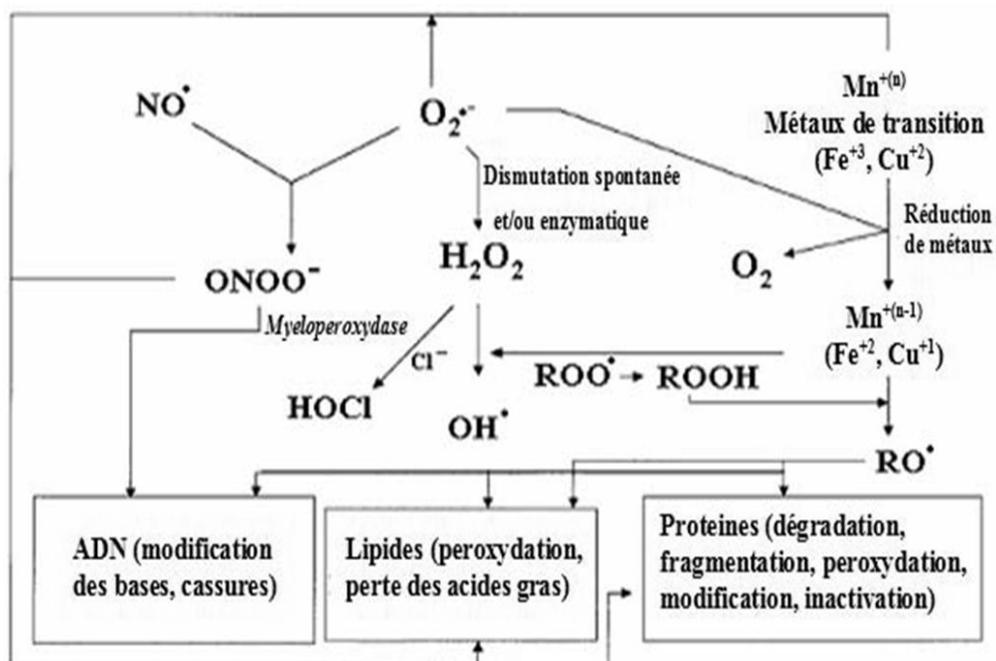


Figure n°21: Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives (KOHEN et NYSKA, 2002).

4. Les antioxydants :

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme.

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.

Les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont été questionnés au cours des dernière années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente.

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des espèces oxygénées réactives est assuré par des systèmes d'antioxydants.

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats. Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques (SHAHIDI, 1997).

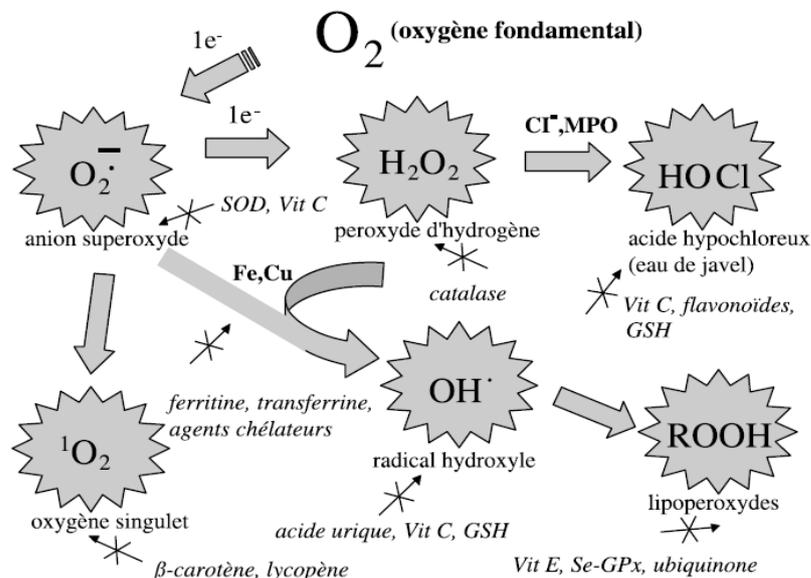


Figure n°22: Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydantes (MILBURY et RICHER, 2008).

4.1. Systèmes enzymatiques : (PIQUET et HEBUTERNE, 2007 ; SMYTHIES, 1998).

Il s'agit principalement de trois enzymes ;

 **Le superoxyde dismutase (SOD)** [accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD)],

 **La catalase (CAT)** [Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire]

 **La glutathion peroxydase (GPx)** [La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, de l'hydroperoxyde résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). **La glutathion réductase (GR)**, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur.

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\cdot-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire.

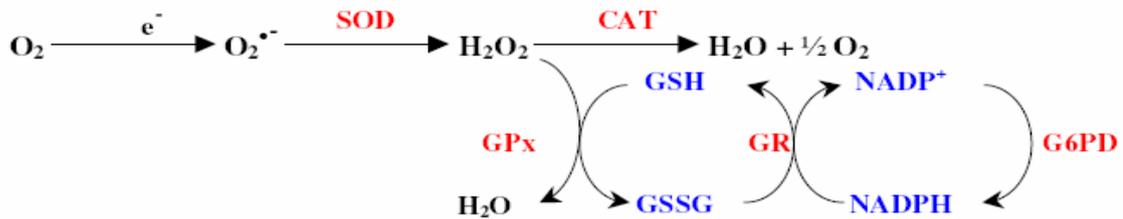


Figure n°23 : schéma du mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification enzymatique (PIQUET et HEBUTERNE, 2007).

4.2. Systèmes non enzymatiques :

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l'oxygène singulier, protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires.

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants, comme les ions Fe^{2+}/Fe^{3+} ou Cu^{2+}/Cu^+ permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (TRIVALLE, 2002).

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables. La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d'exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases. Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et les phytates, huiles essentielles (BRUNETON, 1999). Flavonoïdes apportés également par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres.

5. Antioxydants naturels :

5.1. Les flavonoïdes :

Présentes dans la plupart des plantes, les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui sont responsable dans la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti virales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie.

Des flavonoïdes comme l'hésperidine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le Sarrasin et le Citronnier, renforcent les parois capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins.

Les relations structure activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation (LECERF et RAGOT, 2006).

5.2. Les tanins:

Toutes les plantes en contiennent à des degrés différents. Ce sont des composés polyphénoliques qui permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections.

Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure.

Ces tanins sont des donateurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (SMYTHIES, 1998).

5.3. Les coumarines :

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses.

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (MADHAVI et *al*, 1996).

5.4. Les phénols :

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques. 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.

Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes (PACKER et *al*, 1999).

5.5. Les xanthonés :

Les propriétés pharmacologiques reconnues des xanthonés sont essentiellement : leur activité antimicrobienne, leur cytotoxicité et surtout l'inhibition de la monoamine-oxydase.

La manguiférine est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions super oxydes (PANGLOSSI,2006).

DEUXIÈME PARTIE
MATÉRIELS & MÉTHODES

I. Le matériel végétal:

La plante a été récoltée dans la période allant du mois de DECEMBRE 2009 au mois de MAI 2010, de quatre stations de la wilaya d'AIN TEMOUCHENT (AIN TOLBA, SIDI SAFI, SOUK LETHNIN et SIDI BEN ADDA) (voir annexe n°5).

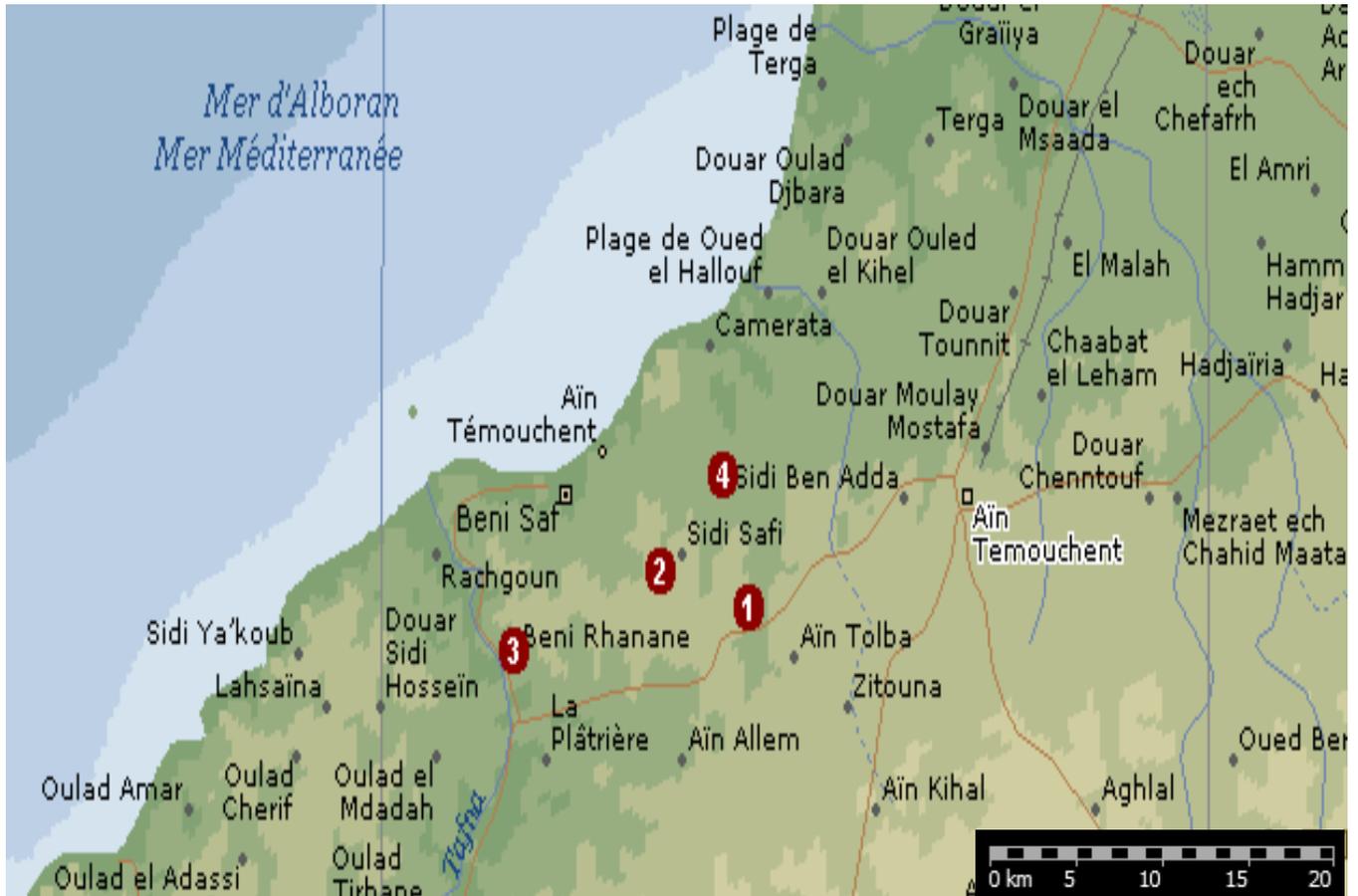


Figure n° 24: La carte de situation des différentes zones d'études (ENCARTA, 2009).

La situation géographique des stations figure dans le tableau n°3:

Tableau n°3 : situation géographique des quatre stations d'étude (ENCARTA, 2009).

Station	Longitudes Ouest	Latitudes Nord	Altitudes (m)
Station 1 (Ain Tolba)	1° 16'	35° 16'	350
Station 2 (Sidi Safi)	1° 19'	35° 16'	700
Station 3 (Beni Rhanane)	1° 25'	35° 14'	100
Station 4 (Sidi Ben Adda)	1° 17'	35° 18'	500

La plante, fraîchement récoltée, est lavée puis laisser sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré pour l'utilisation ultérieure pour les différents extractions des principes actifs, notant qu'avant le lavage une quantité est récupérée pour la détermination de la teneur en eau (taux d'humidité).

II. Les tests phytochimiques :

(RAFFAUF, 1996 ; DOHOU et al, 2003 ; JUDITH, 2005 ; BRUNETON, 1993 ; TIMBO, 2003 ; DIALLO, 2005 ; BEKRO et al, 2007 ; HOUGHTON et RAMAN, 1998 ; KAR, 2007).

1. La Teneur en eau :

Elle est déterminée par la Méthode gravimétrique qui consiste en la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve.

Matériel :

- Balance analytique de précision, Etuve réglée à 110°C, Verre de montre, Pince, Spatule métallique, Capsules en verre, Dessiccateur.

Technique :

- Nous avons opéré sur un échantillon homogène, broyé ou concassé.
- Faire une prise d'essai de 1 à 2 g (peser au mg près).
- Dessécher de façon à obtenir une masse constante après plusieurs pesées consécutives.
- Le refroidissement avant pesé se fait dans un dessiccateur renfermant un desséchant (Chlorure de calcium, anhydride phosphorique)
- **Calcul:** Masse drogue essai = masse avant étuve - tare

Masse eau = masse avant étuve – masse après étuve

% Eau = (masse eau ÷ masse drogue essai) × 100

2. Les Alcaloïdes :

- Macération

La poudre végétale (10 g) dans un erlenmeyer de 250 ml+ 50 ml de H₂SO₄ dilué au 1/10 (50 ml). Agitation et macération pendant 24 heures à la température ambiante du laboratoire. Filtration sur papier lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat.

- Réactions de caractérisation (voir annexe n°2)

- 1 ml de filtrat + 5 gouttes du réactif de MAYER (5 g de KI et 1,358 g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes. (Précipité blanc-jaunâtre)

- 1 ml de filtrat+ 5 gouttes de réactif de WAGNER (2 g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée) s'il apparaît un précipité brun c'est qu'on est en présence d'alcaloïdes.

- Test de confirmation

Nous procédons à une extraction de la poudre végétale en milieu acide.

Dans un ballon de 500 ml contenant 5 g de poudre végétale on verse 25 ml d'acide chlorhydrique 0,05N. Le mélange est laissé en **macération** sous agitation magnétique à la température ambiante du laboratoire (environ 25° C) pendant 24 heures; puis filtré et lavé à l'eau distillée. La solution obtenue est ensuite ajustée à 20 ml avec de l'eau distillée, et après réaliser les tests de caractérisation précédents.

3. Les Dérivés Anthracéniques : y compris les quinones et les anthraquinones

- **Extrait chloroformique** : A 1 g de drogue en poudre, ajouter 10 ml de chloroforme et chauffer au bain-marie pendant 3 mn, filtrer à chaud et compléter à 10 ml si nécessaire.
- **Hydrolysât** : A une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, ajouter 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Maintenir le tube à essai dans le bain-marie bouillant pendant 15 mn. Refroidir sous un courant d'eau et filtrer. Compléter à 10 ml avec l'eau distillée.
- **Caractérisation** :

▣ **Dérivés anthracéniques libres** : 1 ml d'extrait chloroformique + 1 ml de NH_4OH dilué puis agitation; la coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

▣ **Dérivés anthracéniques combinés** :

➤ **O-hétérosides (anthraquinones)**:

Prélever 5 ml d'hydrolysât et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH_4OH dilué. Agiter, la présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.

➤ **O-hétérosides à génines réduites** :

Ou bien 5 ml d'hydrolysât + 3 à 4 gouttes de FeCl_3 à 10 %, chauffer pendant 5 mn au bain-marie. Refroidir, agiter avec 5 ml de chloroforme. Soutirer la phase chloroformique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH_4OH dilué et agiter. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou anthrones, la coloration rouge est plus intense.

➤ **C-hétérosides** :

Reprendre la phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hérosides par 10 ml d'eau distillée et ajouter 1 ml de FeCl_3 à 10%. Maintenir le tube à essai dans un bain-marie bouillant pendant 30 mn, refroidir et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase chloroformique dans un tube à essai. Ajouter 1 ml de NH_4OH dilué et agiter. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de C-hétérosides.

4. Les Saponosides :

Elle se fait sur le décocté à 10% de la drogue.

Dans une série de 10 tubes à essai de $160 \times 16\text{mm}$, répartir 1, 2, ..., 10ml d'extrait et ajuster le volume à 10 ml dans chaque tube.

Agiter ensuite dans le sens de la longueur pendant 15 secondes en raison de 2 agitations par seconde, laisser reposer 15 mn et mesurer la hauteur de la mousse dans chaque tube. Celui (X) dans lequel la hauteur fait 1cm indique la valeur de l'indice de mousse, il est égal à

L'indice de mousse = hauteur de mousse (en cm) dans le X^e tube x 5 / 0,0X.

5. Les Coumarines :

Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain marie pendant quelques minutes. Ajouter 0,5 ml de NH₄OH (10%). Mettre deux tâches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des tâches confirme la présence des coumarines.

6. Les Stérols et Triterpènes : réaction de Lieberman-Burchard (voir annexe n°2).

Elle se fait sur une macération de 24h à 5% dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec 1 ml de l'anhydride acétique puis 1 ml de chloroforme. Déposer au fond du tube, contenant l'extrait, de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge-brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante étant verte ou violette.

7. Les Tanins :

- La préparation de l'infusé : La poudre sèche (5 g) dans de l'eau distillée bouillante (100 ml) contenue dans un erlenmeyer de 250 ml puis infusion pendant 15 mn (infusé à 5%).
- A 30 ml d'infusé à 5%, nous avons ajouté 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40% plus 5 ml HCl concentré) et chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 mn. L'obtention d'un précipité montre la présence de **tanins catéchiques**. Filtrer et saturer le filtrat d'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter 1 ml d'une solution de FeCl₃ à 1%. Le développement d'une teinte bleu noire indique la présence de tanins non précipités par le réactif de Stiasny : ce sont les **tanins galliques**.

8. Les Flavonoïdes :

8.1. Anthocyanes :

A 5 ml d'infusé à 5% présentant une coloration plus ou moins foncée ; ajouter 5 ml d'acide sulfurique puis 5 ml de NH₄OH. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure la présence d'anthocyane.

8.2. La réaction à la cyanidine : (voir annexe n°2)

Nous introduisons dans un tube à essai 5 ml d'infusé, ajouter 5 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 95°, eau distillée, HCl concentré à parties égales en volume) ; 1 ml d'alcool iso amylique puis quelques copeaux de magnésium. Il se produit une réaction de précipitation pendant quelques minutes.

L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose- violacée (flavanones) ou rouge (flavonones, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageante d'alcool iso-amylique indique la présence d'un flavonoïde libre (génine).

La réaction à la cyanidine sans ajouter de copeaux de magnésium et chauffer pendant 15 mn au bain-marie. En présence de **leucoanthocyane**, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée ; les **catéchols** donnent une teinte brun-rouge.

III. L'extraction des principes actifs :

1. Préparation de l'extrait brut :

2g de poudre de chaque partie de la plante est macéré dans 20 ml de méthanol absolue, pendant une nuit à température ambiante, l'extrait est ensuite filtré puis évaporé sous pression réduite à sec ($T^{\circ}=60^{\circ}\text{C}$) par un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor R-200, voir annexe n°3). Le résidu sec est repris par quelques millilitres de méthanol et conservé à $+4^{\circ}\text{C}$ (BENHAMMOU et *al*, 2009).

2. Préparation de L'extrait flavonique:

Pour l'extraction des flavonoïdes, l'utilisation de solvant approprié (selon sa polarité) est importante pour séparer la classe souhaitée, où les flavonoïdes les moins polaires (exemple : isoflavones, flavanones, methylated flavones, et flavonols) sont extraits par : chloroforme, dichlorométhane, éther diéthylique, ou l'acétate d'éthyle, puis les flavonoïdes glycosylés et les plus polaires aglycones sont extraits avec l'alcool ou les mélanges alcool-eau. Tandis que la solubilisation de certains flavanones dépend du pH, et l'acidification permet l'élimination des anthocyanes (ANDERSEN et MARKHAM, 2006).

L'extraction était réalisé par une macération sous agitation magnétique, récemment de nouveaux procédés sont établis, pour accélérer l'extraction et augmenter les rendements, tels : extraction liquide sous pression (PLE Pressurized Liquid Extraction), L'extraction au liquide supercritique (SFE Supercritical Fluid Extraction), extraction sous micro-ondes (MAE Microwave-Assisted Extraction) et aussi l'extraction par ultrasonication (Ultrasound-assisted extraction) (GARETH, 2007).

- Notre extrait flavonique est obtenu par la méthode de LEE et *al*, 1995 modifiée à la deuxième étape par DRAGAN et *al*, 2007, le protocole est représenté dans la figure n°25.

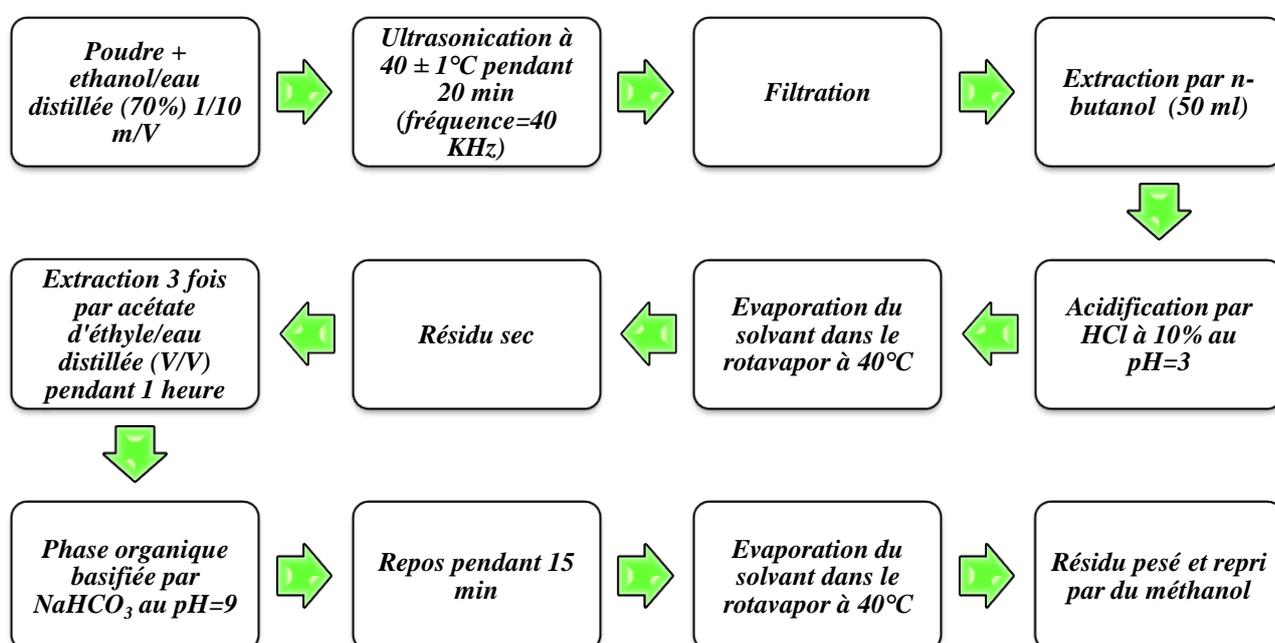


Figure n° 25: Protocole d'extraction des flavonoïdes.

3. Préparation de l'extrait alcaloïdique:

L'extraction des alcaloïdes de la poudre végétale est souvent réalisée par un milieu acide, tel l'acide chlorhydrique (HCl), l'acide sulfurique (H₂SO₄) ou l'acide acétique, la basification est ensuite faite par l'ammoniac (NH₄OH) pour libérer les alcaloïdes qui sont enfin précipités soit par les réactifs de caractérisation (réactif de MAYER ou DRAJENDORFF) ou bien par l'ammoniac (KAR, 2007).

Dans notre étude l'extraction est réalisée selon le protocole d'HARBORNE, 1998 :

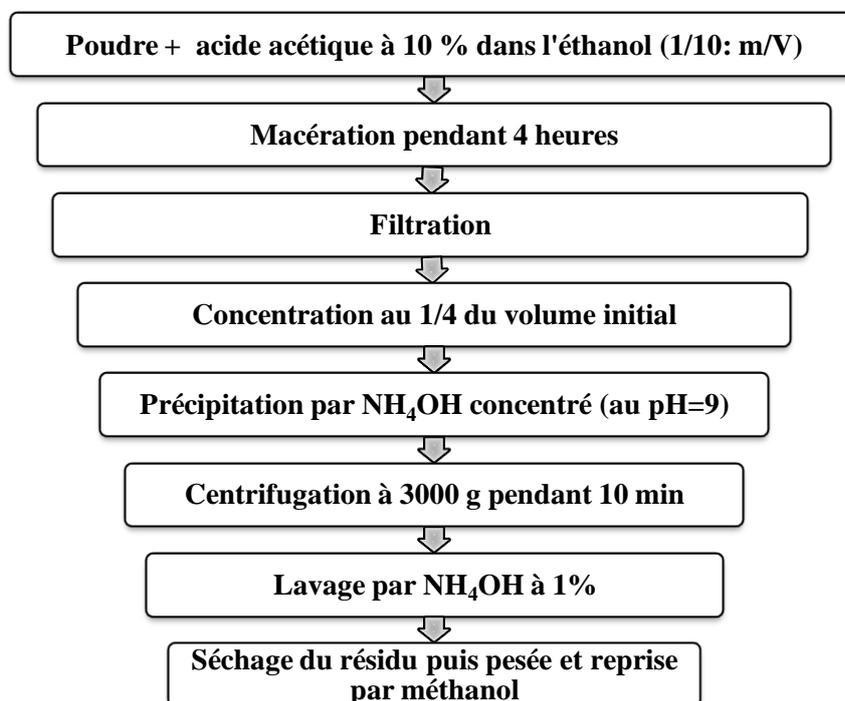


Figure n°26 : Protocole d'extraction des alcaloïdes.

Calcul des rendements :

Nous pouvons déterminer le rendement de différentes parties de la plante en extrait brut, flavonique ou alcaloïdique avec le rapport :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{(P_1 - P_2)}{P_3} \times 100$$

P₁ : Poids du ballon après évaporation

P₂ : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide)

P₃ : Poids de la poudre végétale de départ

4. L'extraction d'huile essentielle :

Elle effectuée par hydrodistillation de la partie aérienne de la plante, où 100g de la plante sèche est introduite dans un ballon à bi ou tri cols, et imprégné d'eau, l'ensemble est porté à ébullition pendant 2 à 3 heures. Les vapeurs d'eau chargées d'huile essentielle, en traversant le réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité.

Calcul de rendement : on appelle rendement le rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la plante à traiter. Le rendement en pourcentage (R) est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{P_H}{P_P} \times 100 \text{ où}$$

P_H : poids de l'huile essentielle extraite en g

P_P : poids de la plante traitée en g

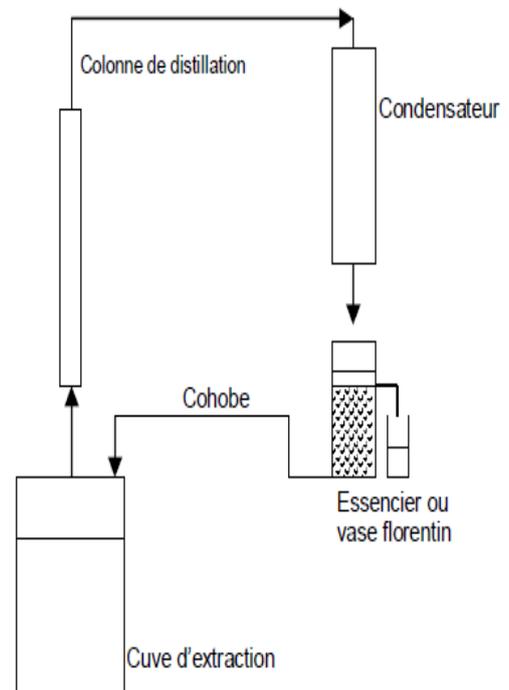
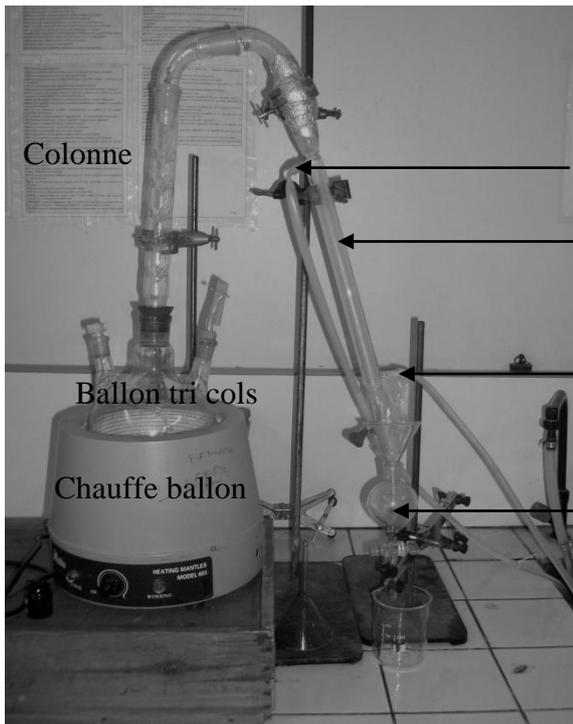


Photo n°1: Montage d'hydrodistillation.

IV. Les indices physicochimiques des huiles essentielles : (AFNOR, 1986).

1. Les indices chimiques

1.1. L'indice d'acide :

Définition : l'indice d'acide est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'huile essentielle.

Mode opératoire :

- Dans un ballon ou une fiole introduire la prise d'essai ($2g \pm 0.05$), puis ajouter 5 ml d'éthanol (95%) et 5 gouttes de solution de phénolphthaléine (0.2%) ;
- Neutraliser le liquide avec la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0.1 mole/l), contenue dans une burette, jusqu'à obtention d'une couleur rose ;
- On peut réserver éventuellement le ballon et son contenu pour la détermination de l'indice d'ester ;
- L'indice est donc donné par la formule :

$$5.61 V/ m$$

Où : V est le volume, en millilitres, de la solution d'hydroxyde de potassium utilisée
m est la masse, en grammes, de la prise d'essai.

1.2. L'indice d'ester :

Définition : l'indice d'ester est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters dans 1g d'huile essentielle.

Principe : hydrolyse des esters par chauffage, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium, et dosage de l'excès d'alcali par une solution titrée.

Mode opératoire :

- Dans le ballon, contenant la solution provenant de l'indice d'acide, ajouter 25 ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0.5 mole/l, puis on adapte le réfrigérant et on place sur le chauffe ballon et on laisse chauffer pendant une heure ;
- Laisser refroidir, puis démonter le réfrigérant et ajouter 20 ml d'eau puis 5 gouttes de la solution de phénolphthaléine à 0.2%
- Titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique (0.5 mole/l) ;
- Parallèlement, effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions, en remplaçant la solution provenant de l'indice d'acide par 5 ml d'éthanol.

Expression des résultats :

L'indice est calculé par la formule :

$$28.05/ m (V_0 - V_1) \text{ Où :}$$

V_0 est le volume, en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc

V_1 est le volume, en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour la détermination

m est la masse, grammes, de la prise d'essai

1.3. L'indice de peroxyde :

Définition : on entend par indice de peroxyde d'un corps gras le nombre de microgrammes actif du peroxyde contenu dans un gramme de produit et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode.

Principe : traitement du corps gras, en solution dans l'acide acétique et du chloroforme, par une solution d'iodure de potassium. Titration de l'iode libéré par une solution titrée de thiosulfate de sodium.

Mode opératoire :

- Dans un flacon ou erlenmeyer on pèse 1g d'huile essentielle, ajouter 10 ml de chloroforme puis dissoudre rapidement l'huile essentielle en agitant ;
- Ajouter 15 ml d'acide acétique, puis 1 ml de solution d'iodure de potassium ;
- Boucher le flacon, l'agiter pendant une minute et l'abandonner pendant cinq minutes à l'abri de la lumière ;
- Puis ajouter 75 ml d'eau distillée. Titrer, en agitant vigoureusement et en présence d'empois d'amidon comme indicateur, l'iode libéré avec la solution de thiosulfate de sodium (0.01 N) ;
- Parallèlement et simultanément effectuer sans l'huile essentielle un essai à blanc.

Mode de calcul et formule :

L'indice de peroxyde, exprimé en microgrammes d'oxygène actif par gramme, est égal à :

$$8000 \times V/E \quad \text{Où :}$$

V est le volume de la solution de thiosulfate de sodium utilisée pour l'essai, corrigé compte tenu de l'essai à blanc, exprimé en ml.

E est la masse, en gramme, de la prise d'essai.

2. Les indices physiques

2.1. La miscibilité à l'éthanol :

Une huile essentielle est dite miscible à V volumes et plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé, à la température de 20 °C, lorsque le mélange de 1 volume de l'huile essentielle considérée avec V volumes de cet éthanol est limpide et le reste après addition graduelle d'éthanol de même titre, jusqu'à un total de 20 volumes.

2.2. La densité relative à 20 °C (d_{20}^{20}) :

Définition : La densité relative à 20 °C d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile, à la masse d'un égal volume d'eau distillée.

Principe : à l'aide d'un pycnomètre, pesé successivement de volumes égaux d'huile essentielle et d'eau à la température de 20 °C.

La densité est ainsi donnée par la formule :

$$\frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où :

m_0 : est la masse, en grammes, du pycnomètre vide

m_1 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'eau

m_2 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'huile essentielle.

2.3. L'indice de réfraction :

Définition : l'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante.

- Utiliser un réfractomètre permettant la lecture directe d'indices de réfraction situés entre 1.300 et 1.700, l'appareil est ajusté de manière à donner, à la température de 20 °C, une valeur de 1.333 pour l'eau distillée.

V. L'évaluation de l'activité antioxydante :

1. Réduction du fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) :

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe^{2+} , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm.

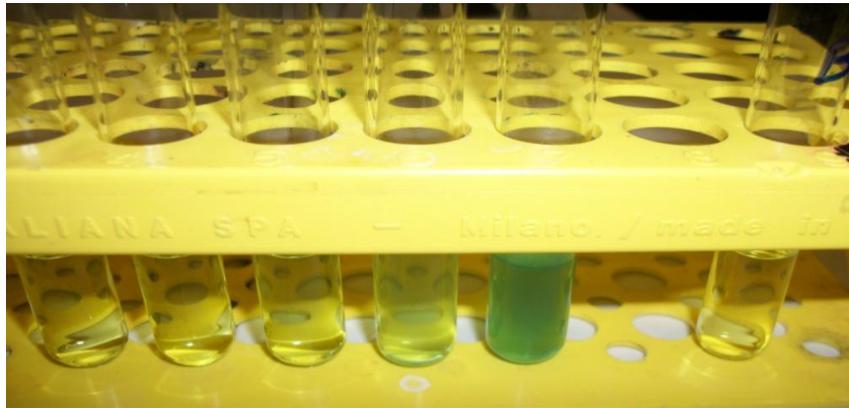


Photo n°2: Réduction du fer ferrique en fer ferreux.

Le protocole expérimental utilisé est celui de YILDIRIM, MAVI, et KARA (2001) où : 0.5 ml de l'échantillon à différentes concentrations, est mélangé avec 1.25 ml d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 1.25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000g pendant 10 min. 1.25 ml du surnageant sont ajoutés à 1.25 ml d'eau distillée et 250 μl d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) à 0.1%. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (voir annexe n°3).

2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) :

Pour étudier l'activité antiradicalaire des différents extraits, nous avons opté pour la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm.

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 (diphényl picryl-hydrazine : de couleur jaune) n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance (SANCHEZ-MORENO, 2002).

Selon le protocole décrit par MANSOURI et *al* (2005). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol (6×10^{-5} M). 25 μl des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) sont ajoutés à 975 μl DPPH, le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30

min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant la solution de DPPH et du méthanol est mesurée à 517 nm. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{d'activité antiradicalaire} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Calcul des IC₅₀ :

IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC50 (*Efficient concentration*50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testées (TORRES et *al*, 2006).

N.B. : L'**acide ascorbique** est utilisé comme contrôle positif, dans les deux méthodes de l'évaluation de l'activité antioxydantes (DPPH ou réduction du fer), et aux mêmes conditions expérimentales.

VI. Tests de l'activité antimicrobienne :

1. Souches :

Les souches utilisées sont cinq souches bactériennes et une levure de référence.

Tableau n° 4: Les souches microbiennes

Etat frais	Souches	Gram
Bacille	<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	Négatif
	<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</i>	
	<i>Bacillus cereus ATCC 11178</i>	
Cocci	<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>	Positif
	<i>Enterococcus faecalis ATCC 29212</i>	
Levure	<i>Candida albicans ATCC 10231</i>	

2. Evaluation de l'activité sur milieu gélosé:

L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant l'huile essentielle. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé (BSSAIBIS et *al*, 2009).

✚ Méthode des disques :

- Selon la NCCLS 1990, l'activité des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* de différentes zones a été évaluée.
- Les différentes souches sont inoculées sur gélose nutritive pour les bactéries et gélose Sabouraud pour la levure. Après incubation de 18 à 24 heures à 37°C, un inoculum est préparé pour chaque souche dans l'eau physiologique, jusqu'à une densité microbienne de 10⁶ et 10⁴ UFC/ml pour les bactéries et la levure respectivement, puis ensemencement sur Mueller-Hinton.
- Les boîtes de pétri contenant le milieu gélosé (Muller Hinton) sont inoculées par inondation, après 30 mn, les boîtes de pétri sont mises à sécher 15 mn à 37°C

- Les disques (6 mm de diamètre) imprégnés d'huile essentielle (10 µl) sont déposés aseptiquement sur la gélose inoculée. Les boîtes sont ensuite incubées 24 heures à 37 °C.
- Les zones d'inhibition des souches sont observées autour des disques (6 mm) puis mesurées.
- Des disques standards d'antibiotiques sont utilisés comme contrôles positives, la gentamicine (10µg) pour les bactéries et l'amphotéricine B (20µg) pour la levure.

3. Détermination des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice):

Les CMI sont déterminées par la méthode standardisée de micro-dilution en milieu liquide.

L'étude est réalisée en microplaques en matière plastique comportant 96 puits à fond « U » (8 rangées de 12 puits numérotés de 1 à 12) en bouillon Mueller- Hinton, avec un inoculum bactérien final de 5.10^6 UFC/ml, selon les recommandations de la CA-SFM.

Les microplaques sont incubées 18h à 37°C en aérobiose.

Les dilutions d'échantillons ont été distribuées dans les cupules en partant de la concentration la plus forte (250 µg/ml) à la plus faible (1.95 µg/ml). Les dilutions de l'huile essentielle ont été réalisées dans le DMSO à 10%, la première concentration étant 250 µg/ml puis des dilutions en cascade jusqu'à la concentration 1.95 µg/ml.

La CMI correspond à la première dilution où la croissance est négative (pas de culture visible), la suspension de la cupule correspondant est inoculé sur gélose pour déterminé l'activité exercée par l'huile essentielle sur les souches testées, où leurs croissance correspondant à l'activité bactériostatique, tandis que l'effet bactéricide est révélé par une gélose claire après incubation (DRAMANE, 2010).

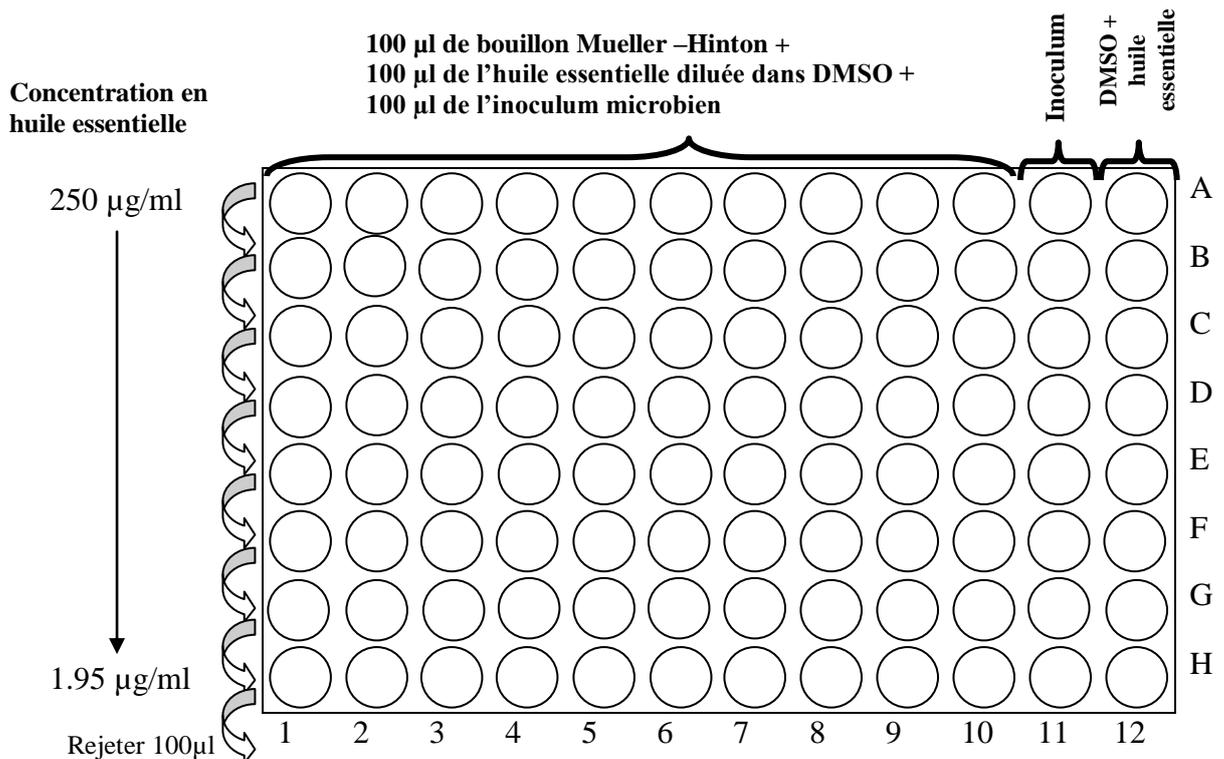


Figure n°27: Schéma d'utilisation d'une microplaque.

TROISIÈME PARTIE
RÉSULTATS & DISCUSSION

I. Phytochimie de *Ruta chalepensis* :

1. Teneurs en eau

Le tableau n°5 regroupe les teneurs en eau de nos échantillons.

Tableau n° 5: Influence du lieu de récolte et la partie de la plante sur la teneur en eau (exprimée en %)

Station	Station 1 (Ain Tolba)	Station 2 (Sidi Safi)	Station 3 (Beni Rhanane)	Station 4 (Sidi Ben Adda)
Altitude	350	700	100	500
Partie de la plante				
Tige	45.97	62.14	59.16	40.18
Feuille	54.90	77.18	60.15	47.28
Fleur	–	78.15	–	53.17

Nous constatons que :

- Comme la plupart des végétaux, notre plante est riche en eau.
- Les feuilles et les fleurs disposent d'un plus grand rendement comparativement parlant aux tiges.
- L'altitude n'a aucune influence sur ce rendement. En effet, la station 2 située à 700 m et la plus riche en eau, suivie de la station 3 (100 m), puis de la station 1 (350 m) et enfin de la station 4 à 500m d'altitude.

2. Groupes chimiques caractérisés

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant une plante, nous permet d'avoir une bonne idée sur ses activités pharmacologiques. Pour cela nous avons réalisé les tests phytochimiques sur les trois parties de la plante (tiges, feuilles et fleurs),

Ces tests sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée.

Ainsi :

- Une réaction franchement positive est représentée par : +++
- Une réaction moyennement positive est représentée par : ++
- Une réaction faiblement positive est représentée par : +
- L'absence de la substance est représenté par : –.

Les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence plusieurs groupes chimiques. Les résultats sont présentés dans les tableaux n°6, 7 et 8.

- Dans les tableaux n°6, 7 et 8 : les Dérivés anthracéniques combinés sont symbolisés par :
 - O: pour les O-hétérosides
 - C: pour les C- hétérosides
 - G: pour les O- hétérosides à génines réduites.

Tableau n° 6: Les groupes chimiques rencontrés dans les feuilles de *Ruta* des 4 stations d'études

Stations			Station 1	Station 2	Station 3	Station 4	
Constituants							
Composés phénoliques	Catéchols		-	±	-	-	
	Tanins	catéchiques	+	++	+	+	
		galliques	-	-	-	-	
	Flavonoïdes	Flavonones et Flavanonols		+++	+++	++	++
		Flavonoïdes libres		+	++	+	+
		Leucoanthocyanes		-	-	-	-
	Anthocyanes		-	-	-	-	
	Dérivés anthracéniques	libres		-	-	-	-
		Combinés	O	-	-	-	-
			C	+	-	-	-
G	+		+	-	-		
Coumarines		+	+++	++	+++		
Composés azotés	Alcaloïdes		+++	++	+++	++	
Stéroïdes et terpénoïdes	Stéroïdes		+++	++	++	+++	
	Tritèrènes		+	+	+	+	
	Saponosides		+	+	++	++	
			IM=118.75	IM= 125	IM= 150	IM=141.66	

- IM : Indice de Mousse

Tableau n° 7: Les groupes chimiques caractéristiques de la tige de *Ruta chalepensis* des quatre stations

Stations			Station 1	Station 2	Station 3	Stations 4	
Constituants							
Composés phénoliques	Catéchols		-	±	-	-	
	Tanins	catéchiques	+++	+++	++	++	
		galliques	-	-	-	-	
	Flavonoïdes	Flavones		+	+	-	-
		Flavonoïdes libres		+	+	++	++
		Leucoanthocyanes		-	-	-	-
	Anthocyanes		-	-	-	-	
	Dérivés anthracéniques	libres		+	+	+	-
		Combinés	O	-	-	-	-
			C	+	+	+	+
G	+		-	-	-		
Coumarines		+++	+	++	++		
Composés azotés	Alcaloïdes		++	+	+++	++	
Stéroïdes et terpénoïdes	Stéroïdes		++	++	+	+	
	Tritèrènes		+++	+++	+	+	
	Saponosides		+++	-	+++	++	
			IM= 225		IM= 237.5	IM= 150	

- IM : Indice de Mousse

Tableau n° 8: Les groupes chimiques de fleur de *Ruta chalepensis*.

Stations			Station 2	Station 4	
Constituants					
Composés phénoliques	Catéchols		-	-	
	Tanins	catéchiques	++	+	
		galliques	-	-	
	Flavonoïdes	Flavonoïdes libres	+++	+++	
		Leucoanthocyanes	-	-	
	Anthocyanes		-	-	
	Dérivés anthracéniques	libres	-	-	
		Combinés	O	-	-
			C	-	-
			G	-	-
Coumarines		+++	+++		
Composés azotés	Alcaloïdes		++	++	
Stéroïdes et Terpénoïdes	Stéroïls		+	+	
	Tritèrènes		+	+	
	Saponosides		+	+	
		IM= 66.66	IM= 50		

- IM : Indice de Mousse

Nous constatons que :

- Les flavonoïdes existent dans les trois parties de la plante. Ils sont en quantités plus importantes dans les feuilles par rapport aux tiges et fleurs et cela pour toutes les stations étudiées. La réaction de cyanidine confirme la présence de flavonones, flavanonols et flavonoïdes libres dans les feuilles. De flavones et flavonoïdes libres (génines flavoniques) dans les tiges et fleurs.
- Dans les quatre stations, les tanins catéchiques sont présents avec des quantités plus importantes dans les tiges par rapport aux feuilles et aux fleurs. Leur présence est confirmée par la réaction de Stiasny.
- Les coumarines sont importants dans les trois parties de la plante et cela quelque soit la station.
- Dans toutes les stations, nous avons remarqué que les alcaloïdes sont plus importants dans les feuilles et tiges par comparaisons aux fleurs.
- Les stéroïls sont plus importants que les triterpènes dans les feuilles, et inversement dans les tiges. Ils sont cependant en quantité équivalentes dans les fleurs dans toutes les stations.
- Les indices de mousses indiquent que l'intensité des saponosides est plus importante dans les tiges et les feuilles comparativement parlant aux fleurs dans les stations : 1, 3 et 4. Un cas exceptionnel et enregistré dans la station 2 où nous constatons l'absence des saponosides dans les tiges.
- Enfin, il est à noter que dans les quatre stations, les tanins galliques, les anthocyanes, les Leucoanthocyanes et catéchols ainsi que les dérivés anthracéniques dans les différentes parties de la plantes sont absents ou rares.
- De façon général, les familles chimiques détectées dans notre étude viennent confirmer les travaux de HNATYSZYN et *al* en 1974 ; MOHR et *al* en 1982 ; ULUBELEN et TEREM en 1988 et aussi MANSOUR EL-SAID et *al* en 1990 sur la même espèce (*Ruta chalepensis*) de provenance d'Espagne, Égypte, Turquie et d'Arabie saoudite respectivement.

- Des screening phytochimiques ont mis en évidence la présence de coumarines: chalepensis, chalepin, rutamarin, bergapten, isopimpinellin et xanthotoxin (ULUBELEN et TEREM, 1988), augustifolin, scoparone et le 6,7,8-trimethoxy-coumarine (DEL CASTILLO et *al*, 1984), et d'alcaloïdes : kokusaginine, skimmianine , arborinine, γ -fagarine, graveoline, 3'-hydroxygraveoline (ULUBELEN et *al* , 1986), taifine, isotaifine and 8-methoxytaifine (MOHR et *al*, 1982) en plus du choloridone (ULUBELEN et TEREM, 1988).

3. Rendement des extractions

NB : La plante recueillie des stations d'Ain Tolba et Beni Rhanane n'a pas fleuri, de ce fait nous avons récolté la plante pour l'extraction de l'huile essentielle, mais nous n'avons pas réalisé les autres extraits sur les fleurs.

3.1. Extrait brut méthanolique: (voir annexe n°6)

Les rendements en extraits bruts (en %) dans les différentes parties de la plante dans les quatre stations sont présentés au tableau n°9:

Tableau n° 9: Rendement en extraits bruts

Station	Partie de la plante	% en extraits bruts
Station 1 (Ain Tolba)	Tige	8.2
	Feuille	15.88
	Fleur	-
Station 2 (Sidi Safi)	Tige	5.75
	Feuille	19.81
	Fleur	32.15
Station 3 (Beni Rhanane)	Tige	17.49
	Feuille	19.38
	Fleur	-
Station 4 (Sidi Ben Adda)	Tige	6.05
	Feuille	13.52
	Fleur	23.76

Les rendements en extraits bruts sont variables selon les stations et la partie de la plante. Cependant, les rendements les plus importants sont enregistré dans les fleurs, suivis des feuilles et en dernier des tiges.

Il est intéressant de remarquer que *Ruta chalepensis* de la station de Sidi Safi est la plus riche en substances solubles dans le méthanol.

Selon une étude mener par MANSOUR EL-SAID et *al* en 1990 sur la même espèce, le rendement en extrait brut de la partie aérienne entière est de 3.75%. Rendement nettement inférieure à celui obtenu dans notre étude. Cela est peut être du à l'utilisation de soxlet où la température élevée pendant plusieurs heures qui peut dégrader certains constituants sensibles (tels les polyphénols...) (ANDERSEN et MARKHAM, 2006), ce qui n'est pas le cas dans notre étude où l'extraction est réalisée à froid par simple macération.

3.2. Extraits flavoniques : (voir annexe n°6)

Les rendements en extrait flavonique sont représentés dans le tableau n° 10.

Tableau n° 10: Rendements en extraits flavoniques (%)

Station	Partie de la plante	% en extraits flavoniques
Station 1 (Ain Tolba)	Tige	1.03
	Feuille	4.89
	Fleur	-
Station 2 (Sidi Safi)	Tige	1.63
	Feuille	5.64
	Fleur	3.83
Station 3 (Beni Rhanane)	Tige	2.32
	Feuille	2.79
	Fleur	-
Station 4 (Sidi Ben Adda)	Tige	1.84
	Feuille	2.48
	Fleur	3.92

Les rendements sont en relation avec la partie de la plante ainsi qu'avec la station d'étude.

Selon le protocole d'extraction des flavonoïdes utilisé, nous remarquons, qu'à l'exception des tiges ou ils sont les plus faibles, ces rendements sont indépendants de la partie de la plante. Notamment pour les stations 2 et 4. En effet, nous notons bien une différence de proportion entre les fleurs et les feuilles pour ces deux stations.

Le rendement le plus important est obtenu dans les feuilles de la station de Sidi Safi.

Nos résultats sont confirmés par FLEMING *et al*, 2000, où les flavonoïdes représentent selon ses auteurs, 2 à 5% selon la partie de la plante utilisée.

3.3. Extraits alcaloïdiques : (voir annexe n°6)

Les rendements en extraits alcaloïdiques sont présentés selon la partie de la plante (tige, feuille ou fleur) et selon les différentes stations de récolte dans le tableau n° 11:

Tableau n° 11: Rendements en extraits alcaloïdiques

Station	Partie de la plante	% en extrait alcaloïdique
Station 1 (Ain Tolba)	Tige	0.81
	Feuille	2.39
	Fleur	-
Station 2 (Sidi Safi)	Tige	0.26
	Feuille	0.35
	Fleur	0.60
Station 3 (Beni Rhanane)	Tige	1.17
	Feuille	1.55
	Fleur	-
Station 4 (Sidi Ben Adda)	Tige	0.92
	Feuille	0.47
	Fleur	0.84

Nos résultats montrent que nos rendements en alcaloïdes :

- Sont en ordre décroissant allant des fleurs, feuilles puis tiges ; pour les stations 2 et 4 ; feuilles et tiges pour les deux autres.
- Qu'ils sont plus importants dans les stations d'Ain Tolba et de Beni Rhanane.
- Ce qui est en accord avec la bibliographie : WATERMAN (1975), FLEMING *et al* (2000).

3.4. Huile essentielle : (voir annexe n°6)

L'huile essentielle était extraite de la plante entière dans deux périodes, avant et pendant la floraison, le tableau n° 12 représente les rendements en huile essentielle obtenus.

Tableau n° 12: Rendement en huile essentielle (en %)

Période Station	Avant floraison	Pendant floraison
Station 1 (Ain Tolba)	0.42	0.51
Station 2 (Sidi Safi)	1.27	1.67
Station 3 (Beni Rhanane)	0.41	0.48
Station 4 (Sidi Ben Adda)	1.80	1.90

Il apparait au vu des résultats du tableau n°12 que les rendements sont meilleurs pendant la floraison. De plus, il semblera qu'il y a une relation entre altitude et rendement. En effet, les stations de Sidi Safi et Sidi Ben Adda respectivement situées à 700 et 500 m d'altitude enregistrent des rendements plus importants par rapport à ceux des deux autres stations situées à moins de 350 m. Ce qui est confirmé par l'étude de MERGHACHE et al, 2009.

Les rendements de l'huile essentielle rencontrés dans nos échantillons, sont plus importants que ceux enregistrés par MERGHACHE et al, 2009 (0.82 %), d'INIGO et al, 1981 citée par MERGHACHE (0.1 à 1.13%) sur la même espèce, mais moins importants que ceux enregistrés par MEJRI et al, 2010 (jusqu'à 5.51% v/m) sur la même espèce du nord de Tunisie.

4. Les indices physicochimiques de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis*

Les indices de l'huile essentielle, consignés dans le tableau n°13, sont calculés avant et pendant floraison de la plante.

Tableau n° 13: Les indices physicochimiques de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis*

Période de cueillette	Indices Stations	Densité à 20°C	Miscibilité dans l'éthanol	Indice de réfraction	Indice d'acide	Indice d'ester	Indice de peroxyde
Avant floraison	Station 1 (Ain Tolba)	0.9295	1V/1.5V	1.428	8.62	50.36	8623.78
	Station 2 (Sidi Safi)	0.8812	1V/1.5V	1.429	4.82	47.87	6221.03
	Station 3 (Beni Rhanane)	0.9013	1V/1.5V	1.500	9.53	30.90	9423.75
	Station 4 (Sidi Ben Adda)	0.9133	1V/1.5V	1.398	2.15	18.98	7920.79
Pendant floraison	Station 1 (Ain Tolba)	0.9115	1V/1.5V	1.344	8.50	52.44	9036.95
	Station 2 (Sidi Safi)	0.8631	1V/1.5V	1.378	3.11	48.15	8905.08
	Station 3 (Beni Rhanane)	0.8840	1V/1.5V	1.464	8.75	31.68	9800.50
	Station 4 (Sidi Ben Adda)	0.8960	1V/1.5V	1.350	2.09	19.02	8031.23

Nous pouvons constater :

- Un volume d'huile essentielle de chaque station est miscible dans un volume et demi d'éthanol, avant ou pendant floraison.

- Les densités à 20°C et les indices de réfractions des huiles essentielles des quatre stations sont proches, avec des diminutions infimes pendant la floraison.

- L'huile essentielle de Sidi Ben Adda a l'indice d'acide et d'ester les plus faibles par rapport aux autres stations.

- Pour les densités à 20°C, les indices de réfraction et d'acide de très faibles diminutions sont remarqués pour les huiles essentielles de la plante pendant floraison. L'inverse est observé pour l'indice d'ester et de peroxyde. Cela est valable pour chaque station prise à part.

- Nos résultats sont dans l'ensemble conformes à la littérature, où les propriétés physicochimiques déterminés par BASER et *al*, 1996 cité par MERGHACHE et de MERGHACHE et *al*, 2009 sont proches (tableau n°14).

Tableau n° 14: les indices physicochimiques de l'huile essentielle de *R. chalepensis* de la région de Tlemcen (Beni Mester) obtenus par l'étude de MERGHACHE et *al*, 2009

Station	Indices	Densité à 20°C	Miscibilité dans l'éthanol	Indice de réfraction	Indice d'acide	Rendement (%)
	Période					
Beni Mester	Avant floraison	0.8273	1V/2V	1.4344	7.32	0.28
	Pendant floraison	0.8312	1V/2V	1.4316	4.52	0.78

☞ La composition chimique des huiles essentielles varie avec le lieu de récolte. Il a été rapporté que le 2-undécanone est le constituant majoritaire de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* de provenance l'Argentine (38.1%), la Turquie (66.5%), l'Iran (52.5%) et l'Inde (4.3 - 67.8%). Quant à l'huile essentielle de l'Arabie Saoudite, le pourcentage en 2-undécanone est inférieur ou égal à 4.5%. Cependant l'huile essentielle de provenance l'Italie contient deux constituants majoritaires le 2-nonanone (49.9 %) et le 2-undécanone (30.0 %) (MERGHACHE et *al*, 2009).

L'analyse par CG-SM de l'huile essentielle de rue de provenance Tunisie, 13 composés ont été identifiés, le constituant majoritaire est le 2-undécanone (77.18%), 2-decanone (8.96%) et 2-dodécanone (2.37%) dans l'huile essentielle de la partie aérienne, pour celui des fleurs le composé unique était le 2-Undécanone (100%), le pulegone dans les tiges (32.11%) et le camphore est exclusivement identifié dans l'huile essentielle des feuilles (2.46%) (MEJRI et *al*, 2010).

Tandis que d'après l'étude de MERGHACHE et *al*, 2009. L'analyse par CG et CG/SM des constituants volatils des différentes parties de la plante montre que les fleurs possèdent un seul constituant majoritaire : le 2-undécanone (68.95%) et que les feuilles et les tiges sont riches en 2-undécanone, 2-nonanone et le 1-décanol.

II. Tests in vitro de l'activité antioxydante

La capacité antioxydante des extraits de plante sont largement dépendant de la composition de ces extraits ainsi que les conditions de manipulation des tests in vitro, l'évaluation de l'activité est donc nécessairement réalisée par au moins deux méthodes différentes (WONG, LEONG et KOH, 2006).

Remarque : Dans toutes les figures qui suivent la nomination des extraits : T= tige, F= feuille, Fl= fleur, les numéros de 1 à 4 indiquent les stations (1 : Ain Tolba ; 2 : Sidi Safi ; 3 : Beni Rhanane ; 4 : Sidi Ben Adda)

1. Réduction du fer (FRAP) :

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction de fer est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs (LI et al, 2007).

Pour tous les extraits, des dilutions en cascade allant de 1 à 0.06 mg/ml, sont préparées, les pouvoirs réducteurs sont mesurés à 700 nm (AMAROWICZ et al, 2010 ; GÜLÇIN et al, 2010).

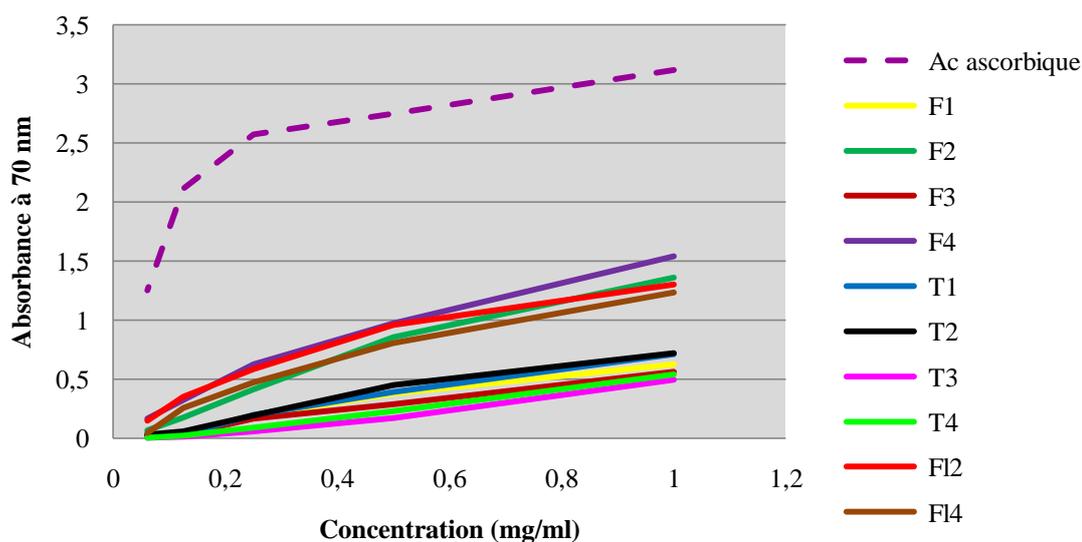


Figure n° 28: Pouvoir réducteur des extraits bruts et de l'acide ascorbique.

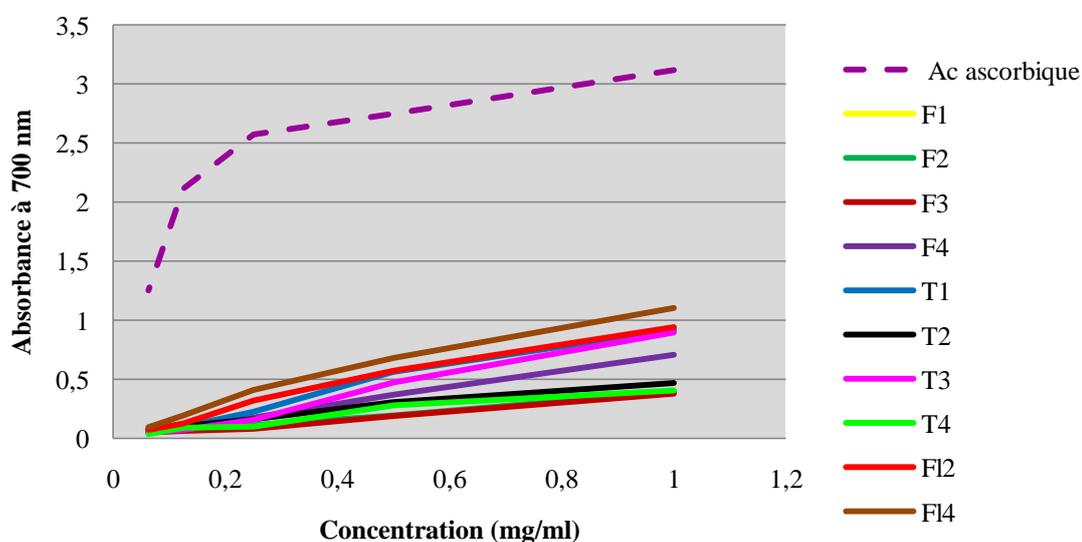


Figure n° 29: Pouvoir réducteur des extraits flavoniques et de l'acide ascorbique.

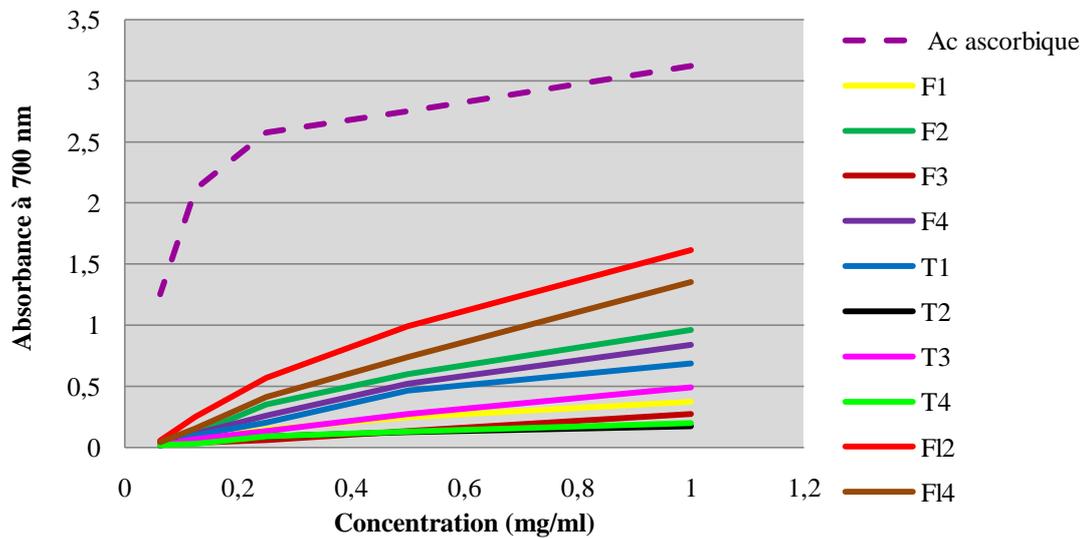


Figure n° 30: Pouvoir réducteur des extraits alcaloïdiques et de l'acide ascorbique.

Les pouvoirs réducteurs de tous les extraits bruts, flavoniques et alcaloïdiques sont représentés dans l'histogramme ci-dessus pour avoir une idée sur les extraits les plus actifs.

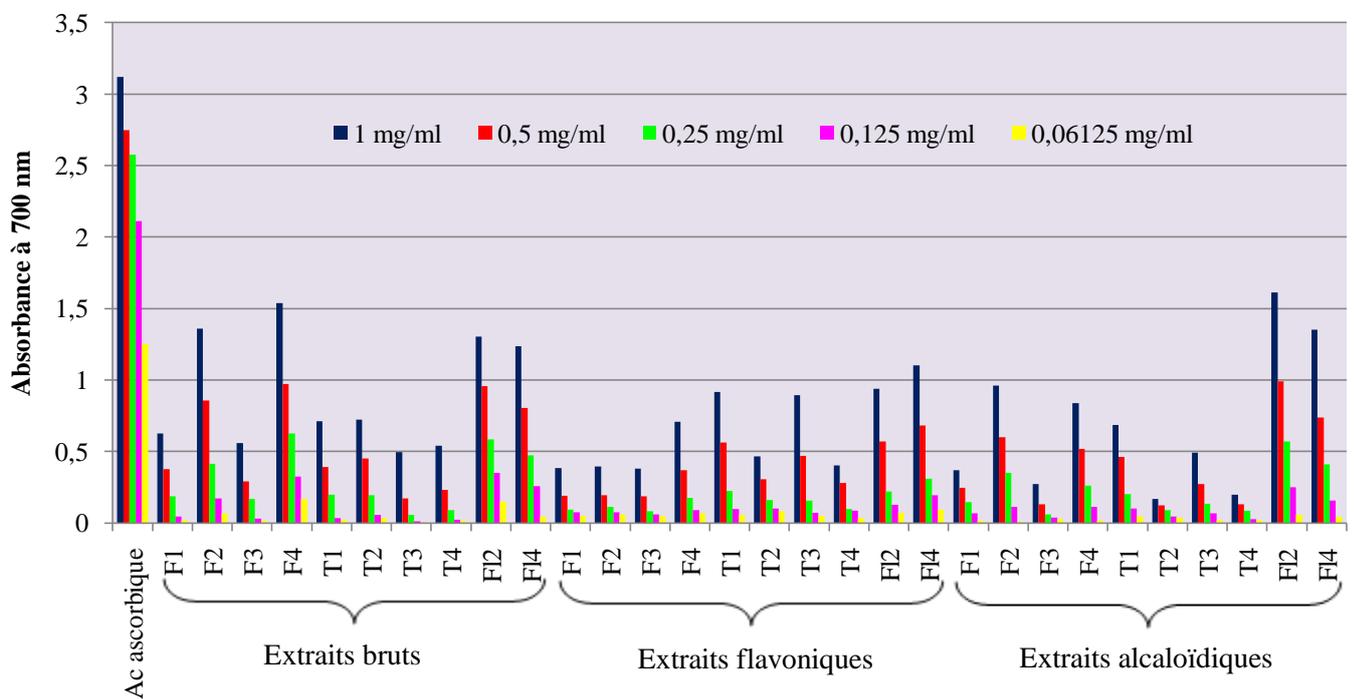


Figure n° 31: Pouvoir réducteur de tous les extraits de *Ruta chalepensis*.

- ☞ D'après nos résultats, pour tous les extraits testés une augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées.
- ☞ Tous nos extraits des trois parties de la plante recueillie des quatre stations présentent des activités antioxydantes nettement inférieures que celle de la référence (acide ascorbique), pour ce dernier la réduction est presque totale à partir d'une concentration de 0.6 mg/ml.

- Les extraits bruts sont généralement les plus actifs, puis les extraits alcaloïdiques et flavoniques, dans les différentes stations.
- Les extraits de fleurs sont les plus actifs comparativement parlant aux extraits de feuilles ou tiges dans chaque station à part (sauf exception pour les extraits bruts de feuilles des stations 2 et 4 qui sont plus actifs).

2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl):

L'activité antioxydante des différents extraits flavoniques et alcaloïdiques de *Ruta vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement 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.

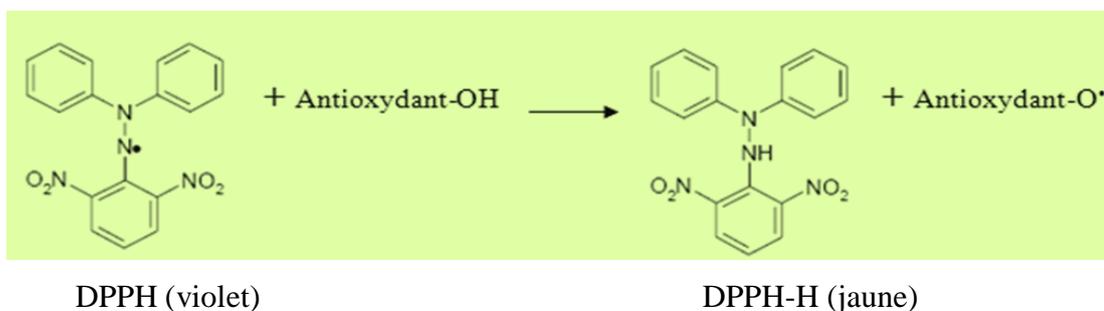


Figure n° 32: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Pour l'évaluation de cette activité, on a préparé une gamme de dilutions allant de 0,046875 à 1.5 mg/ml pour l'acide ascorbique, de 0,46875 à 15 mg/ml pour les extraits bruts et alcaloïdiques, de 0,625 à 20 mg/ml pour les extraits flavoniques.

Les différentes densités optiques ont permis de tracer pour chaque extrait, une courbe d'allure exponentielle, ce qui signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'extrait dans le milieu réactionnel.

2.1. Acide ascorbique :

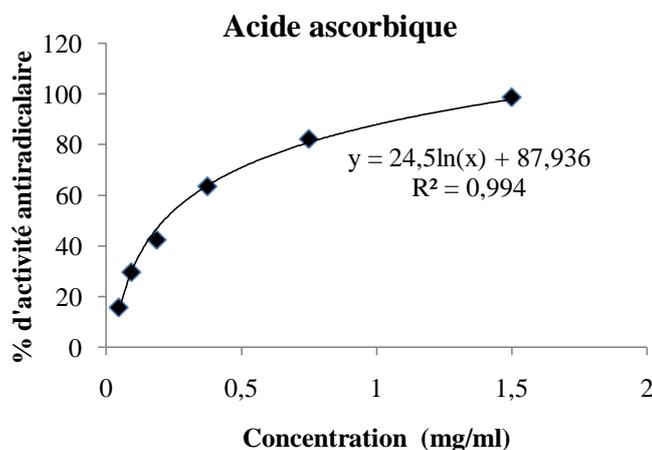


Figure n° 33: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH de l'Acide Ascorbique.

Remarque : Dans toutes les figures qui suivent la nomination des extraits : T= tige, F= feuille, Fl= fleur, les numéros de 1 à 4 indiquent les stations (1 : Ain Tolba ; 2 : Sidi Safi ; 3 : Beni Rhanane ; 4 : Sidi Ben Adda).

2.2. Extraits bruts méthanolique:

Les profils d'activités anti-radicalaires des extraits bruts de différentes parties de la plante des 4 stations sont représentés dans la figure.

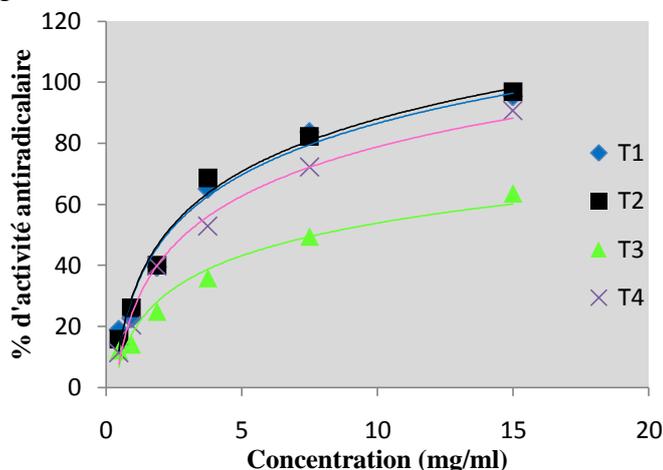


Figure n° 34: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits bruts des tiges.

L'extrait brut des tiges des stations 1, 2 et 3 ont montré des pouvoirs de piégeage du radical DPPH presque similaires, tandis que les tiges de la quatrième station ont une activité moindre. De façon générale, tous les extraits bruts des tiges des différentes stations ont atteint 50% d'activité.

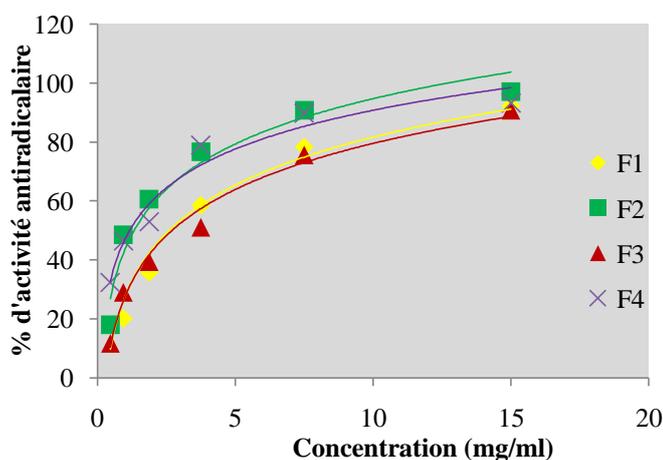


Figure n° 35: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits bruts des feuilles.

En vu de la figure si dessus, nous pouvons dire que les extraits bruts des feuilles ont tous des activités similaires, et atteints 50% d'activité à des concentrations inférieures à 3 mg/ml

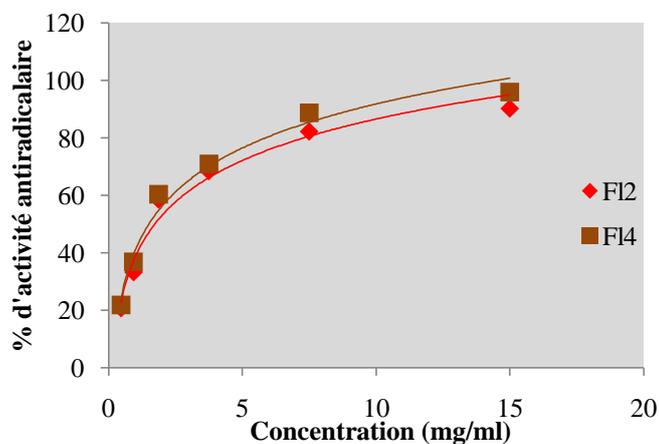


Figure n° 36: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits bruts des fleurs.

Les fleurs ont des pouvoirs réducteurs similaires, plus importants par rapport aux autres parties de la plantes et ont atteint 50% de réduction avant une concentration de 2 mg/ml.

2.3. Extraits flavoniques :

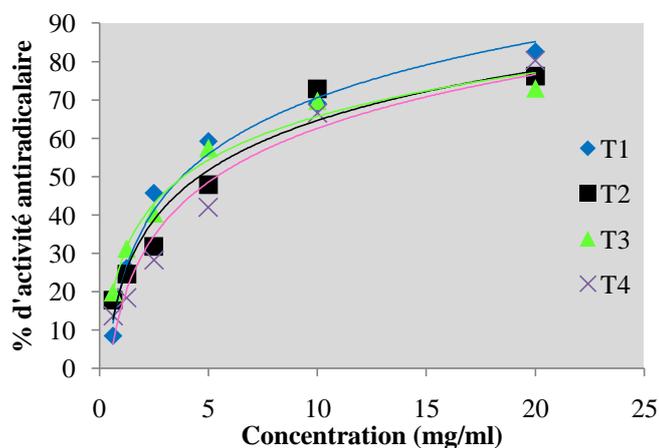


Figure n° 37: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits flavoniques des tiges.

Les extraits flavoniques des tiges ont révélés des activités moins importantes que les extraits bruts, ils ont atteint 50% de réduction à des concentrations proches de 5 mg/ml.

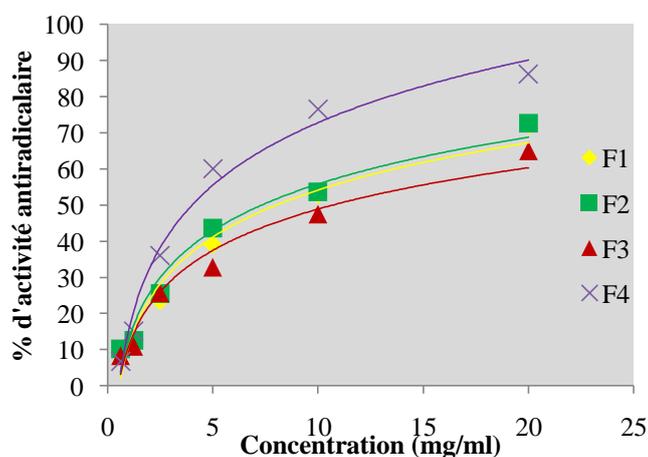


Figure n° 38: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits flavoniques des feuilles.

Les extraits flavoniques des feuilles des quatre stations ont tous atteint 50% d'activité antiradicalaires mais à des concentrations différentes, les feuilles de la quatrième station ont montré l'activité la plus importante, tandis que celles de la station trois les moindre.

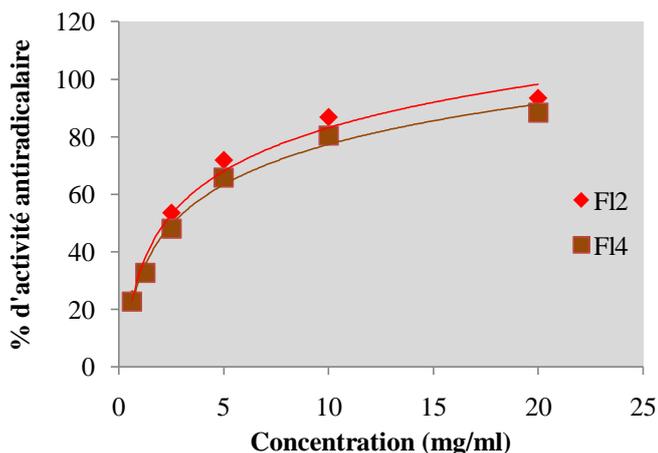


Figure n° 39: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits flavoniques des fleurs.

Les extraits flavoniques des fleurs ont atteint aussi 50% d'activité à des concentrations inférieures à 3 mg/ml, avec des activités similaires pour les fleurs des deux stations où on a pu les cueillir.

2.4. Extraits alcaloïdiques :

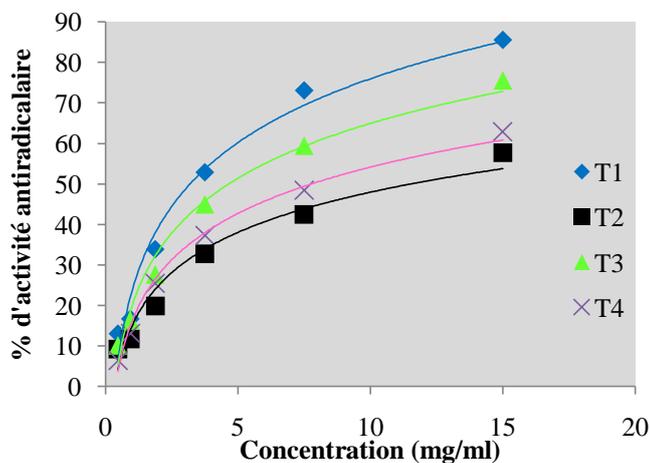


Figure n° 40: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits alcaloïdiques des tiges.

Les extraits alcaloïdiques des tiges ont montré des activités moyennes avec une atteinte de 50% de réduction à des concentrations situées entre 3 et 12 mg/ml.

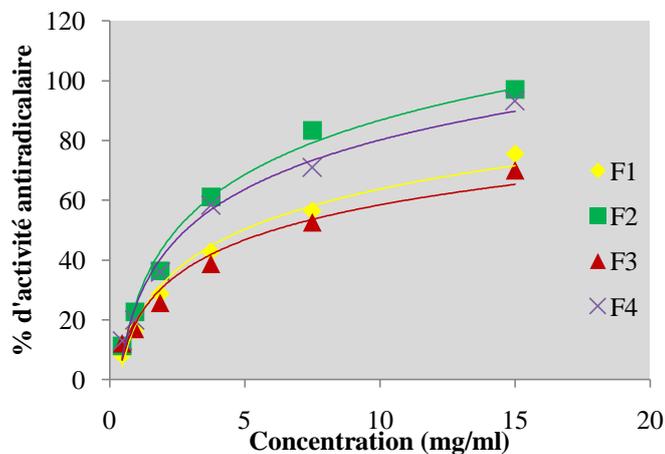


Figure n° 41: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits alcaloïdiques des feuilles.

Les extraits alcaloïdiques des feuilles des stations 2 et 4 ont montré des pouvoirs de réduction meilleurs que celles des stations 1 et 3. Tous les extraits ont atteint 50% de réduction à des concentrations différentes.

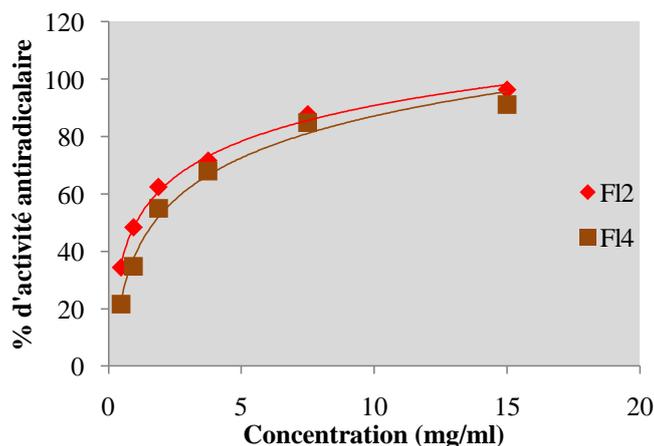


Figure n° 42: Pourcentages de réduction du radical libre DPPH des extraits alcaloïdiques des fleurs.

Les extraits alcaloïdiques des fleurs préparés selon la méthode d'HARBORNE, ont atteint le seuil de 50% de réduction du radical libre DPPH à des concentrations proches et inférieures à 2 mg/ml.

3. Calcul des IC50 :

La capacité antioxydante de nos différents extraits a été déterminée à partir des IC50. C'est la concentration en extrait nécessaire pour réduire 50% du radical DPPH. L'IC50 et l'activité antioxydante de l'extrait testé sont inversement proportionnels (PRAKASH et al, 2007).

Nous avons calculé les IC50 pour chaque extrait à partir de l'équation logarithmique de la courbe tracée, les valeurs sont représentées dans le tableau n°15,

Tableau n° 15: Valeurs des IC50 (en mg/ml) des extraits de *Ruta chalepensis* et de l'Acide Ascorbique.

EXTRAITS	IC50 extraits bruts	IC50 extraits flavoniques	IC50 extraits alcaloïdiques
T1	2,23320728	8,004962875	3,188674747
F1	2,60081804	3,788174845	4,926310927
T2	2,16844811	7,319435742	11,53318972
F2	1,33019767	4,57243077	2,462053518
F12	1,72494055	2,183671173	1,03812411
T3	7,78526629	10,69267189	4,651840474
F3	2,70050907	3,845749799	6,065272212
T4	2,89775631	4,011943191	7,776028805
F4	1,16591909	5,387620555	2,815928756
F14	1,50715176	2,465578239	1,710270345
Acide Ascorbique	0,06822943		

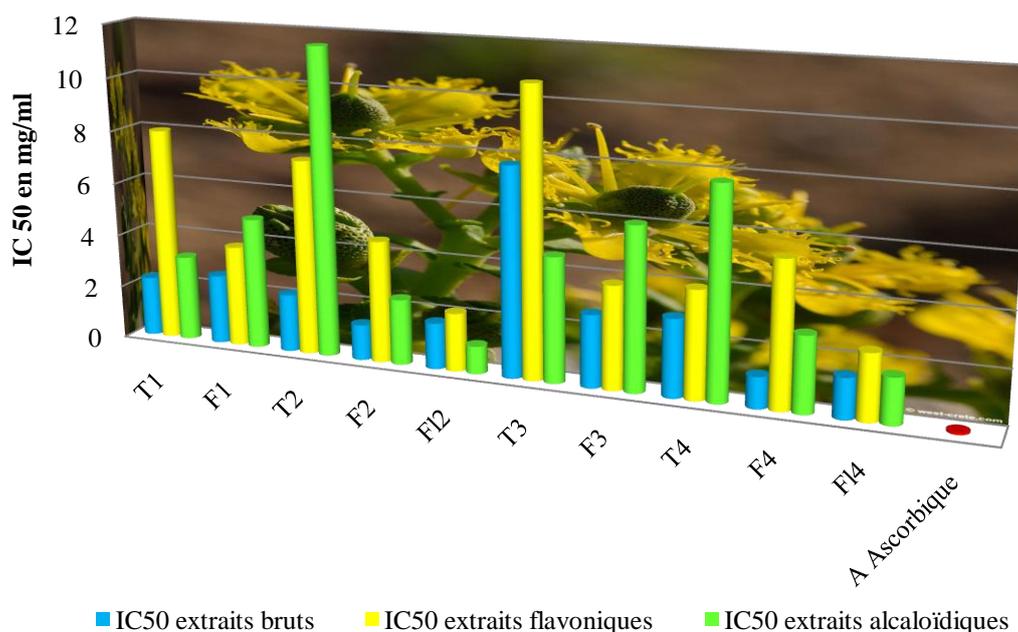


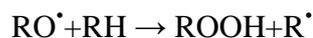
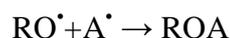
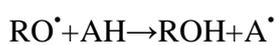
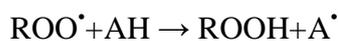
Figure n° 43: Les IC50 des différents extraits de *Ruta chalepensis* et de l'acide ascorbique.

- D'après l'histogramme, nous remarquons en premier lieu que tous nos extraits ont des activités moins importantes que la substance de référence, l'acide ascorbique,
- En second lieu, les extraits des fleurs sont généralement les plus actives par rapport aux autres extraits des feuilles et tiges,

- Au sein des extraits bruts on peut les classer selon l'ordre décroissant d'activité antioxydante comme suit : Acide ascorbique > F4 > F2 > F14 > F12 > T2 > T1 > F1 > F3 > T4 > T3 ;
- Les extraits flavoniques peuvent être classés par ordre décroissant du pouvoir anti-radicalaire, comme suit : Acide ascorbique > F12 > F14 > F1 > F3 > T4 > F2 > F4 > T2 > T1 > T3 ;
- Finalement, les extraits alcaloïdiques sont classés par ordre d'activité décroissante comme : Acide ascorbique > F12 > F14 > F2 > F4 > T1 > T3 > F1 > F3 > T4 > T2.
- D'après les résultats, le classement des extraits selon la méthode du piégeage du radical DPPH est confirmé par le classement obtenu par la méthode de réduction du fer.

4. Conclusion de l'activité antioxydante :

- Les extraits bruts sont plus actifs que les extraits alcaloïdiques et flavoniques, cela est due sûrement à la complexité des extraits bruts en substances polyphénoliques et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (VERMERRIS et NICHOLSON, 2006).
- BOLAND et TENHAVE ont postulé en 1947 les réactions selon lesquelles les composés phénoliques (AH) interfèrent avec l'oxydation des lipides en cédant leurs hydrogènes aux radicaux lipidiques, puis entrent en compétition avec les réactions de propagation (SHAHIDI et NACZK, 2004).



L'efficacité de l'antioxydant (AH) augmente si la force de la liaison A-H est faible et le radical (A) résultant doit être le plus stable possible, ce qui est le cas pour les composés phénoliques et flavonoïdes, se sont des meilleurs donneurs d'électron ou d'hydrogène (SHAHIDI et NACZK, 2004), chélateurs des ions métalliques (PRATT et HUDSON, 1990 ; LADANIYA, 2008). Plusieurs études ont montrés que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants (HEIGNEN et *al*, 2001 ; HEIM et *al*, 2002), et aussi les sites d'hydroxylation des différents noyaux affectent la potentialité antioxydante (URI, 1961). Pour les flavonoïdes, les formes aglycones sont plus actives que les formes glycosylées (SHAHIDI et NACZK, 2004).

- Les activités des extraits flavoniques sont généralement proches de celles des extraits bruts. Selon DJERIDANE et *al* (2006), les flavonoïdes représentent un groupe important de composés phénoliques chez le genre *Ruta*.
- En général, les activités de nos extraits sont moyenne en général, ce qui est confirmé par l'étude de DJERIDANE et *al*, 2006 où il a trouvé que l'activité d'extrait phénolique de *Ruta sp* est

moins importante par rapport aux autres dix plantes étudiées en même temps, malgré que le contenu en composés phénoliques est important, cela est due généralement à la synergie entre les différents composés antioxydants existants, ce qui rend l'activité non seulement concentration-dépendante.

- 📖 Selon l'étude de RATHEESH et *al*, 2010 sur une espèce proche, *Ruta graveolens* révèle aussi une activité antioxydante remarquable, en plus de l'activité anti-inflammatoire et prévention contre les maladies cardiaques chez des rats obèses.

III. Evaluation de l'activité antibactérienne :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de la plante *Ruta chalepensis* des quatre stations a été effectuée, et ce vis-à-vis de cinq souches bactériennes et une levure. Les souches étudiées sont représentées dans le tableau n°16.

Tableau n° 16: Les souches microbiennes.

Souches	Etat frais	Coloration de Gram	Provenance
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bacille	-	Laboratoire LAPRONA (Université de Tlemcen).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bacille	-	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11178	Bacille	+	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Cocci	+	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Cocci	+	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Levure		

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par deux techniques :

- ✚ La technique de diffusion des disques sur milieu solide, qui est une technique qualitative basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions en mm. La quantité des huiles essentielles déposée sur les disques est de 10 µl (nous avons essayé avec 3 µl d'huile essentielle mais nous n'avons pas eu d'activité importante).
- ✚ La méthode de micro-dilution en milieu liquide est réalisée pour les souches dont la zone d'inhibition est importante (>10 mm) (DRAMANE, WITABOUNA et KAGOYIRE, 2010).
- ✚ L'inoculation sur milieu gélosé est nécessaire pour déterminer la nature de l'activité antimicrobienne (bactéricide ou bactériostatique).

Tableau n° 17: les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches (en mm) par la méthode de disques. (voir annexe n°4)

Souches	Diamètre d'inhibition (mm)					
	L'huile essentielle				Antibiotique de référence	
	Station 1 (Ain Tolba)	Station 2 (Sidi Safi)	Station 3 (Beni Rhanane)	Station 4 (Sidi Ben Adda)	Gentamicine (10µg)	Amphotéricine B (20µg)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	31	15	36	6	13	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	19	6	10	6	15	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11178	24	6	48	15	23	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	17	38	10	6	32	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	11	12	10	10	26	
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	13	18	10	12		22

- ✚ En vu des résultats, les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* des quatre stations agissent différemment sur les souches testées.
- ✚ L'activité des huiles essentielles est plus importante contre *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* où l'huile était parfois plus actif que l'antibiotique de référence, et moindre contre les autres bactéries et la levure *Candida albicans*.
- ✚ *Pseudomonas aeruginosa*, malgré sa grande résistance aux antibiotiques, elle est sensible vis-à-vis de l'huile essentielle de la station 1, plus ou moins sensible vis-à-vis de l'huile essentielle de celle de 3^{ème} station, et résistante contre les huiles essentielle des stations 2 et 4.
- ✚ *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont résistantes à l'huile essentielle de la station 4.

Tableau n° 18 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles des quatre stations.

(voir annexe n°4)

Microorganisme	Huile essentielle	CMI (µg/ml)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11178	Station 1	31,25
	Station 3	15,625
	Station 4	125
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Station 1	46,875
	Station 2	93,75
	Station 3	125
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Station 1	250
	Station 2	93,75
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Station 1	125
	Station 2	125
	Station 4	187,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Station 1	250
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Station 2	250

- ❖ Les CMI des huiles essentielles des différentes stations sont comprises entre 15 et 250 µg/ml.
- ❖ L'huile essentielle de *Ruta chalepensis* des stations 1,3 et 4 exerce une activité bactériostatique sur *Bacillus cereus*. C'est la souche la plus sensible avec des CMI comprises entre 15 et 125 µg/ml,
- ❖ En second place vient *Escherichia coli* à des concentrations d'inhibitions allant de 46 à 125 µg/ml.
- ❖ *Staphylococcus aureus* est plus sensible vis-à-vis de l'huile essentielle de la deuxième station.
- ❖ Les autres souches sont plus résistantes.

Conclusion :

L'huile essentielle de *Ruta chalepensis* exerce une bonne activité antimicrobienne contre les six souches utilisées dans notre étude, où nous remarquons une grande variation entre les huiles essentielles de cette plante par rapport aux différentes stations de cueillette.

Plusieurs études ont montrés l'efficacité d'autres extraits de rue sur des souches microbiennes tels : L'activité antifongique (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Microsporum canis*, *Paecilomyces lilacinus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*) d'extrait éthanolique de rue démontrée par les travaux de LAUK et al, 2000. D'autres travaux sur l'activité antimicrobienne d'extraits et même d'huile essentielles des espèces proches (*Ruta montana* et *Ruta graveolens*) renforcent plus nos résultats (IVANOVA et al, 2005 ; EMEA, 1999).

Malgré que nous n'ayons pas trouvé dans la littérature des études sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de rue mais le profil des composés volatile qu'il contient selon des travaux variés, confirme l'activité qu'il peut l'exercer.

La présence de composés cétoniques, d'acides aliphatiques, d'alcools de mono et sesquiterpènes révèle aux huiles essentielles des espèces de *Ruta* (*chalepensis*, *graveolens* et *montana*) leurs activités antibactériennes et antifongiques (DE FEO et al, 2002; OLIVA et al, 2003; IVANOVA et al, 2004 ; BURGA, 2005).

CONCLUSION

R*uta chalepensis* est une plante à effet thérapeutique de la racine à la tige, des feuilles aux fleurs, prometteuse pour ses activités antimicrobienne et antioxydante, qui lui confèrent toutes les propriétés pharmacologiques qui date de l'ère Hippocratique. A cette époque déjà elle était utilisée comme abortif, emménagogue et contre des maladies pulmonaires, soit par administration interne par tremper de la plante dans le vin, le miel ou ses dérivés, soit par voie externe. Ce qui est le plus utilisé actuellement, à cause de sa toxicité.

Le screening phytochimique réalisé, a révélé la richesse de notre plante en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, des tanins, des stéroïdes, des triterpènes, des coumarines, des alcaloïdes et des huiles essentielles.

Les rendements des extraits réalisés sur les différentes parties de la plante sont relativement importants. Pour les extraits bruts, les fleurs ont les rendements les plus élevés avec plus de 19%. Les différentes parties de la plantes dans les quatre stations de récolte ont des rendements en extrait flavonique allant de 1 à 5%. Avec la station de Beni Rhanane, le rendement en alcaloïdes est important 1.17% pour les tiges et 1.55% pour les feuilles.

Le pouvoir antioxydant des extraits sont moyens à faible en général, avec des IC50 inférieurs à 12 mg/ml. Ces résultats sont confirmés par deux méthodes : la réduction du fer et le piégeage du radical libre DPPH.

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est moyenne à bonne sur les souches testées.

Bacillus cereus et *Escherichia coli* sont relativement sensibles avec des CMI comprises entre 15 et 94 µg/ml pour les stations de Beni Rhanane, Ain Tolba et Sidi Safi. *Staphylococcus aureus* est sensible à l'huile essentielle des stations d'Ain Tolba et Sidi Safi avec respectivement 17 et 38 mm de diamètre d'inhibition. *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans*, sont plutôt peu à pas sensibles

L'étude sur *Ruta chalepensis* dans les quatre stations sélectionnées de Ain Témouchent, nous a permis de remarquer la diversité au sein de cette espèce, de point de vue composition qu'activité. Aussi nos perspectives pour l'avenir seront :

- Extraction et isolement des produits du métabolisme secondaires avec un degré de pureté suffisant pour les constituants de chaque famille;
- Faire des études *in vitro* sur les activités des constituants de chaque famille cette plante concernant le pouvoir antioxydant et antimicrobien en usant d'autres souches microbiennes.
- Et il serait également intéressant, de tester les différentes familles ou molécules isolées, *in vivo* sur différents modèles biologiques, afin de trouver une application thérapeutique des molécules actives isolées.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de *Ruta chalepensis* comme plante médicinale traditionnelle très largement utilisée par les populations du nord de l'Afrique.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

1. ABDULBASSET M.E.S. et ABDE TAWAB A.H.; 2008; Médicinal Herbal Guide; Ed: ALFA – PUBLISHING; p: 428 - 429.
2. AFNOR ; 1986 ; Huiles Essentielles ; Ed 2: AFNOR ; p: 29- 80.
3. AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) ; 2008 ; Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles.
4. AMAROWICZ R., ESTRELLA I., HERNANDEZ T., ROBREDO S., TROSZYNSKA A, KOSINSKA A. et PEGG R.; 2010; Free radicals-scavenging capacity: antioxidant activity and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*); Food Chemistry 121; Ed: ELSEVIER; p: 705-711.
1. ANDERSEN Ø.M. et MARKHAM K.R.; 2006; Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications; Ed: CRC PRESS: TAYLOR & FRANCIS; p: 1-247.
2. ANISZEWSKI T.; 2007; Alkaloids Secrets of Life; Ed 1: ELSEVIER; p: 61- 88.

-B-

3. BABA IASSA F. ; 1999 ; Encyclopédie des Plantes Utiles : Flore d'Algérie et du Maghreb ; Ed : LIBRAIRIE MODERNE – ROUIBA ; p : 243 - 244.
4. BALCH J. F. et STENGLER M.; 2004; Prescription for Natural Cures; Ed: JOHN WILEY & SONS; p: 146.
5. BARNES J., ANDERSON L.A. et PHILLIPSON J.D.; 2007; Herbal Medicines, Ed 3: PHARMACEUTICAL PRESS; p: 3- 233.
6. BARTOSZ G.; 2003; Generation of reactive oxygen species in biological systems; Comments on Toxicology 9; p: 5-21.
7. BAYSAL T. et STARMANS D.A.J.; 1999; Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Carvone and Lionene from Caraway Seeds; Journal of Supercritical Fluids 14; p: 225-234.
8. BEKRO Y.A. et al ; 2007 ; Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* ; Sciences et Natures 4 (2) ; Ed: HEREND & ZARUCCHI ; p: 217-225.
9. BELAICHE P. ; 1979 ; Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie ; Ed: MALOINE ; p: 18- 35.
10. BENHAMMOU N. et al; 2009; Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*; R.C.CHIMIE (12); Ed: ELSEVIER; p: 1259-1266.
11. BHAT S.V., NAGASAMPIGI B.A. et SIVAKUMAR M.; 2005; Chemistry of Natural Products; Ed 1: NAROSA, SPRINGER; p: 115-252.
12. BILDERBACK L.; 2007; Spices and Herbs; Ed: ALPHA BOOKS; P: 177-178.
13. BONNEFONT-ROUSSELOT D. et al ; 2003 ; Radicaux libres et antioxydants ; Ed: MEDICINE-SCIENCES. FLAMMARION (PARIS) ; p: 59-81.

14. BONNIER G.; 1999; La Grande Flore en Couleur; Ed : BELIN; Tome 3; p:205 - 206.
15. BOURGAUD F., GRAVOT A., MILESI S., et GONTIER E.; 2001; Production of plant secondary metabolites: a historical perspective; Plant Science 161, p: 839-851.
16. BRUNETON J. ; 1987 ; Elément de phytochimie et de pharmacology; Ed: LAVOISIER ; p : 156 -160.
17. BRUNETON J. ; 1993 ; Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales ; Ed 2: TEC et DOC (Paris) ; p: 914.
18. BRUNETON J. ; 1999 ; Flavonoïdes, Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales; Ed 3: TEC et DOC (PARIS) ; p: 310-340.
19. BSSAIBIS F. et al ; 2009 ; Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* L. ; Rev. Microbiol. Ind. San et Environn 3(1) ; p: 44-55.
20. BURGA L.N.; 2005; Methyltransferases from *Ruta graveolens* L.: molecular Biology and Biotechnology; Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften; Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg; p: 1-28.

-C-

21. CADENAS E. et PACKER L.; 2002; Handbook of Antioxidants; Ed 2: MARCEL DEKKER (NEW YORK); p: 165-187.
22. CAPASSO F. et al; 2003; Phytotherapy: A Quick Reference to Herbal Medicine; Ed: SPRINGER-VERLAG BERLIN HEIDELBERG; p: 31- 40.
23. CHASSAING V. ; 2006 ; L'Aromathérapie: les huiles essentielles au service du cheval; Ed: VIOLAINE CHASSAING ; p: 4- 8.
24. CHIU K.W. et FUNGA Y.; 1997; The cardiovascular effects of green beans (*Phaseolus aureus*), common rue (*Ruta graveolens*) and kelp (*Laminaria japonica*) in rats. Gen Pharmacol 29; p: 859-862.
25. CLARKE S.; 2008; Essential oils; Ed 2: CHURCHILL LIVINGSTONE, ELSEVIER; p: 42- 77.
26. COOPER R.; 1997; Age-Reversing Free Radical Fighters: Antioxidants; Ed: WOODLAND; p: 4-11.
27. CROZIER A., CLIFFORD M.N. et ASHIHARA H., Plant Secondary Metabolites; Ed: Oxford BLACKWELL; p: 1-24, 102-105.
28. CSEKE L. J., KIRAKOSYAN A. et al; 2006; Natural Products From Plants; Ed2 : TAYLOR & FRANCIS ,CRC Press; p: 22- 25.
29. CU J.Q., ZIOUANI H., MARTEL J.P. et PERINEAU F. ; 1999 ; Production d'huile essentielle de Badiane de Chine par turbo-distillateur ; Parfums, Cosmétiques, Arômes 93 ; p: 67-74.

-D-

30. DAAYF F. et LATTANZID V.; 2008; Recent Advances in Poly phenol Research 1; Ed: WILEY-BLACKWELL; p:1- 24.
31. DANIEL M.; 2006; Medicinal Plants: chemistry and properties; Ed: SCIENCE PUBLISHERS; p: 59-77.
32. DE FEO V., DE SIMONE F. et SENATORE F.; 2002; Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*; Phyto-chemistry 61; Ed: PERGAMON PRESS; p: 573-578.
33. DEL CASTILLO J.B., RODRIGUEZ L.F. et SECUNDINO M.; 1984; Angustifolin: a coumarin from *Ruta angustifolia*; Phytochemistry 23 (9); Ed: PERGAMON PRESS, Great Britain; p: 2095-2096.
34. DESCEEMAEKER K. ; 2004 ; Nutri- & Phytothérapie: développements récents ; Ed: GARANT ; p: 41-51.
35. DEWICK P.M.; 2002; Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach; Ed 2: JOHN WILEY & SONS; p: 291- 398.
36. DIALLO A. ; 2005 ; Etude de la phytochimie et des activités biologique de *Syzygium guineense* ; Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université BAMAKO, MALI ; p: 38-47.
37. DI CARLO G., MASCOLO N., IZZO A.A. et CAPASSO F.; 1999; Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs; Review Life Science 65; p: 337-353.
38. DJERIDANE A. et al; 2006; Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds; Food Chemistry 97; Ed: ELSEVIER; p: 654-660.
39. DODT K. C.; 1996; The Essential Oils Book (Creating Personnel Blends For Mind and Body); Ed: STOREY BOOKS; p: 21 - 52.
40. DOERPER S.; 2008 ; Modification de la synthèse des furo-Coumarines chez *Ruta graveolens L.* par une approche de génie métabolique ; Thèse de Nancy – Université, INRA ; p : 12 - 34.
41. DOHOU N. et al; 2003 ; Screening Phytochimique d'une Endémique IBÉRO-MAROCAINE : *Thymelaea lythroides*; Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 142; p: 61 -78.
42. DRAGAN T.V. et al; 2007; Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis L.*) and glutinous (*Salvia glutinosa L.*) sage by ultrasonic and classical maceration; J. SERB. CHEM. SOC 72 (1); p: 73-80.
43. DRAMANE S. et al ; 2010 ; Evaluation des activités antimicrobiennes et antiradicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte d'Ivoire ; Euro Journal of Scientific Research 40 (2) ; p: 307-317.
44. DUKE A.J., DUKE P.A.K. et DUCHELLIE J.L. ; 2008 ; DUKE'S HANDBOOK of Medicinal Plants of the Bible, Ed: CRC PRESS; p: 394 – 397.

-E-

45. EMEA (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products); 1999; Committee for Veterinary Medicinal Products: *Ruta graveolens*; EMEA 98 (542); p: 1- 4.
46. Encyclopédie ENCARTA 2009.

-F-

47. FLEMING T. et *al*; 2000; PDR for Herbal Medicines; Ed: MEDICAL ECONOMICS COMPANY; p: 648-649.
48. FOSTER S. et TYLER V.E.; 1999; A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies; Ed 4: Tyler's honest herbal, HAWORTH HERBAL PRESS; p: 325-326.

-G-

49. GARETH T.; 2007; Medicinal Chemistry: An Introduction; Ed 2: JOHN WILEY & SONS; p: 177-195.
50. GROSJEAN N. ; 2004 ; Huiles Essentielles: se soigner par l'aromathérapie ; Ed: EYROLLES PRATIQUES ; p: 15-31.
51. GROTEWOLD E.; 2006; The Science of Flavonoids; Ed: SPRINGER; p: 47- 90.
52. GÜLÇİN I. et *al*; 2010; Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid, Arabian Journal of Chemistry 3; Ed: ELSEVIER; p: 43-53.
53. GUTIERREZ – PAJ ARES L. J. , ZUNIGA L. et PINO J.; 2003; *Ruta graveolens* aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development; Reproductive Toxicology 17; Ed: ELSEVIER , p: 667 – 672 .

-H-

54. HARBORNE J.B.; 1998; Phytochemical Methods: A guide to moderne techniques of plant analysis; Ed 3: CHAPMAN & HALL; p: 202-209.
55. HEIGNEN C.G.M., HAENON G.R.M.M., VEKEMANS J.A.J.M. et BAST A.; 2001; Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure activity relationship; Environ. Toxicol. Pharmacol 10; p: 199-206.
56. HEIM K.E., TAGLIAFERRO A.R., et BOBILYA D.J.; 2002; Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationship; Journal. Nutr. Biochem. 13; p: 572-584.
57. HELDT H.W.; 2005; Plant Biochemistry; Ed 3: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; p: 403- 411.
58. HESSE M.; 2002; ALKALOIDS: Nature's Curse of Blessing? ; Ed: WILEY-VCH; p: 1-12.

59. HIGLEY C. et HIGLEY A.; 2005; Reference Guide for Essential Oils; Ed 9: ABUNDANT HEALTH; p: 6-10.
60. HNATYSZYN O., ARENAS P., MORENO A.R., RONDINA, R. et COUSSIO J.D.; 1974; Plantas reguladoras de la fecundidad segun la medicina folklórica; Revista de la Sociedad Cientifica 14; p: 37.
61. HOUGHTON P.J. et RAMAN A.; 1998; Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts; Ed: CHAPMAN & HALL, New York; p: 208.
62. HÜSNÜ CAN BAŞER K. et BUCHBAUER G.; 2010; Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Application; Ed: CRC PRESS, TAYLOR & FRANCIS; p: 121-180, 235-580.

-I-

63. ISERIN P. et *al* ; 2001 ; Encyclopédie des plantes médicinales ; Ed 2 : LAROUSSE ; p : 1-14.
64. IVANOVA A. et *al*; 2004; Volatile components of Rutaceae species; Verlag Der Zeitschrift Für Naturforschung 59; p: 169-173.
65. IVANOVA A. et *al*; 2005; Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*; Fitoterapia 76; Ed: ELSEVIER; p: 344-347.

-J-

66. JUDD W.S., CAMPBELL C.S., KELLOGG E.A. et STEVENS P.; 2002; Botanique Systématique: une perspective phylogénétique; Ed 1: DEBOECK; p: 84-336.
67. JADOT G. ; 1994 ; Antioxydants et Vieillessement ; Ed: JOHN LIBBEY EUROTTEXT PARIS ; p: 33-36.
68. JUDITH M.D. ; 2005 ; Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* utilisé dans le traitement des dermatoses au TCHAD ; Thèse de doctorat en pharmacie de l'Université de BAMAKO, MALI ; p: 57- 64.

-K-

69. KAR A.; 2007; Pharmacognosy and Pharmabiotechnologie; Ed 2: NEW AGE INTERNATIONAL PUBLISHERS; p: 1-30.
70. KEVILLE K. et GREEN M.; 1995; Aromatherapy: A complete guide to healing art, Ed 1: THE CROSSING PRESS; p: 120-140.
71. KOHEN R. et NYSKA A.; 2002; Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants redox reactions and methods for their quantification; Toxicologic Pathology 30; p: 620-650.
72. KONG Y., LAU C.P., WAT K.H. et *al*; 1989; Antifertility principale of *Ruta graveolens*; Planta Med 176; p: 8.

-L-

73. LADANIYA M.; 2008; Citrus Fruit: biology, technology and evaluation; Ed 1: ACADEMIC PRESS, ELSEVIER; p: 157-165.
74. LAGUNEZ RIVERA L. ; 2006 ; Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe ; Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de TOULOUSE ; p: 31-42.
75. LAHLOU M.; 2004; Methods of Study the Phytochemistry and Bioactivity of Essential oils; Phytotherapy Research 18; WILEY & SONS; p: 435- 448.
76. LARDRY J. M. ; 2007 ; Les Huiles Essentielles: Introduction à l'Aromathérapie ; Kinesitherapy Reviews 61 ; p: 35-42.
77. LARDRY J.M. et HABERKORN V. ; 2007 ; Les Huiles Essentielles : principes d'utilisation ; Kinesitherapy Reviews 61 ; p: 18-23.
78. LAUK L. ; 2000 ; Antimycotic activity of *Ruta chalepensis* L. ; Etudes Chimiques et Pharmacologiques ; Des Sources du Savoir aux Médicaments du Futur ; p : 436-439.
79. LECERF J.M. et RAGOT B. ; 2006 ; Mieux nourrir mon enfant ; Ed: ATELIER ET OUVRIÈRES ; p: 124-125.
80. LEE Y. et al; 1995; Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars; Journal of Food Science 60 (3); p: 473-476.
81. LEHUCHER-MICHEL M.P. et al ; 2001 ; Stress Oxydant et Pathologies Humaines ; La Presse Médicale 30 ; p: 1076-1081.
82. LE MOINE E. ; 2001 ; Les Plantes : Aromatiques et Médicinales; Ed : MOLIERE (Paris); p : 92.
83. LI H.B., CHENG K.W., WONG C.C., FAN K.W. CHEN, F. et JIANG Y.; 2007; Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae; Food chemistry 102; p: 771-776.
84. LUCCHESI M.E. ; 2005 ; Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-Ondes: Conception et Application à l'Extraction des Huiles Essentielles ; Thèse de Doctorat en Science ; Université de la REUNION ; p: 14-23.

-M-

85. MADHAVI D.L. et al; 1996; Food antioxidants; Ed: CRC PRESS; p: 361- 460.
86. MAKKAR H.P.S., SIDDHURAJU P. et BECKER K.; 2007; Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology 393; Ed: HUMANA PRESS; p: 67-111.

87. MALECKY M. ; 2008 ; Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins ; Thèse de Doctorat de l'Institut des Sciences et Industries de Vivant et de l'Environnement (Agro. Paris. Tech), INRA ; p: 27-35.
88. MANSOUR EL SAID S. et al; 1990; Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditonal medicine; Journal of Ethnopharmacology 28; Ed: ELSEVIER SCIENTIFIC; p: 305-3012.
89. MANSOURI A., EMBAREK G., KOKKALOU E. et KEFALAS P.; 2005; Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*); Food Chemistry 89; p: 411-420.
90. MARTINEZ M.A. et al ; 2005 ; Flavonoïdes ; Ed: MEDELLIN ; p: 7- 21.
91. MEJRI J., ABDERRABBA M. et MEJRI M.; 2010; Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L.: Influence of drying, hydrodistillation duration and plant parts; Industrial Crops and Products 32, Ed: ELSEVIER; p: 671- 673.
92. MERAD CHIALI R. ; 1973 ; Contribution à la Connaissance de la Pharmacopée Traditionnelle Algérienne ; Thèse de Doctorat d'état en Pharmacie ; Institut Des Sciences Médicales ; p: 101- 370.
93. MERGHACHE S., HAMZA M . et TABTI B. ; 2009 ; Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. de Tlemcen, Algérie ; Afrique Science 5 (1) ; p : 67- 81.
94. MILBURY P. E. et RICHER A. C.; 2008; Understanding the Antioxidant Controversy; Ed: PRAEGER; p: 81-100.
95. MILESI S. MASSOT B., GONTIER E., BOURGAUD F. et GUCKERT A.; 2001, *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins; Plant Science 161; p: 189- 199.
96. MIOULANE P. ; 2004 ; Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins ; Larousse ; Ed : PROTEA ; p : 7-50.
97. MOHR N. et al; 1982; Further Alkaloids from *Ruta chalepensis*; Phytochemistry 21 (7); PERGAMON PRESS, Great Britain; p: 1838-1839.
98. MORO BURONZO A.; 2008; Le Grand Guide des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être; Ed : HACHETTE PRATIQUE; p: 14- 43.

-N-

99. National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1990; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; NCCLS; Villanova.

-O-

100. OLIVA A et al; 2003; Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including an quinolone alkaloid; Journal of Agricultural and Food Chemistry 51; p: 890- 896.

101. OSBOURN A.E. et LANZOTTI V.; 2009; Plant- derived Natural Products: Synthesis, Function and Application; Ed: SPRINGER; p: 3- 44.

-P-

102. PACKERC L., HIRAMATSU M. et YOSHIKAWA T.; 1999; Antioxidants Food Supplements in Human Health; Ed: ACADEMIC PRESS; p: 35- 41.

103. PANGLOSSI H.V.; 2006; Antioxidants: new research; Ed: NOVA; p: 3-13.

104. PASSWATER R.A.; 1997; The Antioxidants; Ed: KEATS GOOD HEALTH GUIDE; p: 7-11.

105. PÉNOËL D.; 1999; Aromatherapy: for health professionals; Ed 2: CHURCHILL LIVINGSTONE, ELSEVIER; p: 8-33.

106. PEYRON L. et RICHARD H. ; 1992 ; L'extraction des épices et herbes aromatiques et les différents types d'extraits ; Epices et Aromates ; Ed: TEC et DOC-LAVOISIER, APRIA, PARIS ; p: 75-80.

107. PIBIRI M.C. ; 2005 ; Assainissement microbiologiques de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles ; Thèse de Doctorat de la Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit LAUSANNE ; p: 28-42.

108. PIQUET M. A. et HÉBUTERNE X. ; 2007 ; Nutrition en pathologie digestive ; Ed : DOIN ; p: 16-20.

109. PITMAN V.; 2004; Aromatherapy: A Pratical Approach; Ed: NELSON THORNES; p: 1- 137.

110. POLLIO A. et *al*; 2008; Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta spp.* (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices; Journal of Ethnopharmacology 116; p: 469–482

111. PORTET B. ; 2007 ; Recherche Bioguidée de Molécules Antipaludiques d'une Plante Guyanaise: Piper hostmannianum var. berbicense ; Thèse de Doctorat de l'Université de Toulouse; p:16- 27.

112. PRABUSEENIVASAN S., JAYAKUMAR M. et IGNACIMUTHU S.; 2006; In vitro antibacterial activity of some plant essential oils; BMC complement. Altern. Med. 6 (39).

113. PRAKASH D., UPADHYAY G., BRAHMA N. et SINGH H.B.; 2007; Singh antioxidant and free radicalscavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean; Food Chemistry 104; p: 783-790.

114. PRATT D.E. et HUDSON B.J.F.; 1990; Natural antioxidants not exploited commercially in Food Antioxidants; Ed: ELSEVIER APPLIED SCIENCE, London; p: 171–192.

-R-

115. RAFFAUF R. F.; 1996; Plant Alkaloids: A Guide to their Discovery and Ditribution; Ed: FOOD PRODUCTS PRESS; p: 189- 190.

116. RATHEESH M., SHYNI G.L., SINDHU G. et HELEN A.; 2010; Inhibitory effect of *Ruta graveolens L.* on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats; *Experimental and Toxicologic Pathology* 7; p: 1-6.
117. RICE-EVANS C. A. et PACKER L.; 1998; *Flavonoids in Health and Disease*; Ed: MARCEL DEKKER; p: 61- 160.
118. ROBERTS M. F. et WINK M.; 1998; *ALKALOIDS: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*; Ed: PLENUM PRESS; p: 1- 6.

-S-

119. 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; p: 121-137.
120. SCHAUBENBERG p. et PARIS F. ; 1977 ; *Guide des plantes médicinales* ; Ed3 : DELECHAUX & NIESTLE ; p : 106-119.
121. SCHILLER C. et SCHILLER D.; 1994; *500 Formulas for Aromatherapy (Mixing Essential Oils for Every Use)*; Ed: STERLING PUBLISHING; p: 11-22.
122. SCIMECA D. ; 2006 ; *Les Plantes du Bonheur* ; Ed: ALPEN ; p: 10-17.
123. SHAHIDI F.; 1997; *Natural Antioxidants: chemistry, health effects and applications*; Ed: AOCS MISSION STATEMENT; p: 174-197.
124. SHAHIDI F. et NACZK M.; 2004; Extraction and analysis of phenolics in food; *Journal of Chromatography A* 1054; Ed: ELSEVIER; p: 95-111.
125. SHIGEHARU I., TOSHIO T. et HIDEYO Y.; 2001; Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47; p: 565-573.
126. SKARIA B.P. et *al*; 2007; *Aromatic Plants*; Ed: NEW INDIA PUBLISHING AGENCY; p: 37-43.
127. SMIRNOFF N.; 2005; *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*; Ed 1: BLACKWELL; p: 141-210.
128. SMYTHIES J.R.; 1998; *Every Person's Guide to Antioxidants*; Ed: BRITISH CATALOGING; p: 89-110.
129. SNYDER M. et LINDQUIST R.; 2010; *Complementary and Alternative Therapies in Nursing*; Ed 6: SPRINGER; p: 397-439.
130. SVOBODA K. et SVOBODA T.; 2000; *Secretory structures of aromatic and medicinal plants*; Ed: MICROSCOPIX PUBLICATIONS; p: 7-12.

-T-

131. TAKHTAJAN A.; 2009; Flowering Plants; Ed 2: SPRINGER; p: 33 - 41, 375.
132. TIMBO B. ; 2003 ; Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* ; Thèse Doctorat en Pharmacie, Université BAMAKO, MALI ; p: 47-53.
133. TORRES R. et *al*; 2006; Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudates of *Haplopappus multifolius*; Phytochemistry 67; Ed: ELSEVIER; p: 984-987.
134. TRINGALI C.; 2001; Bioactive Compounds from Natural Sources: Isolation Characterisation and Biological Properties; Ed1: TAYLOR & FRANCIS; p: 1- 24, 339- 367.
135. TRIVALLE C. ; 2002 ; G rontologie pr ventive:  l ment de prévention du vieillissement pathologique ; Ed : MASSON (PARIS) ; p: 104-106.

-U-

136. ULUBELEN A. et TEREM B.; 1988; Alkaloids and Coumarins from roots of *Ruta chalepensis*; Pergamon Journals, Phytochemistry 27 (2); p: 650-651.
137. URI N.; 1961; Mechanism of antioxidation; Ed: SCIENCE PUBLISHERS, New York; p: 133-169.

-V-

138. VAN ACKER S., VAN DEN BERG D., TROMP M., GRIFFIOEN D., VAN BENNEKOM W., VAN DER VIJGH W. et BAST A.; 1996; Structural Aspect of Antioxidant Activity of Flavonoids; Free. Rad. Biol. Med. 20; p: 331-342.
139. VERMERRIS W. et NICHOLSON R.; 2006; Phenolic compound chemistry; Ed: SPRINGER; p: 1-70.
140. VERPOORTE R. et ALFERMANN A.W.; 2000; Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism; Ed: KLUWER ACADEMIC; p: 1- 23.

-W-

141. WALSH G.; 2003; Biopharmaceuticals: Biochemistry and Biotechnology; Ed2: WILEY & SONS; p: 23- 40.
142. WALTON N.J. et BROWN D.E.; 1999; Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products; Ed: WORLD SCIENTIFIC; p: 1-14.
143. WATERMAN P. G.; 1975; Alkaloids of the Rutaceae: their distribution and Systematic Significance, Biochemical Systematics and Ecology 3; Ed: PERGAMON PRESS; p: 149-180.
144. WERNER M. ; 2002 ; Les Huiles Essentielles: r veil du corps et de l'esprit ; Ed : VIGOT, Collection Santé Bien- Etre ; p: 60-95.

145. WIART C.; 2006; Medicinal Plants of the Asia – Pacific: Drugs for the future?; Ed: WORLD SCIENTIFIC ; p: 401 - 416.
146. WILSON R.; 2002; Aromatherapy: Essential oils for Vibrant Health and Beauty; Ed: PENGUIN PUTNAM; p: 1- 24.
147. WINK M.; 2010; Biochemistry of Plant Secondary Metabolism; Annual Plant Reviews 40; Ed: WILEY-BLACKWELL, p: 1-23.
148. WONG S. P., LEONG L. P. et KOH J.H.W.; 2006; Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants; Food Chemistry 99; p: 775–783.
149. WORWOOD S.E.; 1995; Essential Aromatherapy: A pocket guide to essential oils and aromatherapy; Ed: NEW WORLD LIBRARY; p: 1-30.

-Y-

150. YILDIRIM A., MAVI A. et KARA A. A.; 2001; Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L.* extracts; Journal of Agricultural and Food Chemistry 49; p: 411-420.

-Z-

151. ZHIRI A. ; 2006 ; Aromathérapie ; Nutranews ; Ed: FONDATION LIBRE CHOIX ; p: 2-16.

ANNEXES

Annexe n°1 : Huile essentielle

Electronégative, relaxation

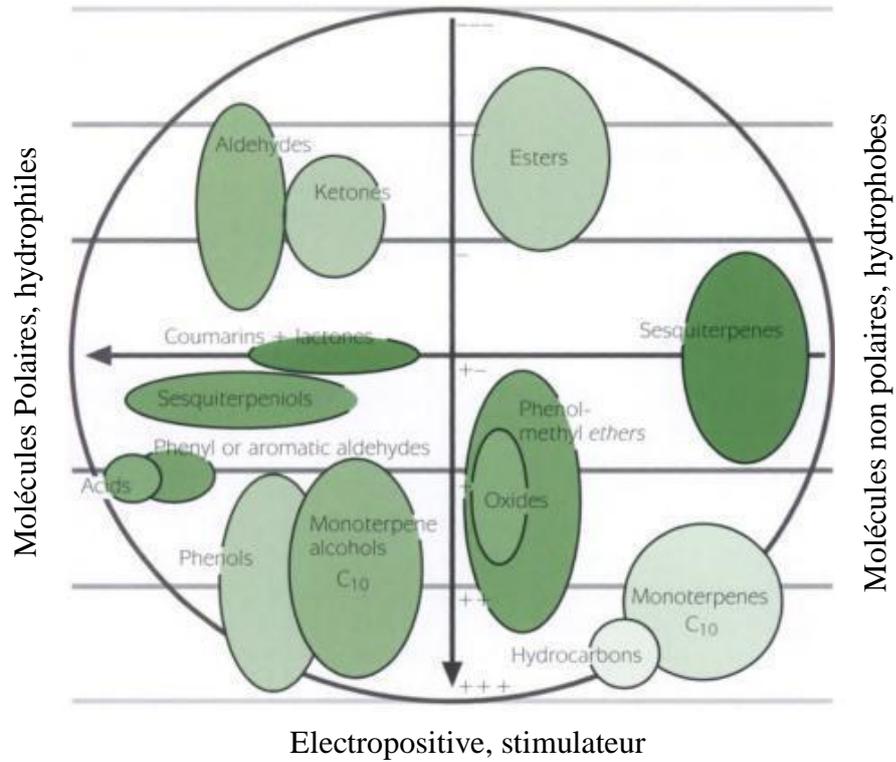


Figure n° 44: Biogramme aromatique (PITMAN, 2004)

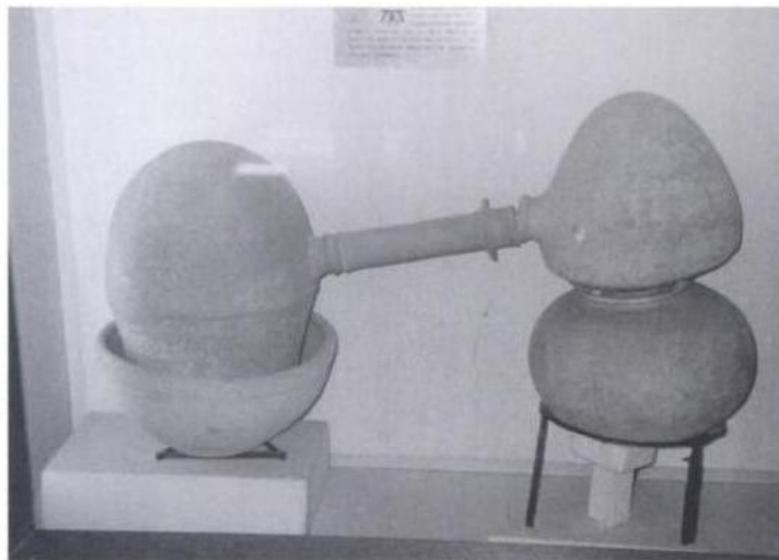


Figure n° 45: Distillateur de l'ère moyenne (PITMAN, 2004).

Tableau n° 19: Classification biochimique des huiles essentielles
(PRABUSEENIVASAN *et al.*, 2006 ; SHIGEHARU *et al.*, 2001 ; CHASSAING; 2006 ;
KEVILLE *et* GREEN, 1995 ; CLARKE, 2008 ; HIGLEY, 2005).

Groupe	Exemples	Propriétés
Les hydrocarbures mono terpéniques	Noms des composants dont le suffixe est en ène : α thuyène, Camphène, Cymène et ses isomères, Limonène, Ocimène, Pinène et ses isomères, Terpinène et ses isomères, Terpinolène.	<ul style="list-style-type: none"> • A utiliser avec précaution car elles peuvent devenir dermocaustiques ; • Antalgique en usage percutané ; • Antiseptique atmosphérique : à utiliser en diffusion et relativement agressives pour les muqueuses ; • Microbicide par contact.
Les hydrocarbures sesquiterpéniques	Aromadendrène, Bisabolène, Cadinène et ses isomères, Calamène, Cédrene et ses isomères, Chamazulène, Curcumène, Zingibérène	<ul style="list-style-type: none"> • Généralement ces huiles sont colorées, elles donnent une couleur vert sombre ou bleue ; • Anti inflammatoire ; • Calmant ; • Légèrement hypotenseurs.
Les phénols	Australol, Carvacrol, Chavicol, Eugenol, Gaiacol, Thymol.	<ul style="list-style-type: none"> • Déséquilibrant à haute dose • Leur emploi exige une association d'une huile végétale (pour éviter leur toxicité et faciliter leur digestion) ; • L'usage d'huile essentielle à phénol doit être associé à l'absorption d'autres huiles essentielles régulatrices et décongestionnantes de la sphère hépatobiliaire afin de faciliter leur assimilation ; • Anti-infectieux puissant (bactéricide, virucide, parasitocides) ; • Dermocaustique ; • Excitant à dose élevée ; • Hépatotoxiques à doses fortes et répétées (leur emploi devrait être restreint) ; • Hypertenseur ; Hyperthermisant ; • Immunostimulant ; • Irritant pour les muqueuses (utile dans les congestions ORL) ; • Tonique à faible dose
Les alcools mono terpéniques	Bornéol, Carvéol, Citronnellol, Géraniol, Lavandulol, Linalol, Menthol, Myrténol, Nérol, Pinacarvéol, Sabinol, Terpinéol et ses isomères, Thuyanol.	<ul style="list-style-type: none"> • Anti infectieux (bactéricide, virucide, fongicides) ; • Excellent immunostimulant ; • Faiblement hyperthermisant et hypertenseur ; • Neurotonique (dose élevée) ; • Tonique général ; • Hémolytiques à fortes doses.
Les alcools sesquiterpéniques	Bisabolol et ses isomères, Cadinol et ses isomères, Carotol, Cédrol, Daucol Farnésol, Santalol,	<ul style="list-style-type: none"> • Faiblement anti infectieux ; • Immunostimulants ; • Non toxiques ; • Stimulants généraux ; • Toniques.

Les alcools diterpéniques	Diol, Manool, Salviol, Scalérol.	<ul style="list-style-type: none"> • Régulatrices hormonales ; • Faiblement volatiles.
Les aldéhydes	<u>Chémotypes dont les noms se terminent par al :</u> Citral et ses isomères, Citronnellal, Farsénal, Myrténal, Phellandral.	<ul style="list-style-type: none"> • Agissent favorablement sur le système nerveux ; • Anti inflammatoires ; • Hypotenseur ; • Hypothermisant.
Les cétones	Artémisia cétone, Atlantone, Bornéone = camphre, Carvone, Cryptone Menthonone, Pinocamphone, Pinocarvone, Pulégone, Thuyone, Verbénone, Vétivone, Vulgarone et ses dérivés.	<ul style="list-style-type: none"> • Leurs ventes sont réservées aux pharmaciens ; • Faible dose : calmante, sédatif, hypothermisant ; • Forte dose : neurotoxique, stupéfiante, épileptisantes, abortive (les thuyones : sauge...) ; • Mucolytique; Lipolytique ; • Anticoagulant tout en activant le processus de cicatrisation ; • Vermifuge ; Antimycosique.
Les diones	Dicétone, Diméthyl, Méthyl, Tetraméthyl, Triméthyl et leurs dérivés.	<ul style="list-style-type: none"> • Antispasmodiques ; • Anticoagulants.
Les Acides	Acides : Angélique, Anisique, Campholénique, Cinnamique, Citronnellique Gérannique, Myrténique, Phtalique, Pinonique, Rosmarinique, Salicylique.	<ul style="list-style-type: none"> • Anti inflammatoire puissant ; • Diurétique ; • Hypotenseur ; • Hypothermisant.
Les esters	Différents acétates, benzoates, salicylates des chémotypes des huiles essentielles	<ul style="list-style-type: none"> • Antispasmodique ; • Calmant ; • Tonique ; • Rééquilibrant nerveux ; • Décongestionnant cutané en cas de manifestations inflammatoires
Les éthers	Apiol, Asarone, Elémicine, Les différents méthyls et trans des chémotypes des huiles essentielles, Myristicine, Safrol.	<ul style="list-style-type: none"> • Spasmodique puissant ; • Calmant : Sédatif (puissant), Décontractant ; • Antidépresseurs psychique (excellent rééquilibrant nerveux) ; • L'apiol et la myristicine : éthers oxydes : utéro-toniques, spasmodiques et toxiques à dose élevée (abortif, hépato toxique).
Les oxydes	1.4 Cinéol, 1.8 cinéol = eucalyptol, Ascaridol, Différents oxydes des chémotypes des huiles essentielles.	<ul style="list-style-type: none"> • Décongestionnant à tropisme broncho pulmonaire ; • Mucolytique ; • Expectorant ; • Action hormonale (oxyde de sesquiterpénols et diterpénols).
Les coumarines	Angélicine, Auraptène, Bergamottine, Bergaptène, Bergaptol, Byakangélicine Célérine, Citroptène, Umbelliférone.	<ul style="list-style-type: none"> • Sédatif nerveux ; Anticonvulsif ; Hypothermisant ; Hypotensif ; • Excellent anticoagulant ; • Les furocoumarines ne doivent pas être

		<p>utilisées sur la peau avant l'exposition au soleil car elles sont photosensibilisantes ;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les pyranocoumarines sont hépatotoxiques.
Les lactones	Différents lactones des chémotypes des huiles essentielles, Héléline ou isoalantolactone, Santonine ou santolactone.	<ul style="list-style-type: none"> • Les lactones agissent en profondeur du terrain du patient et certaines sont allergènes par voie cutanée ; • Mucolytiques ; Expectorant.
Les phthalides (ou phthalides)	Sédanolide, Ligustilide, sédanénolide	<ul style="list-style-type: none"> • Draineur des émonctoires : foie, rein, intestins ; Détoxiquant.
Les composés à nombre de carbone inférieur à 10	Alcool benzylique, Haxanol, Isoamylol, Octanone, Nonanone, Angélate d'isobutyle, Vanilline, Octanal, Haxanal, Nonanal, Aldéhyde isovalérianique.	<ul style="list-style-type: none"> • Se trouvent dans les hydrolats et en faible quantité dans les huiles essentielles (sauf les hydrocarbures) ; • Leurs propriétés respectives sont celles dues à leurs fonctions biochimiques ci – haut indiquées.
Les composés soufrés	diallyl disulfide, diallyl trisulfide, allylpropyl disulfide, méthylpropyl trisulfide, thiobenzoate de s-méthyle.	<ul style="list-style-type: none"> • Odeur très forte, pour cela leur prescription est délaissée ; • Dermocaustiques (usage externe) • Révulsives (en usage externe) • Irritant (en usage externe) ; • Antibactériens ; • Anti parasitaires ; • Usage dans les affections respiratoires
Les composés azotés	anthranilate de méthyle et ses dérivés, cyanide et ses dérivés, indole.	<ul style="list-style-type: none"> • Calmante sur le système nerveux
Les composés bifonctionnels (soufre + azote)	isothiocyanate d'allyle, isothiocyanate d'éthyle	<ul style="list-style-type: none"> • Toxique ; • Neurotoxiques ; • Dermocaustique.

Annexe n°2 : Réactions de caractérisation positive



Photo n° 3: Réaction de cyanidine positive.



Photo n° 4: Réaction de WAGNER et MAYER positive.



Photo n° 5: Réaction de Stiasny positive pour les tanins catéchiques.



Photo n° 6: Réaction de Lieberman-Burchard positive.

Annexe n°3 : Quelques Matériels de laboratoire



Photo n° 7: Spectrophotomètre



Photo n° 8: Rotavapeur



Photo n° 9: Centrifugeuse



Photo n° 10: Balance analytique



Photo n° 11: Etuve

Annexe n°4 : Activité antimicrobienne

NB : S1 : Station 1 (Ain Tolba)

S2 : Station 2 (Sidi Safi)

S3 : Station 3 (Beni Rhanane)

S4 : Station 4 (Sidi Ben Adda)

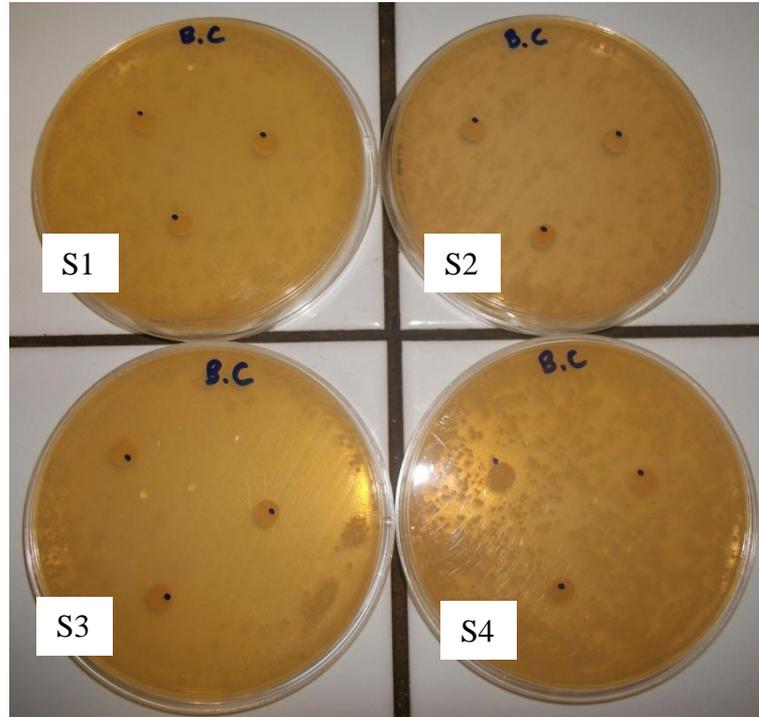


Photo n° 12: Activité huile essentielle contre *Bacillus cereus*

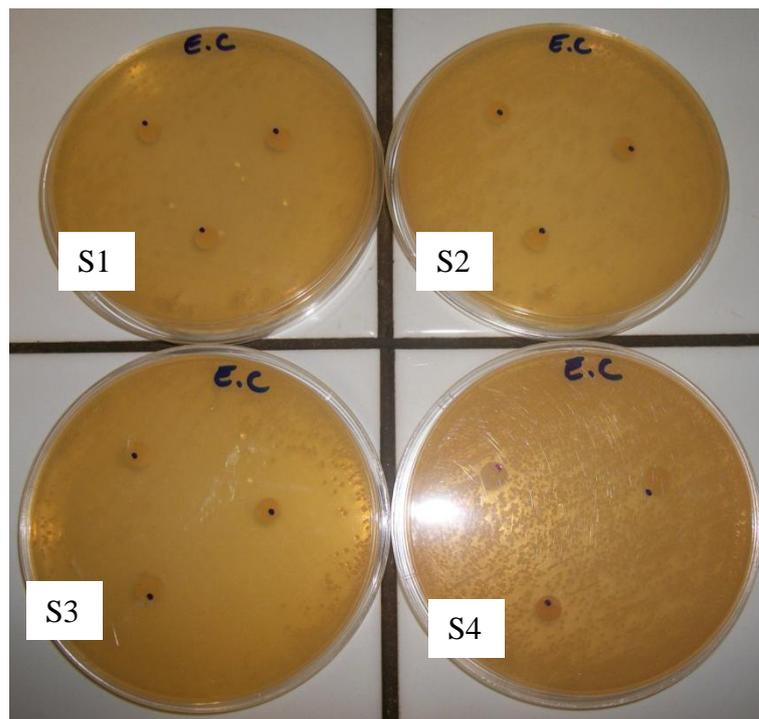


Photo n° 13: Activité huile essentielle contre *Escherichia coli*

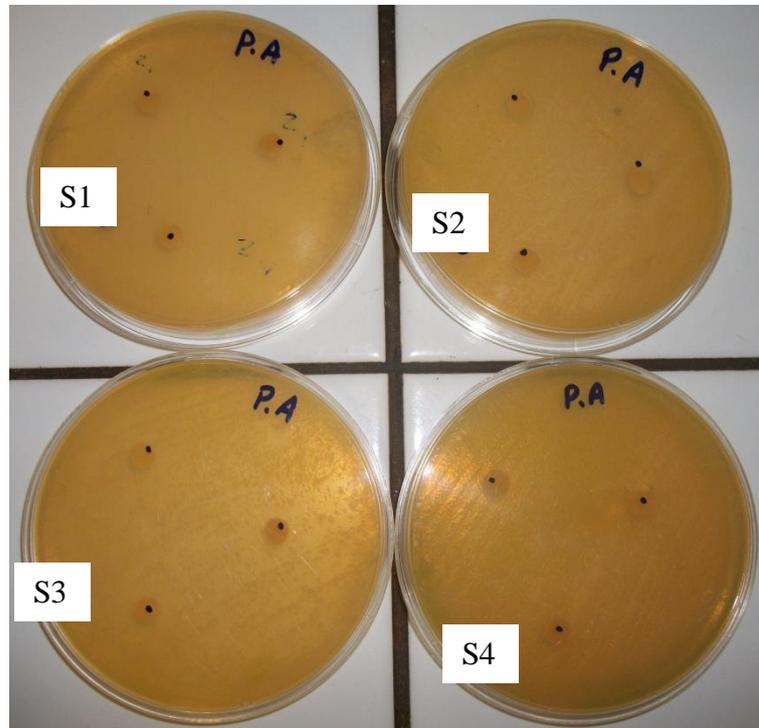


Photo n° 14: Activité huile essentielle contre *Pseudomonas aeruginosa*.

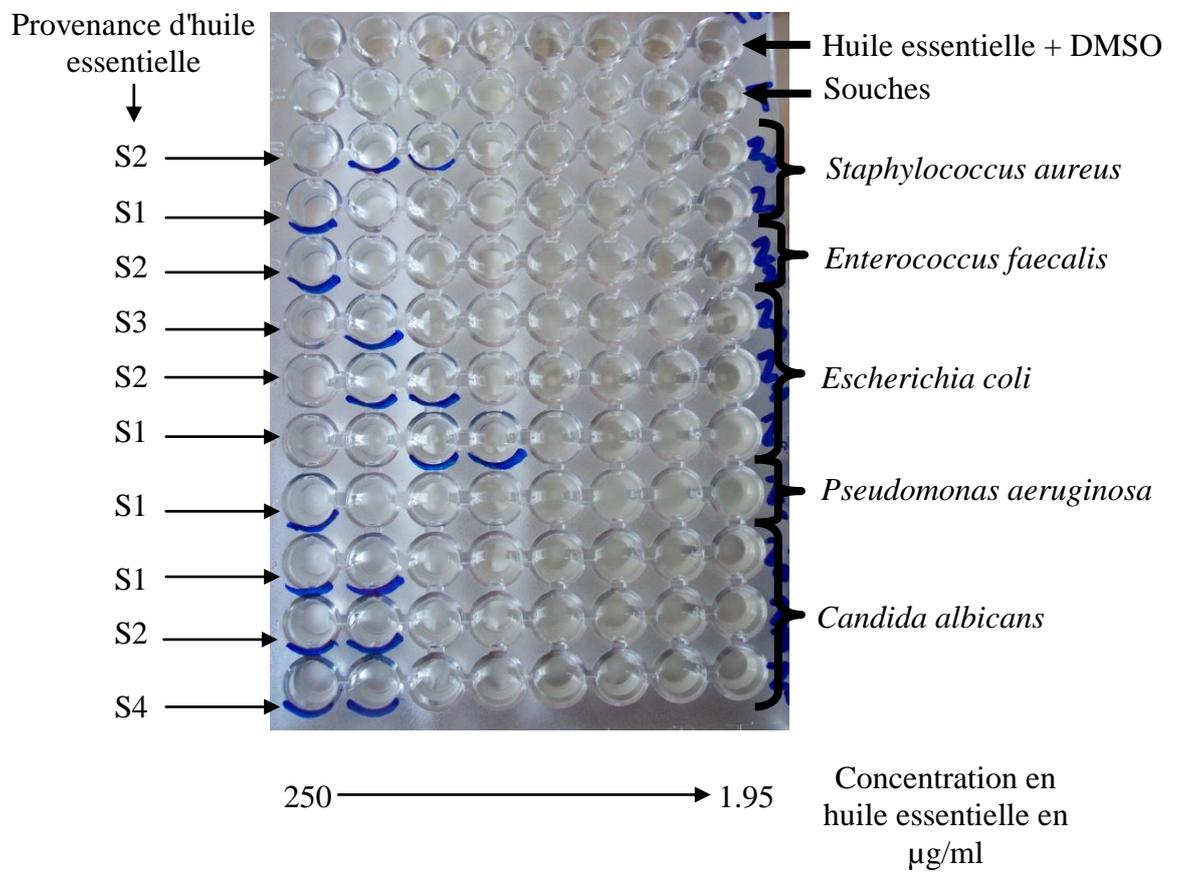


Photo n°15: Microplaque avec les CMI.

Annexe n°5: Stations d'étude



Photo n°16: Station d'Ain Tolba.



Photo n°17: Station de Sidi Safi.



Photo n°18: Station de Beni Rhanane.



Photo n°19: Station de Sidi Ben Adda.

Annexe n°6: Nos extraits



Photo n°20: Les huiles essentielles des quatre stations.

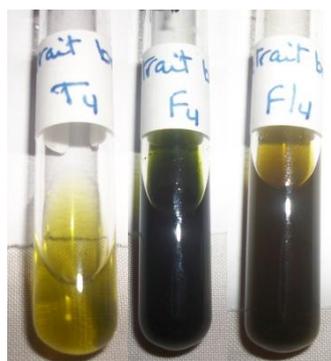


Photo n°21: Extraits bruts de tige (T), feuille (F) et fleur (Fl) de la station de Sidi Ben Adda (4).



Photo n°22: Extraits flavoniques de tige (T), feuille (F) et fleur (Fl) de la station de Sidi Safi (2).

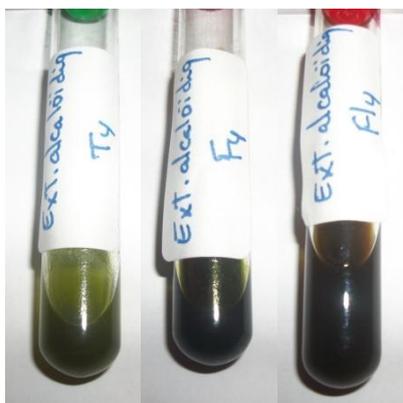


Photo n°23: Extraits alcaloïdiques de tige (T), feuille (F) et fleur (Fl) de la station de Sidi Ben Adda (4).



Photo n°24: Tous les extraits réalisés sur *Ruta chalepensis*.

Résumé

Ruta chalepensis L. est une plante aromatique, médicinale, appartenant à la famille des rutacées, appelée communément par la population locale « Fidjel ». Elle est spontanée, largement répandue en Afrique du nord, particulièrement en Algérie.

Le screening phytochimique pour les trois parties de la plante recueillie de quatre stations de la wilaya d'Ain Témouchent a mis en évidence la présence de coumarines, flavonoïdes, d'alcaloïdes, tanins et de stérols et triterpènes. L'extraction par hydrodistillation, a permis l'obtention d'huile essentielle.

Les extractions sélectives ont révélés des rendements importants comparativement parlant aux études réalisées sur la même espèce dans d'autres pays...

Les extraits bruts, flavoniques et alcaloïdiques ont montrés des pouvoirs moyens de réduction de Fer et de piégeage de radical libre DPPH. Les IC50 sont comprises entre 1 et 12 mg/ml.

Les huiles essentielles des quatre stations ont de bonnes activités antibactériennes contre *Bacillus sp*, *Escherichia sp*, *Staphylococcus sp* et même *Pseudomonas sp*.

Mots clés : *Ruta chalepensis*, métabolites secondaires, huile essentielle, pouvoir antioxydant, FRAP, piégeage du DPPH, activité antimicrobienne.

Summary

Ruta chalepensis L. is an aromatic plant belonging to the family of Rutaceae, commonly called by locals "Fidjel". It is spontaneous, largely spread in North Africa, especially Algeria, it is a medicinal plant still used in traditional medicine in many countries as a laxative, anti-inflammatory, analgesic, antispasmodic, abortifacient, antiepileptic, emmenagogue and for the treatment of skin diseases.

The phytochemical screening of the plant from four stations in the wilaya of *Ain Temouchent* revealed the presence of coumarins, flavonoids, alkaloids, tannins and sterols and triterpenes.

The preparation of crude extracts, of flavonoids and alkaloids from the three parts of the plant by specific solvents and the extraction of essential oil of the whole plant have revealed significant returns.

These extracts (crude extracts, flavonoids and alkaloids) have shown a medium powers to reduce Iron and free radical scavenging (DPPH), which means the IC50 is between 1 and 12 mg / ml. The essential oil of the four stations has a good antibacterial activity against several species including *Bacillus sp*, *Escherichia sp*, *Staphylococcus sp* and even against *Pseudomonas sp*.

Keywords: *Ruta chalepensis*, secondary metabolites, essential oil, antioxidant power, FRAP, free radical scavenging DPPH, antimicrobial activity.

ملخص

عملنا يركز على دراسة المواد الكيميائية النباتية المضادة للأكسدة و مضادات الميكروبات لنبتة السذاب في أربع محطات من ولاية عين تموشنت.

السذاب نبات عطري ينتمي إلى عائلة Rutacées ، يطلق عليه السكان المحليون اسم الفيجل أو الفيجن ، ينتشر إلى حد كبير في شمال افريقيا والجزائر خصوصا ، من النباتات الطبية العطرية التي لا تزال تستخدم في الطب التقليدي في كثير من البلدان كمسهل ، مسكن مضاد للالتهابات ، مضاد للتشنج ، مجهض ، مطمئ ولعلاج الأمراض الجلدية.

وكشف الفحص الكيميائي النباتي وجود ، كومارينات، الفلافونوات، القلويدات، التانينات، الستيروول والتربينات الثلاثية. وقد كشف استخراج المستخلص الخام، الفلافونويدات و قلويدات من الأجزاء الثلاثة للنبتة بالمذيبات و كذلك الزيوت الأساسية للجزء الهوائي للنبتة عائدات معتبرة، حيث أنها تتأثر سواء بالجزء النباتي المستعمل أو ظروف محطة الجني.

كما أظهرت هذه المستخلصات (الخام ، قلويدات و الفلافونويد) قدرة متوسطة للحد من صلاحيات الحديد والمجموعات الذرية الحرة (DPPH)، مما يعني تركيزات لصيد 50 بالمئة من الجذور الحرة متوسطة تتراوح بين 1 و 12 ملغم / مليلتر.

فيما اظهر الزيت الطيار نشاطا جيدا ضد أنواع عديدة من البكتيريا من بينها العصويات ، الاشيريشيا، الستافيلوكوك و حتى البسودومونا.

كلمات البحث : السذاب ، المواد الأيضية الثانوية، زيوت طيارة، والمجموعات الذرية الحرة، مضاد للأكسدة ، مضاد للنشاط البكتيري.