

Dédicace

27/28  
05 NOV. 2007



*Je dédie*  *ce mémoire à :*



*Mes chers parents pour leur soutien constant et leur  
patience.*

● *A tous mes frères et ma sœur "Halima" qui ma  
beaucoup encouragée.*

● *A toute ma famille.*

● *A tous mes amis et à mes collègues de laboratoire.*

● *Ainsi qu'à tous les équipes d' " OXYGENE PHARM "*



## Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses (COSNA) de la faculté des Sciences, Université de Tlemcen, sous la direction de Monsieur **B. TABTI** qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour ses conseils éclairés et encouragements tout au long de ce travail malgré ses multiples occupations.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à Madame **S. MERIAH**, Chargée de cours à l'Université de Tlemcen, qui m'a proposé ce sujet et qui par ses conseils éclairés, pour l'aide précieuse, pour le temps, la patience et qui a su être très disponible tout le long de ce travail.

Je suis très reconnaissante envers Monsieur **M. KAJIMA**, Professeur à l'Université de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury et pour ses conseils fructueux.

J'adresse aussi mes remerciements les plus sincères à Monsieur **S. GHALEM**, Professeur à l'Université de Tlemcen, qui a bien voulu juger ce travail et pour ses commentaires et ses suggestions qui ont été fort judicieux et appréciés.

Je remercie Monsieur **N. BENABADJI**, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier Monsieur **M. BENDAHOU**, Chargée de cours à l'Université de Tlemcen, pour l'aide qu'il m'a apportée pour la réalisation des tests biologiques.

Je tiens également à remercier Monsieur **D. BENDI ABDELLAH**, pour l'aide qu'il m'a apportée pour la réalisation des analyses des huiles essentielles par CPG.

Je tiens également à remercier Madame **L. CHERIF**, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour l'aide qu'elle m'a apportée dans la réalisation des calcinations à l'aide du four tubulaire.

Je tiens également à remercier Monsieur **A. CHOUKCHOU BRAHAM**, Professeur à l'Université de Tlemcen, pour l'aide qu'il m'a apportée dans la réalisation des analyses de métaux par adsorption atomique.

Mes remerciements vont à tous que j'ai croisés, à tous mes amis et à tous qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Enfin, je remercie tous les membres de ma famille pour leur soutien constant et leur patience qu'ils m'ont témoigné le long de ce travail.

## ***Abréviations & Acronymes***

<b>H.E.</b>	huile essentielle
<b>R<sup>dt</sup></b>	Rendement
<b>H %</b>	humidité
<b>d<sub>20</sub><sup>20</sup></b>	densité relative
<b>n<sub>D</sub><sup>t</sup></b>	indice de réfraction
<b>I.A.</b>	indice d'acide
<b>I.S.</b>	indice de saponification
<b>I.E.</b>	indice d'ester
<b>T<sub>R</sub></b>	temps de rétention
<b>IK</b>	indices de Kovats
<b>R<sub>f</sub></b>	facteur de rétention
<b>HCl</b>	acide chlorhydrique
<b>μ l</b>	microlitre
<b>AFNOR</b>	Association Française de Normalisation.
<b>I.S.O</b>	Internationales Standards Organisation.
<b>E.O.A</b>	Essentiel Oils Association.
<b>A.O.C.S</b>	American Oils Chemist's Society.
<b>DDT</b>	dichlorodiphényltrichloréthane.
<b>ppm</b>	partie par million ( pp/10 <sup>6</sup> )
<b>Ec.</b>	Escherichia coli
<b>Pa.</b>	Pseudomonas aeruginosa
<b>Sa.</b>	Staphylococcus aureus
<b>Lm.</b>	Listeria monocytogens
<b>Ca</b>	Candida albicans 444
<b>P.</b>	Penicillium sp.
<b>A.</b>	Alternaria sp.
<b>T.</b>	trichoderma sp.
<b>ATB</b>	antibiotiques
<b>ATF</b>	antifongique
<b>MH</b>	Muller-Hinton
<b>SM</b>	solution mère
<b>BN</b>	bouillon nutritif
<b>SAA</b>	spectromètre d'absorption atomique

*Sommaire*

**INTRODUCTION GÉNÉRALE**..... 1  
**Références Bibliographiques**..... 3

**CHAPITRE I : Plantes médicinales, aromatiques et les huiles essentielles**

**I. Plantes médicinales**..... 4  
    I.1. Introduction..... 4  
    I.2. Définition des plantes médicinales..... 4  
    I.3. Définition des plantes aromatiques..... 5  
    I.4. Principales substances curatives des plantes médicinales..... 6  
**II. Métabolites primaires et secondaires**..... 7  
    II.1. Principaux composés des métabolites primaires..... 7  
        II.1.1. Glucides ..... 7  
        II.1.2. Protéines ..... 9  
        II.1.3. Lipides..... 10  
    II.2. Principaux composés des métabolites secondaires..... 11  
        II.2.1. Flavonoïdes ..... 11  
        II.2.2. Anthocyanosides..... 14  
        II.2.3. Anthraquinones, Anthracénosides et Émodols..... 15  
        II.2.4. Tanins ..... 17  
        II.2.5. Coumarines..... 19  
        II.2.6. Saponosides..... 20  
        II.2.7. Alcaloïdes..... 22  
        II.2.8. Terpènes ..... 26  
        II.2.9. Stérols et Stéroïdes..... 29  
**III. Généralités sur les huiles essentielles**..... 32  
    III.1. Introduction et Historique..... 32  
    III.2. Définition..... 32  
    III.3. Rôle des huiles essentielles pour le règne végétal..... 33  
    III.4. Biosynthèse aromatique..... 33

III.5. Différents procédés d'obtention des huiles essentielles.....	38
III.6. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	39
III.7. Compositions chimiques des huiles essentielles .....	43
III.8. Influence des différents facteurs sur la production des huiles essentielles.....	44
III.9. Utilisation des huiles essentielles.....	46
III.10. Mode d'action des huiles essentielles .....	48
III.11. Action de la pollution sur les huiles essentielles.....	48
III.12. Pour un bon usage des huiles essentielles.....	49
III.13. Toxicité des huiles essentielles.....	50
III.14. Méthodes d'analyse des huiles essentielles.....	51
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>54</b>

**CHAPITRE II : Etude générale de *Ruta chalepensis* L.**

<b>I. Introduction .....</b>	<b>58</b>
<b>II. Rutaceae.....</b>	<b>58</b>
II.1. Définition .....	58
II.2. Caractéristiques générales.....	79
<b>III. Présentation générale de la plante.....</b>	<b>60</b>
III.1. Synonymes.....	60
III.2. Description botanique.....	60
III.3. Systématique et Classification.....	61
III.3.1. Classification.....	61
III.3.2. Caractéristiques.....	62
III.4. Habitat et distribution.....	62
III.5. Huile essentielle.....	63
III.5.1. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles .....	63
III.5.2. Composition chimique de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	63
III.7. Synthèse de l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	67
III.8. Usage de la plante.....	67
III.9. Toxicité de la plante .....	70
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>71</b>

**Chapitre III : Exploitation de *Ruta chalepensis* L.**

<b>I. Etude des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L. des différentes stations.....</b>	<b>74</b>
I.1. Introduction .....	74
I.2. Stations d'étude.....	74
I.3. Situation géographique des stations d'études.....	74
I.4. Cueillette et période de cueillette.....	77
<b>II. Examen phytochimique.....</b>	<b>77</b>
II. 1. Introduction.....	77
II. 2. Extractions et examens phytochimiques.....	78
II. 2.1. Conditions opératoires.....	78
II. 2.2. Calcul du rendement.....	79
II. 3. Résultats et interprétations.....	80
II. 4. Conclusion.....	83
<b>III. Extraction des huiles essentielles.....</b>	<b>84</b>
III. 1. Introduction.....	84
III. 2. Procédés d'extraction des H.E. et rendement.....	84
III. 2.1. Conditions opératoires.....	84
III. 2.2. Estimation de la durée optimale d'extraction.....	85
III. 2.3. Calcul du rendement $R^{dt}$ .....	87
III. 2.4. Calcul d'humidité.....	87
III. 2.5. Calcul du rendement $R^{dt'}$ .....	87
III. 3. Résultats et interprétations.....	88
III. 4. Conclusion.....	91
III. 5. Qualité de l'H.E. de <i>Ruta chalepensis</i> L. et son contrôle.....	92
III. 5. 1. Introduction.....	92
III. 5. 2. Propriétés organoleptiques.....	92
III. 5. 2. Propriétés physico-chimiques.....	93
III. 6. Conclusion.....	95
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>96</b>

**Chapitre IV : Analyse chimique des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L.**

<b>I. Analyse chimique des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L.</b> .....	98
I.1. Introduction.....	99
<b>II. Application de la chromatographie sur couche mince (CCM) à l'Analyse des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L.</b> .....	98
II.1. Introduction.....	98
II.2. Définition et appareillage.....	98
II.3. Principe.....	99
II.4. Conditions opératoires.....	99
<b>III. Application de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) à l'Analyse des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L.</b> .....	101
III.1. Introduction.....	101
III.2. Définition et appareillage.....	101
III.3. Principe.....	103
III.4. Séparation chromatographique.....	103
III.5. Conditions opératoires.....	104
<b>IV. Application de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) à l'Analyse des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L.</b> .....	105
IV.1. Introduction.....	105
IV.2. Définition et Appareillage.....	105
IV.3. Principe.....	106
IV.4. Divers modes de fragmentations.....	110
IV.5. Conditions opératoires.....	110
<b>V. Méthode d'identification</b> .....	111
V.1. Identification des constituants d'un l'huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	111
<b>VI. Résultats et interprétations</b> .....	112
<b>VII. Conclusion</b> .....	140
<b>Références Bibliographiques</b> .....	141

**Chapitre V : Activité Biologique de *Ruta chalepensis* L.**

<b>I. Activité Biologique de <i>Ruta chalepensis</i> L.....</b>	<b>143</b>
I.1. Introduction.....	143
I.2. Définitions.....	144
I.2.1. Activité Antibactérienne.....	144
I.2.2. Activité Antimicrobienne.....	144
I.2.3. Activité Antifongique.....	144
<b>II. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne.....</b>	<b>145</b>
<b>III. Conditions opératoires.....</b>	<b>145</b>
<b>IV. Pouvoirs antibactérien et antifongique des extraits et des huiles essentielles issues de <i>Ruta chalepensis</i> L : (la méthode des disques).....</b>	<b>145</b>
IV.1. Effet de l'ATB, des extraits et des huiles essentielles.....	145
IV.2. Effet des ATF, des extraits et des huiles essentielles.....	148
<b>V. Pouvoirs antibactérien et antifongique des extraits et des huiles essentielles issues de <i>Ruta chalepensis</i> L : la détermination de la C.M.I. par la méthode de contact direct.....</b>	<b>151</b>
<b>VI. Conclusion.....</b>	<b>153</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>154</b>

**Chapitre VI : *Ruta chalepensis* L., plante hyperaccumulatrice des métaux lourds**

<b>I. Métaux lourds dans les Plantes.....</b>	<b>155</b>
I.1. Introduction.....	155
I.2. Plantes accumulatrices.....	155
I.3. Toxicité des métaux lourds.....	156
I.4. Sol.....	157
<b>II. Analyse des métaux lourds.....</b>	<b>159</b>
II.1. Introduction.....	159
II.2. Dosage des métaux lourds par spectroscopie d'absorption atomique (SAA).....	159
II.2.1. Définition.....	159
II.2.2. Principe.....	159
II.2.3. Appareillage.....	160
II.3. Conditions opératoires.....	162

## Sommaire

II.4. Résultats et interprétations.....	162
II.4.1. Teneur de la matière minérale.....	162
II.4.2. Extraction et dosage des métaux des différents organes de <i>Ruta chalepensis</i> L..	163
II.5. Conclusion.....	167
<b>Références Bibliographiques.....</b>	<b>169</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>171</b>

### **Partie expérimentale**

Chapitre III.....	173
Chapitre IV.....	184
Chapitre V.....	185
Chapitre VI.....	189

### **Annexe**

## Liste des Tableaux

### Chapitre I :

<b>Tableau 1</b> : Le coefficient de la densité du produit .....	40
--	----

### Chapitre III:

<b>Tableau 2</b> : Etude bioclimatique des six zones d'études (tirée de la carte bioclimatiques de la wilaya deTlemcen).....	75
<b>Tableau 3</b> : Les rendements d'extractions et les aspects des extraits.....	80
<b>Tableau 4</b> : Résultats de l'examen phytochimique sur les extraits à l'éther.....	81
<b>Tableau 5</b> : Résultats de l'examen phytochimique sur les extraits à l'éthanol.....	82
<b>Tableau 6</b> : Résultats de l'examen phytochimique sur les extraits à l'eau.....	82
<b>Tableau 7</b> : Comparaison des rendements d'extractions et les familles de composés de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	83
<b>Tableau 8</b> : La variation de volume d'H.E en fonction de la durée d'extraction.....	86
<b>Tableau 9</b> : La teneur en huile essentielle de <i>Ruta chalepensis</i> L. des différentes périodes de cueillette de Beni Mester.....	88
<b>Tableau 10</b> : Les teneurs des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L. des différentes zones d'études en avril 2005.....	89
<b>Tableau 11</b> : Comparaison des rendements moyens de l'H.E. de <i>Ruta chalepensis</i> L. de diverses origines.....	91
<b>Tableau 12</b> : Propriétés organoleptiques des H.E. de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	92
<b>Tableau 13</b> : Propriétés physico-chimiques de l'H.E. de <i>Ruta chalepensis</i> L. des différentes périodes de Beni Mester et différentes stations.....	93
<b>Tableau 14</b> : Comparaison des propriétés physico-chimiques de l'H.E. de <i>Ruta chalepensis</i> L. de diverses origines.....	94

### Chapitre IV :

<b>Tableau 15</b> : La liste des composés identifiés dans les huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L. d'Algérie.....	112
<b>Tableau 16</b> : Résultats de la CCM des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L. de Beni Mester récoltée à différentes périodes de l'année.....	114
<b>Tableau 17</b> : Les résultats de la CCM des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L. des différentes stations récoltées en avril 2005 .....	116

<b>Tableau 18</b> : Résultats de la CCM des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L. de Beni Mester des différentes parties de la plante, récoltée en avril 2005.....	118
<b>Tableau 19</b> : Résultats de la CPG des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L. de Beni Mester récoltée à différentes périodes de l'année.....	119
<b>Tableau 20</b> : Résultats de la CPG des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L. de Beni Mester des différentes parties de la plante, récoltée en avril 2005.....	126
<b>Tableau 21</b> : Résultats de la CPG des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L. des différentes stations récoltées en avril 2005.....	130
<b>Tableau 22</b> : Les résultats des analyses par GPC/MS de l'H.E. de <i>Ruta chalepensis</i> L. de Beni Mester récoltée en Octobre 2004.....	136
<b>Tableau 23</b> : les constituants identifiés par différentes payes. ....	138

Chapitre V :

<b>Tableau 24</b> : Antibiogramme : diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes souches dans le cas de <i>Ruta chalepensis</i> L. (la méthode de Vincent).....	146
<b>Tableau 25</b> : Antifongigramme : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition des différentes souches.....	149
<b>Tableau 26</b> : Résultats de l'effet des différents extraits sur les bactéries par la méthode de contact direct en ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	151
<b>Tableau 27</b> : Résultats des différents extraits sur le développement des spores par la méthode de contact direct en ( $\mu\text{g/ml}$ ) .....	152

Chapitre VI :

<b>Tableau 28</b> : Teneur Maximale en ppm des métaux lourds dans les Plantes.....	157
<b>Tableau 29</b> : Conditions d'atomisation pour les éléments traces dosés.....	161
<b>Tableau 30</b> : Les caractéristiques du spectromètre d'absorption atomique à flamme.....	161
<b>Tableau 31</b> : Les rendements de la calcination des différents organes de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	163
<b>Tableau 32</b> : Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de <i>Ruta chalepensis</i> L. (extraction avec HCl). ....	163
<b>Tableau 33</b> : Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de <i>Ruta chalepensis</i> L. (extraction avec $\text{HNO}_3$ ).....	164

Liste des Tableaux

**Tableau 34** : Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de  
*Ruta chalepensis* L. (extraction avec l'eau régale)..... 164

**Partie expérimentale :**

**Tableau 35** : Les antibiotiques (ATB) utilisés..... 185

# **Introduction générale**

Depuis une vingtaine d'années, les produits naturels odoriférants prennent une place de plus en plus importante dans notre vie quotidienne, s'imposant comme des éléments fondamentaux de notre plaisir, de notre bien-être et de notre santé. Leurs domaines d'utilisation sont si nombreux que nous les consommons souvent sans y prêter attention. Les huiles essentielles entrent indifféremment dans la composition des parfums les plus subtils, de nombreux aliments industrialisés, de cires, de dentifrices, de déodorants, de lessives, de poudres à récurer et autres articles de ménage, etc. [1, 2].

Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé des hommes et sur la survie de l'humanité [3]. Cependant, et d'une manière générale, les possibilités de guérir du monde végétal, qu'elles soient affirmées ou potentielles, méritent d'être justifiées par l'étude scientifique [4].

Les plantes aromatiques et leurs huiles essentielles sont surtout connues et utilisées pour leurs propriétés antiseptiques, balsamiques, digestives et parfumantes. Elles possèdent bien d'autres vertus parmi lesquelles celle d'aider à réguler le système nerveux et hormonal. Rappelons tout d'abord que les huiles essentielles sont des composés volatils et odoriférants, extraits par distillation à la vapeur d'eau de diverses parties des plantes dites "aromatiques". Leur volatilité et leur faible poids moléculaire permettent une diffusion et une propagation rapide à l'ensemble de l'organisme. Elles pénètrent par diverses voies (respiratoire, orale, épidermique, vaginale...). Les deux dernières voies sont réservées à l'usage médical [5, 6].

Une meilleure connaissance, des plantes actives sur les maladies humaines, peut donc aboutir à la sélection, parmi les nombreuses espèces dites médicinales et employées par les populations, d'un groupe de plantes effectivement actives et non toxiques qui peuvent être utilisées par les populations [7]. Par ailleurs, apporter des preuves scientifiques à l'activité de certaines plantes, à l'égard de certaines maladies de l'homme, serait très utile dans l'accroissement de la valeur économique de ces ressources naturelles et le développement d'une stratégie de conservation de ces plantes [8].

Dans le but de la valorisation des plantes aromatiques médicinales de l'Ouest Algérien, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une rutacée : *Ruta chalepensis* L., connue sous le nom "Rue" en Français, "Fidjel ou Sedab" en Algérie. C'est un arbuste vivace, spontané, qui se trouve dans la région de la méditerranée, elle dégage une odeur forte et très désagréable. C'est une plante médicinale encore utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antiépileptique, etc.

La méthode de travail que nous avons adoptée est basée sur une action pluridisciplinaire, visant donc une valorisation de la matière végétale. Cette méthode permet de relier les éléments d'information apportés par les ethnobotanistes au travail des chimistes et des biologistes.

Avec l'ensemble de ces points, nous avons réalisé notre travail en six chapitres :

Un premier chapitre consiste en une étude bibliographique comprend sur les plantes médicinales, sur les plantes aromatiques, sur l'aromathérapie et sur les huiles essentielles.

Deuxième chapitre consiste en une étude bibliographique générale sur la description botanique de *Ruta chalepensis* L. et sur leur huile essentielle.

Dans troisième chapitre, nous visons l'exploitation générale de la plante et ceci via un criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques. Il a permis de caractériser les différentes familles de composés chimiques existantes dans la plante étudiée, puis l'étude sur les huiles essentielles fraîchement extrait : procédés d'obtention, les teneurs, les paramètres de contrôle (propriétés organoleptiques, caractéristiques physico-chimiques) et la composition chimique. Il est à préciser que toute l'étude expérimentale est faite sur six plantes de *Ruta chalepensis* L. de l'Ouest Algérien, ils proviennent de Beni Mester, Terni, Laourith, Sebdu, Ouzidane et Ghazaouet.

Dans quatrième chapitre, l'identification des constituants des huiles essentielles a été réalisée en se basant sur la chromatographie sur couche mince (CCM), sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/MS) et sur la chromatographie en phase gazeuse (GPC).

Au cours du cinquième chapitre, nous avons testé l'activité antimicrobienne (antibactérienne et antifongique) des différents extraits et de deux huiles essentielles issues de *Ruta chalepensis* L.

Enfin, les métaux lourds sont des polluants nocifs pour l'environnement, pour cette raison, on essayera de déterminer la teneur de métaux lourds dans la différente partie de la plante étudié. Au cours de cette étude, l'analyse des solutions a été effectuée avec un spectromètre d'absorption atomique. Par ailleurs, les résultats obtenus seront interprétés et comparés avec ceux d'autres auteurs afin de classer l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. permis les huiles essentielles comestibles. Cependant, elle peut représenter un avantage économique pour les utilisateurs grâce au moindre coût de son procédé d'élaboration.

## **Références Bibliographiques**

- [1] **Robin, J. M., Norman, R.F.**, Economic and Medicinal Plant Research. 6, 151p. (1988).
- [2] **Bernard Boullard.**, La nature des arômes et parfums. Ed. Estem, p 224. (1995).
- [3] **J.G. Fouché, A. Marquet et A., Hambuckers.**, Les plantes médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes. Sart-Tilman, p77, (2000).
- [4] **Shawenberg P. et Paris F.**, Guide des plantes médicinales. Ed. Delachaux. Niestlé. Paris, (1977).
- [5] [http://www.planetenonviolence.org/Bienfaits des plantes aromatiques et huiles essentielles : Aromatherapie.](http://www.planetenonviolence.org/Bienfaits_des_plantes_aromatiques_et_huiles_essentielles:_Aromatherapie)
- [6] **Dr Jean Valnet, Le Livre de Poche.**, L'aromathérapie. 10<sup>ème</sup> Edition, p 640. (2001).
- [7] **Bruneton J.**, pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> Edition. Tec et Doc, Paris. (1999).
- [8] **Schauenberg, P. and F. Paris.** Guide to medicinal plants. Lutterworth Press, Londres. (1977).

# **Chapitre I :**

## **Plantes Médicinales, Aromatiques et les huiles essentielles.**

## **I. Plantes médicinales :**

### **I.1. Introduction :**

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Celui-ci produit des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animal et végétal. Parmi les milliers de molécules produites par le métabolisme, l'homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants pathogènes (champignons, bactéries, virus...) et de corriger ses troubles métaboliques [1].

Les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, c'est pour cette raison que le patrimoine végétal doit être absolument préservé dans sa diversité et dans son étendue. Il y a trois millions d'années les premières relations de l'homme - plantes ont permis d'utiliser les plantes à d'autres fins (les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments), ainsi que de la nourriture. Que la plante soit comestible ou toxique, qu'elle serve à tuer le gibier et l'ennemi ou à soigner, l'homme a découvert par une suite d'échecs et de réussites, l'utilisation des plantes pour son mieux-être [2]. L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade.

Aujourd'hui, à côté des médicaments fabriqués uniquement par synthèse chimique, d'autres sont obtenus par traitement chimique de substances naturelles, végétales le plus souvent ou animales, mais aussi des remèdes purement naturels qui sont rarement d'origine animale (comme le miel) ou minérales (comme la tourbe médicinale) mais qui proviennent presque exclusivement de plantes [3]. Parmi celles-ci, toutefois, seules certaines sont médicinales et la substance thérapeutique efficace n'est, en outre, logée que dans un certain organe déterminé, que l'on cueille alors à cet effet. Il arrive très rarement d'utiliser la plante entière.

Toutes les réactions chimiques qui se déroulent dans la cellule sont catalysées par des molécules spéciales, à base de protéines, appelées enzymes. C'est pour cela que les réactions enzymatiques seront abordées en premier lieu sur un plan théorique. Ensuite, nous pourrions aborder les grandes voies métaboliques [4].

### **I.2. Définition des plantes médicinales :**

Une plante médicinale est une plante qui contient un ou plusieurs principes actifs, capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies [3].

Environ 1.200 plantes sont inscrites à la pharmacopée française. Elles ont toutes une activité pharmacologique reconnue et constituent un réservoir de matières premières à la source de presque la moitié des spécialités pharmaceutiques classiques [1].

Entre 20 000 et 25 000 plantes sont utilisées dans la pharmacopée humaine. 75% des médicaments ont une origine végétale et 25% d'entre eux contiennent au moins une plante ou une molécule active d'origine végétale [1].

**La phytothérapie** est le traitement (médecine parallèle ou traditionnelle) par les plantes, c'est-à-dire par la consommation ou l'utilisation en voie externe, de produits préparés à partir de plantes, sans passer par une étape de sélection des molécules ; on ne consomme donc pas que le principe actif, mais tout ce que contient la plante [5].

### **I.3. Définition des plantes aromatiques :**

Les plantes aromatiques plus connues par leurs parfums et leurs nombreux usages culinaires, sont pour la plupart, pour ne pas dire toutes, dotées de propriétés thérapeutiques. En effet, partie intégrante de la phytothérapie, l'aromathérapie trouve ses lettres de noblesse depuis la plus haute antiquité. Près de 2 000 ans avant Jésus-Christ, des écrits font état de son emploi en médecine traditionnelle dans pratiquement toutes les civilisations [6].

Certaines plantes aromatiques entraient dans les compositions d'huiles servant à embaumer les morts alors que d'autres servaient de monnaie d'échange aussi précieuse que l'or ou l'argent. Certaines ayant revêtu un caractère sacré ont accompagné les dieux dans leurs temples tels le laurier et la menthe chez les Grecs. A l'époque médiévale les gens associaient les bonnes odeurs à l'air sain et une plante aromatique dont s'éloignaient les insectes était introduite dans les maisons car les insectes étaient susceptibles de véhiculer des maladies. Les chemins que traversaient les cortèges royaux étaient jonché de plantes séchées tel le romarin ou le thym lesquels étaient sensés protéger les souverains de maladies telle la peste [7].

Les anciennes techniques de préparation de remèdes à base de plantes aromatiques consistaient à utiliser les différentes parties de la plante sensées contenir les principes actifs, généralement les feuilles mais également les fleurs, les tiges et les racines pour certaines plantes. C'est au Moyen-Orient et en Extrême-Orient que les huiles essentielles ont d'abord été extraites par distillation et utilisées dans la parfumerie et en phytothérapie. Les croisades ont permis de rapporter en occident les savoirs des orientaux sur les plantes aromatiques dont leurs techniques d'extraction des huiles par la vapeur [8].

Grâce aux progrès de la chimie, on a rapidement démontré que chaque plante renferme de très nombreux constituants. Pour un certain nombre d'entre elles, on a aussi mieux cerné

les propriétés de leurs principes actifs majoritaires, et également mis en évidence la puissance de leur activité [6].

La naturopathie est une discipline de santé englobant l'ensemble des méthodes naturelles d'hygiène et de soins à visée préventive et éducative. Elle comprend l'utilisation des facteurs naturels de santé (eau, air, soleil, alimentation) et diverses méthodes de soins naturels dont l'utilisation rationnelle et individualisée des plantes et de leurs extraits, huiles essentielles, vitamines, minéraux, compléments alimentaires...

La naturopathie individualise les terrains biologiques par un bilan iridologique et morphologiques sur les bases des tempéraments hippocratiques [8].

L'aromathérapie désigne l'emploi des huiles essentielles issues des plantes aromatiques pour traiter les pathologies et pour améliorer sa santé et son bien-être. L'aromathérapie n'est pas simplement une thérapie par les arômes mais la thérapie par les aromates, c'est-à-dire, les plantes aromatiques dont on extrait les huiles essentielles. Le retour à la nature appelle aussi de nouveaux besoins et l'aromathérapie propose la redécouverte d'un art plus que millénaire sur toute la surface du globe terrestre [7].

#### **I.4. Principales substances curatives des plantes médicinales :**

Les plantes synthétisant les éléments du sol et de l'atmosphère qu'elles absorbent par les racines et par les feuilles : l'eau, l'acide carbonique, les matières minérales et inorganiques. Le processus de base est l'assimilation photosynthétique du gaz carbonique, appelé simplement photosynthèse. Les premiers produits de la photosynthèse sont des substances à base moléculaire appelées métabolites primaires : les saccharides (sucres), les acides gras et les acides aminés. Ensuite sont produits les métabolites spécialisés. Certains possèdent des vertus thérapeutiques [9]. Parmi les métabolites primaires, les saccharides entrent dans la préparation des comprimés, servent de base aux mucilages. Certains acides aminés ne sont pas produits par l'organisme humain auquel ils sont pourtant indispensables et doivent donc être ingérés. Les métabolites contenant de l'iode assurent le bon fonctionnement de la glande thyroïde. Les plus complexes, comme l'insuline, forment la base des hormones ainsi que des antibiotiques. Les plus importants sont les protéines [10].

Parmi les métabolites spécialisés, les principaux sont:

- Les flavonoïdes, qui renforcent les parois des capillaires sanguins,
- Les corps terpéniques (dérivés du terpène, parmi lesquels le menthol, le camphre, etc.). À noter que les corps terpéniques forment la base des stéroïdes qu'on retrouve dans de nombreuses vitamines,

- Les principes amers permettant la digestion des matières grasses,
- Les saponines sont utilisées comme expectorants et diurétiques,
- Les alcaloïdes à effets thérapeutiques nombreux mais qui peuvent être aussi des poisons mortels.

On pourrait prolonger l'énumération : d'autres métabolites spécialisés agissent contre les allergies, l'hypertension, les maladies infectieuses et forment même la base de produits anticonceptionnels [5].

## **II. Métabolites primaires et secondaires :**

Bien que les cellules aient des morphologies et des structures différentes, que leur rôle dans les différents organismes soient très variés, leur fonctionnement de base est le même. L'une des principale activité de la cellule est d'assurer sa propre survie. Ceci signifie deux choses :

1. Elle doit trouver l'énergie nécessaire à son fonctionnement. Cette énergie est principalement obtenue par dégradation de molécules organiques ou minérales, c'est le **catabolisme**.
2. Elle doit fabriquer les molécules de bases, matière première de sa construction, c'est à dire trouver ou fabriquer les lipides, glucides et acides aminés nécessaires et les autres éléments pour construire les macromolécules, c'est l'**anabolisme**.

Ces deux grands ensembles de réactions qui réalisent ces opérations sont regroupées sous le nom de métabolisme [11].

### **II.1. Principaux composés des métabolites primaires :**

Tous les êtres vivants ont un **métabolisme primaire** qui fournit les molécules de base tels que : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides aminés, carbohydrates. Les métabolites primaires sont produits en quantité élevée par les plantes [5]. Parmi les métabolites primaires, nous avons :

#### **II.1.1. Glucides :**

##### **A. Définition :**

Les glucides, aussi appelés oses ou plus communément sucres, sont des composés naturels présents dans la matière vivante animale et végétale. Leur rôle le plus connu est en tant que source d'énergie principale des cellules. Mais ce n'est pas leur seule fonction. Ils en ont de nombreuses autres. Une des formes courante de la nature est la cellulose des plantes ou

la chitine des insectes, qui assure leur rigidité. Ils constituent également des sites de reconnaissance et de nombreuses protéines portent des sucres à leur surface pour assurer cette fonction. Mais leur rôle fondamental est leur participation dans la constitution des acides nucléiques, l'ADN et l'ARN, dont ils assurent la charpente (le deoxyribose et le ribose sont deux glucides) [12].

**B. Propriétés générales :**

Les glucides sont constitués de molécules de base qui peuvent se polymériser pour former des structures plus complexes. Ces molécules sont caractérisées par leur formule de la forme  $(CH_2O)_n$  (voir figure 1), ce qui les a fait appeler anciennement hydrates de carbone. Cette appellation est aujourd'hui abandonnée, sauf dans la diététique, car les glucides ne sont pas des atomes de carbone hydratés. Ils sont constitués d'une chaîne carbonée portant une fonction cétone ou aldéhyde, les autres oxygènes participant à des fonctions alcools sur les autres carbones [13].

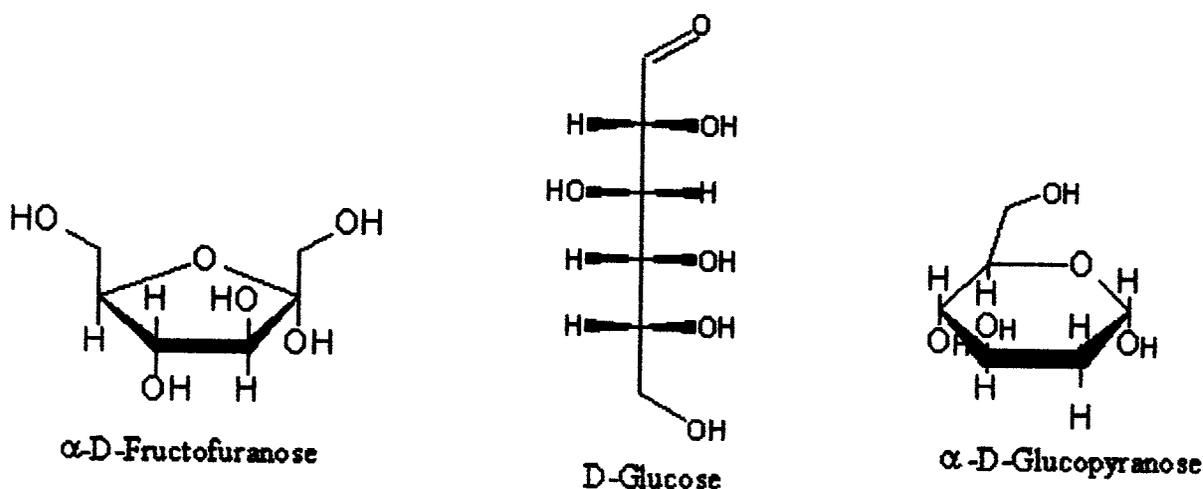
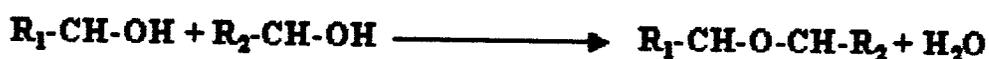


Figure 1 : quelques structures des hydrates de carbone.

Les molécules de glucides existent sous deux formes : linéaire et cyclique, dans le cas de la molécule cyclique le groupement carbonyle n'est plus visible. Les molécules les plus courtes n'existent que sous forme linéaire (3 et 4 atomes de carbone). sont solubles dans l'eau, ils passent continuellement d'une forme à l'autre. La liaison entre deux molécules de glucides se fait entre deux groupements OH, avec élimination d'une molécule d'eau selon la réaction suivante :



On peut noter que seules les formes cycliques peuvent se polymériser. Seuls les glucides de 5 carbones et plus peuvent participer à ces assemblages. Tous les carbones liés à un groupement OH sont à même de participer à une liaison, mais dans un polymère donné, les carbones impliqués sont parfaitement définis. Ainsi, la différence entre la cellulose et l'amidon n'est autre que le choix des carbones impliqués.

Enfin, plus de deux carbones peuvent être impliqués dans des liaisons, ce qui signifie que la chaîne glucidique peut être ramifiée [10].

### II.1.2. Protéines :

#### A. Définition :

Le mot "protéine" vient d'ailleurs du grec prôtos qui signifie "premier". sont des macromolécules de très longues chaînes d'acides aminés (les peptides sont des chaînes plus courtes), attachés les uns aux autres par une liaison chimique, dite liaison peptidique [12]. Les protéines ont des rôles très divers :

Certaines font partie d'une structure de soutien (membrane qui entoure les cellules, trame des os, collagène, etc.), tandis que d'autre (hormones, anticorps, enzymes, etc.), interviennent dans divers mécanismes physiologiques.

On distingue deux principales sources alimentaires de protéines [14] :

- Les protéines animales (fournie par la viande, le poisson, les œufs, les produits laitiers) sont les mieux équilibrées car elles contiennent tous les acides aminés indispensables, en bonne proportion, très digestibles.
- Les protéines végétales (fournie par les légumineuses, les céréales, le soja) ont une valeur nutritionnelle moindre : elles sont carencées en un ou plusieurs acides aminés indispensables, en particulier en lysine pour les céréales et en acides amines soufrés (dont la méthionine) pour les légumineuses, leur digestibilité est moindre. (voir figure 2).

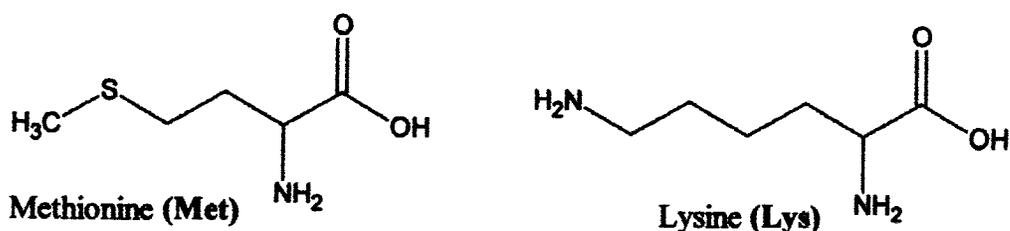


Figure 2 : structures de la méthionine et la lysine.

**B. Propriétés physico-chimiques :**

Les protéines sont des substances à masse moléculaire élevée qui par hydrolyse, libèrent des acides aminés. Elles absorbent la lumière UV à 278 nm, aussi la réaction du biuret peut servir à leur dosage colorimétrique. Elles peuvent aussi fixer certains colorants telles que, le noir amidé, le vert de lissamine ou le rouge ponceau [12].

**C. Propriétés biologiques :**

Le rôle biologique des protéines est en tant que source d'énergie principale des cellules. Les protéines des aliments sont fragmentées dans le tube digestif en acides aminés, absorbés dans le sang, puis dans les cellules qui s'en servent pour élaborer leurs propres protéines correspondant à 4 kilo calories chez l'adulte [14].

Il faut aussi citer les lipoprotéines, elles constituent la forme sous laquelle se trouvent les lipides dans le plasma sanguin. Elles existent aussi dans le cerveau et les nerfs. Ce sont des associations entre des protéines solubles et des lipides notamment des phospholipides [12].

**II.1.3. Lipides :**

**A. Définition :**

Les lipides sont des composés naturels présents dans la matière vivante animale et végétale. On désigne par ce terme ce que couramment on nomme les graisses, les huiles ou autres "corps gras", à l'exclusion des huiles dites minérales qui furent des mélanges d'alcanes avant de devenir "de synthèse" et être des esters et des polymères. Les lipides sont constitués à partir des acides gras. Ils sont généralement à longue chaîne comportant un nombre pair d'atomes de carbone entre 4 à 20, avec parfois une ou plusieurs insaturations très rarement ramifiés [9].

**B. Propriétés physico-chimiques :**

Les lipides sont une famille de molécule très particulières. Elles sont amphiphiles, c'est à dire qu'elles présentent un coté apolaire et un coté polaire. Ces particularités les mène à constituer, en solution dans l'eau, des structures dans lesquelles le pôle hydrophobe est enfoui dans la structure alors que l'extrémité polaire s'expose au contact de l'eau à la surface. Cela leur permet de constituer des structures à deux dimensions, des membranes fluides tout en étant totalement imperméables à l'eau et aux molécules polaires, qui sont à la bases de toutes les membranes biologiques. Ainsi, bien que non polymérisables, cette classe de molécules joue un grand rôle structurel chez les êtres vivants [9,12].

### **C. Propriétés biologiques :**

Le rôle biologique des lipides est principalement de constituer une réserve d'énergie, leur métabolisme aboutissant à la combustion complète libérant une grande quantité d'énergie. Un rôle important est joué par des dérivé des lipides au niveau de la paroi des cellules [14].

Mais leur principale utilisation réside dans l'industrie de la préparation des huiles végétales alimentaires et l'huile de lin [12].

### **II.2. Principaux composés des métabolites secondaires :**

Il existe aussi un métabolisme, chez les plantes : c'est une exclusivité du monde végétal. Ces substances ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante : on les appelle les **métabolites secondaires**.

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité. Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique [1], nous citons :

#### **II.2.1. Flavonoïdes :**

##### **A. Définition :**

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques de squelette toujours tricycliques (voir figure 3). Ils sont des composés qui possèdent des fortes propriétés antioxydantes. Elles sont responsables de la couleur des aliments. Les flavonoïdes améliorent la fonction de la vitamine C et protègent de l'oxydation. La première substance flavonoïde obtenue à l'état pur est le Morin, isolé par E. Chevreul en 1814 de *Morus tinctorial* [15].

Les flavonoïdes sont présents dans un grand nombre de variété des plantes ( par exemple les feuilles de thé vert séchées en contiennent jusqu'à 30%). On les retrouve dans une grande variété des fruits et des légumes, ils ont des effets bénéfiques sur le cœur, les artères, le foie, le système immunitaire, les tissus musculaires et le système nerveux. On les divise en :

1. **Flavonole** : Quercetine, Rutine, Kaempferol, Myricetine, Isorhamnetine.
2. **Flavanole** : Catéchine, Gallocatéchine, Epicatéchine, Epigallocatéchine, Théaflavine, Théarubigine.
3. **Flavone** : Lutéoline, Apigenine.
4. **Flavanone** : Hesperetine, Naringenine, Eriodictyol.
5. **Isoflavonoïde** : Genisteine, Daizdeine.
6. **Anthocyanidine ( Anthocyane )**: Cyanidine, Delphinidine, Malvidine, Pelargonidine, Peonidine, Petunidine.

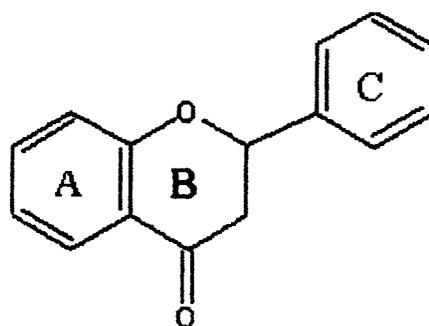
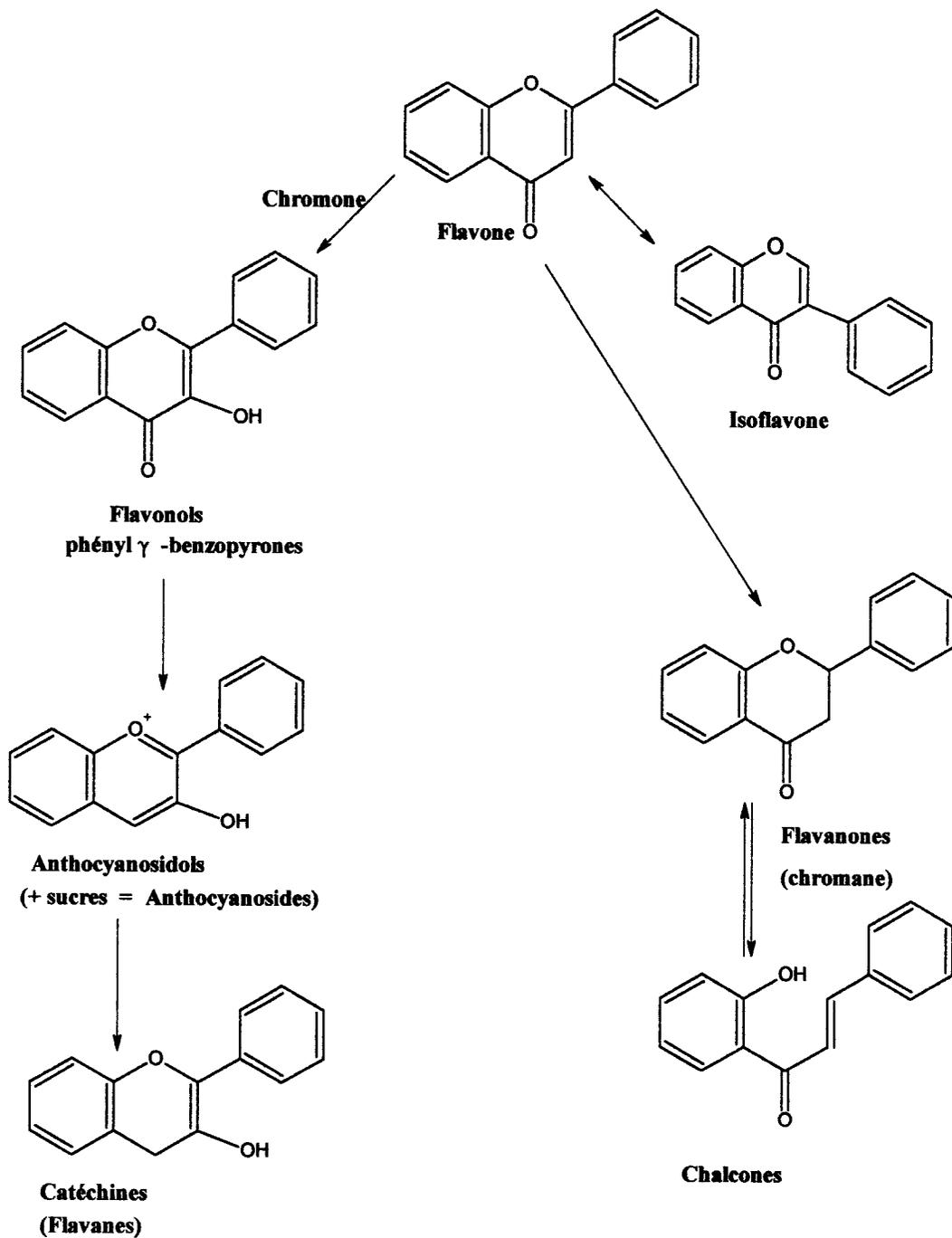


Figure 3 : structure du squelette de base.

**B. Propriétés physico-chimiques :**

Les flavonoïdes sont hydrosolubles et solubles dans l'eau, les alcools et les solutions d'hydroxyde alcalin. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées [9]. Ce sont des antioxydants puissants capable de piéger des radicaux ( hydroxy, anion superoxyde et des radicaux peroxy lipidiques) [16]. Ils appartiennent à 7 types chimiques structuraux dérivant de la  $\gamma$  -benzopyrone ou du chromane (voir figure 4).



**Figure 4 :** Schéma interactif en différentes classes des flavonoïdes.

Les composés variés de chaque classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C<sub>3</sub> intermédiaire. La chalcone de couleur jaune, est métabolisée en différentes classes des flavonoïdes [17].

### C. Propriétés biologiques :

Les flavonoïdes semblent être étroitement liés à leur exceptionnelle capacité à piéger et à neutraliser les radicaux libres. Certains possèdent une activité hypoglycémiant comme l'épicatéchine isolé de l'épicarpe de *Pterocarpus marsupium* roxb [17]. Ils se trouvent dans beaucoup des produits alimentaires végétaux des citrons, des Weintrauben et du cacao-haltigen chocolat (épicatéchine).

Les flavonoïdes possèdent des activités : Antibactériennes, anti-inflammatoire, antiallergique, antimutagène, antiviral, anti-thrombotique, vasodilatatrice [9, 18].

### II.2.2. Anthocyanosides :

#### A. Définition :

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines, qui donnent aux fleurs et aux fruits leur teinte bleue, rouge ou pourpre. Ces pigments existent sous la forme d'hétérosides (les anthocyanosides) et leurs génines (les anthocyanidols) [13].

De façon générale, on désigne par "anthocyanosides", un hétéroside résultant de la combinaison d'une génine anthocyanique avec un ou plusieurs groupements osidiques.

Les anthocyanidols possèdent un hétérocycle de type benzopyroxonium à quatre hydroxyles. On en distingue trois groupes : la pélargonidol, la cyanidol et la delphinidol, suivant que le cycle B porte une, deux ou trois fonctions phénoliques (voir figure 5) [19].

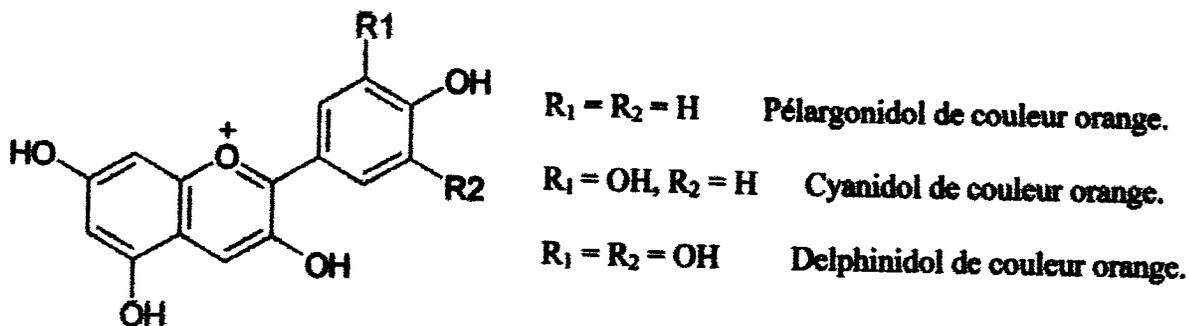


Figure 5 : structure des différents types des anthocyanidines.

#### B. Propriétés physico-chimiques :

Les anthocyanosides existent sous forme de monomères, mais aussi de dimères, d'oligomères et de polymères suivant un degré de polymérisation croissant. La liaison anthocyanoside-anthocyanoside s'effectue entre le C<sub>4</sub> du noyau C et le C<sub>8</sub> du noyau A. Dans le

cas présent, les anthocyanosides désignent les structures sous forme de monomères, dont le poids moléculaire varie de 400 à 600 Dalton. Certaines formes de dimères peuvent également être présentes, dont le poids moléculaire peut atteindre environ 1 000 Dalton [15].

Les anthocyanosides sont solubles dans l'eau et les alcools, insolubles dans les solvants organiques apolaires. Les anthocyanidines changent de couleur suivant le pH [19].

### **C. Propriétés pharmacologiques :**

Les fruits rouges sont riches en pigments appelés anthocyanosides, dont on a prouvé qu'ils avaient un effet sur la microcirculation sanguine, en agissant notamment en tant que facteur vitaminique P, en tant qu'agent antioxydant, antiagrégant plaquettaire et antiradicalaire. Ces propriétés ont été reconnues pour le traitement des troubles impliquant la circulation rétinienne, dans le traitement des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire et des troubles visuels d'origine vasculaire [20].

Les anthocyanosides de la myrtille montrent une activité vasoprotectrice et anti-oedémateuse. Ils inhibent l'agrégation plaquettaire. Classiquement, il est admis et confirmé que les anthocyanosides améliorent la vision en lumière atténuée. Des résultats expérimentaux sont favorables dans le traitement de troubles vasculaires (phlébopathie, microangiopathies diabétiques, ecchymoses, purpuras, gingivorragies, etc.) [21].

Les extraits enrichis en anthocyanosides à partir des fruits peuvent entrer dans la composition de médicaments destinés au traitement symptomatique des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire cutanée, pour l'insuffisance veineuse, pour atténuer la symptomatologie hémorroïdaire, pour le traitement adjuvant de la composante douloureuse des colites spasmodiques [22].

## **II.2.3. Anthraquinones, Anthracénosides et Émodols :**

### **A. Définition :**

Les quinones sont des dicétones cycliques conjuguées que l'on rencontre dans les règnes animal et végétal. Elles sont utilisées notamment comme stabilisateur d'oxydo-réduction. Elles sont classées, selon le nombre de noyaux aromatiques, en benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones et phénanthraquinones. Elles appartiennent à la famille des anthracénosides qui regroupent tous les composés phénoliques, hétérosidiques et les émodols qui sont des dérivés hydroxyanthracéniques [9].

La formule chimique de l'anthraquinone est  $C_{14}H_{10}O_2$ . Ses autres noms sont 9,10-anthracènedione, anthradione, 9,10-anthrachinon et anthracène-9,10-quinone, mais pour

anthracénosides et émodols de squelette de base toujours anthraquinone, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques "A" et "C" intermédiaires (voir figure 6) [9, 22].

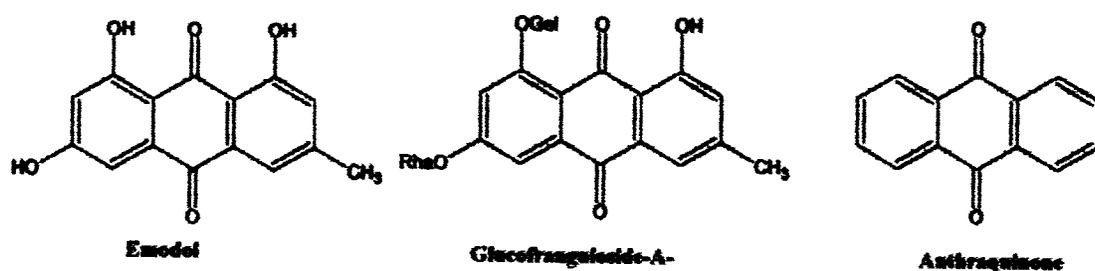


Figure 6 : structure des différents types d'anthraquinone.

### B. Propriétés physico-chimiques :

L'anthraquinone a l'aspect d'une poudre cristalline pleine gris-verte jaune ou gris-clair. Leur points de fusion sont toujours élevés, compris entre 286°C et 379.8°C. elle est insoluble dans l'eau ou l'alcool, mais se dissout dans le nitrobenzène et l'aniline. Les anthracénosides et émodols sont des composés colorés, très peu solubles dans l'eau froide, solubles dans les solvants organiques et les alcools. Les génines carboxyliques sont extractibles par une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium [23].

L'anthraquinone se produit naturellement dans quelques genres (par exemple aloès, séné, rhubarbe et nerprun de cascara), mycètes, lichens et insectes, où elle sert de squelette de base à leurs colorants [24].

### C. Propriétés biologiques :

Les dérivés normaux d'anthraquinone tendent à avoir des effets laxatifs. En effet, elles provoquent des contractions des parois intestinales et stimulent les évacuations dix heures après la prise. Elles rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal [1]. L'anthraquinone du commerce est employée dans la production des colorants, tels que l'alizarine. Beaucoup de colorants normaux sont des dérivés d'anthraquinone.

L'anthraquinone est également employée comme catalyseur dans l'industrie de papier. Une autre utilisation est comme produit répulsif d'oiseau sur des graines [23].

## II.2.4. Tanins :

### A. Définition :

Les tanins sont des composés polyphénoliques d'origine végétale. Ils ont une capacité à coaguler, c'est à dire à former des complexes très stables, et à fixer les protéines (le tannage). La résultante du tannage est l'établissement de liaison entre les fibres de collagène de la peau, ce qui confère à cette dernière une résistance à l'eau, à la chaleur, à l'abrasion. Cette aptitude des tanins à se combiner aux macromolécules, explique le phénomène de précipitation de la cellulose, des pectines, des protéines. Deux classes de tanins différentes sont distinguées par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique [9].

- **Les tanins hydrolysables** : ce sont des esters d'un sucre et d'un nombre variable de molécules d'acide-phénol. Le sucre est très généralement le glucose et l'acide-phénol est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique dans le cas des tanins éllagaques. Les tanins galliques et éllagaques (simple ou complexe) sont caractéristiques des angiospermes, dicotylédones, (voir figure 7) [25].

Structure de base des tanins hydrolysables :

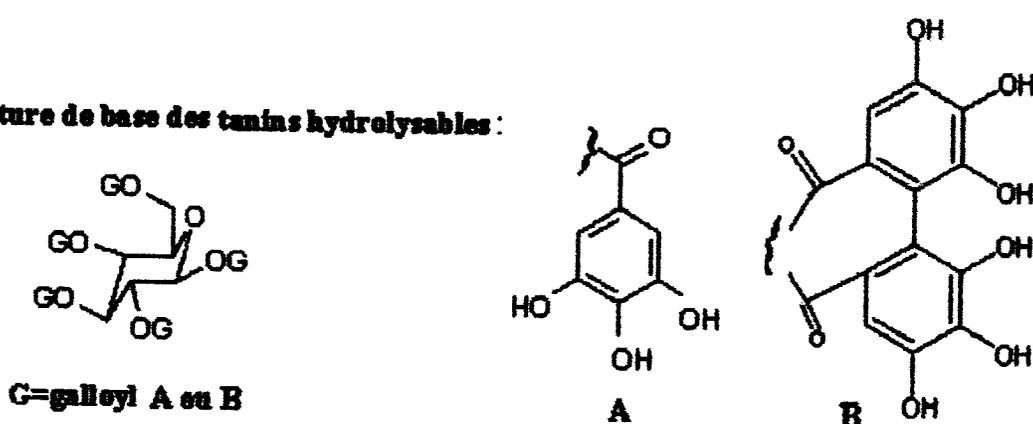
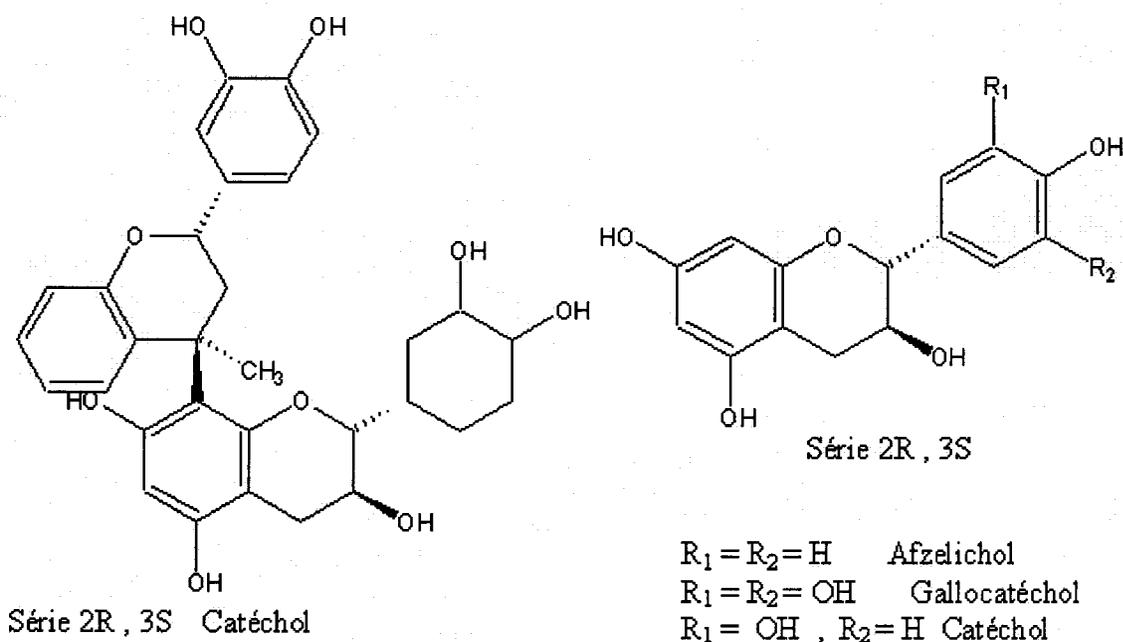


Figure 7 : structure des tanins.

- **Les tanins condensés ou proanthocyanidols** : ce sont des polymères flavaniques. Ils sont des proanthocyanidines, des composés phénoliques hétérogènes, des oligomères et des polymères de flavanes, de 3-flavanols, de 5-deoxy-3-flavanols et de 3,4-flavanediols. Toutes ces molécules appartiennent à la famille des flavonoïdes, et possèdent en commun la propriété de libérer des anthocyanidines [25].



**Figure 8 :** quelques structures de tanins condensés.

### B. Propriétés physico-chimiques :

Les tanins ont des couleurs qui vont du blanc jaunâtre au brun et foncent à la lumière. Ils possèdent une légère odeur caractéristique, un goût amer, et sont astringents.

Ils se dissolvent dans l'eau sous forme des solutions colloïdales, mais leur solubilité varie selon le degré de polymérisation, les polymères peuvent compter jusqu'à cinquante unités élémentaires. Ils sont solubles dans l'alcool, l'acétone, les solutions d'hydroxyde de sodium et de carbonate de sodium. D'autre part, ils sont insolubles dans le benzène, l'éther et le chloroforme. Comme tous les phénols, les tanins réagissent avec le chlorure ferrique. La plupart des tanins précipitent en présence d'aluminium, de gélatine, des sels alcaloïdes et métalliques [9, 25].

### C. Propriétés biologiques :

La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liées au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines [9]. Les tanins sont des inhibiteurs enzymatiques (blocage de la 5- lipoxygénase, inhibition de l'enzyme de conversion l'angiotensine, de l'activation de la hyaluronidase) [26]. Ils sont utilisés en thérapeutique pour leurs propriétés antiseptiques et bactéricides, comme agents

antidiarrhétiques (tanin du ratanhia ou de la salicaire), comme agents cicatrisants et vasoconstricteurs qui assurent une protection de la peau et des muqueuses en imperméabilisant partiellement les couches superficielles. Mais leur principale utilisation réside dans l'industrie de la préparation du cuir [9].

## II.2.5. Coumarines :

### A. Définition :

Les coumarines sont des substances naturelles organiques aromatiques hétérosidique oxygénée de formule brute  $C_9H_6O_2$ , connue dans la nomenclature internationale comme 1-benzopyrane-2-one, 1, 2-benzopyrone ou benzo-alpha-pyrone qu'on peut considérer, en première approximation, comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-z-cinnamiques.

Elle tire leur nom de "coumarou", nom vernaculaire de la fèves tonka (Fabaceae, *Dipteryx odorata* wild, d'où fut isolée en 1820, la coumarine [9].

Les coumarines sont présentent dans divers végétaux, telles les aspérules (Rubiaceae du genre *Asperula*), les racines des flouves (Graminées d'Eurasie du genre *Anthoxanthum*), les tiges feuillées des mélilots (Légumineuses Papilionacées du genre *Melilotus*), l'angélique (*Angelica archangelica*) ou la berce (*Heracleum mantegazzianum*) [27].

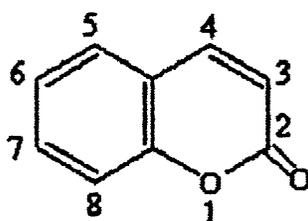


Figure 9 : Structure de base du coumarine.

On distingue deux types:

- Les coumarines simples substituées, en C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub> soit, par les hydroxydes ou leur forme méthoxyles (voir figure 10).

R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = OH      Ombelliférone

R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = OH      Esculetol

R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH      Scopoletol

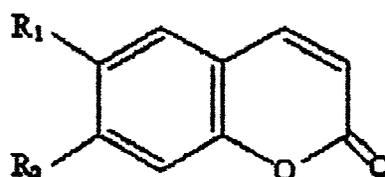


Figure 10 : Structure des coumarines simples.

- Les coumarines complexes telles que les furocoumarines et les pyranocoumarines.

#### **B. Propriétés physico-chimiques :**

La coumarine est une substance organique composée de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. La coumarine a l'aspect d'une poudre cristalline incolore, elle possède de point d'ébullition 300°C et le point de fusion 69°C. Cette molécule dégage une odeur et donne d'une saveur brûlante, rappelant la vanilline et contribue à l'odeur de foin coupé [28].

Les coumarines sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques tels que l'éther diéthylique ou les solvants chlorés avec lesquels on peut les extraire. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau [9].

#### **C. Propriétés biologiques :**

Les coumarines présentent un intérêt pharmacologique très limité. Elles possèderaient des propriétés vasculoprotectrices, immunostimulantes et développeraient une activité cytotoxique. Les furocoumarines sont connues pour être photosensibilisants, tandis que les pyranocoumarines ont une action antispasmodique [29]. Sous l'action des rayonnements ultraviolets, certaines personnes développent des allergies à la coumarine. Les agriculteurs peuvent ainsi se voir contraints d'abandonner leur activité [10].

La coumarine est utilisée dans le traitement adjuvant du lymphoïde post-mastectomie, en complément des méthodes de contention. Son action antioedématisante résulte de l'augmentation du drainage lymphatique et de la stimulation de l'activité protéolytique des macrophages [29].

La fermentation humide des plantes qui en renferment, génère des dérivés anticoagulants, qui entraînent des hémorragies chez les herbivores qui en consomment. Le 4-hydroxy-3-[1-(4-nitrophényl)-3-oxobutyl] coumarine, appelé usuellement acénocoumarol, est antagoniste de la vitamine K et inhibiteur de la synthèse des facteurs de la coagulation. Ses propriétés anticoagulantes sont utilisées dans la thérapie des maladies thromboemboliques [30].

### **II.2.6. Saponosides :**

#### **A. Définition :**

Les saponosides sont des mélanges de molécules, chacune liée à quelques oses, ces derniers les plus divers (D-glucose, D-galactose, D-xylose, L-arabinose, L-fructose, etc.) sont rencontrés. Ce sont des substances hétérosidiques existant chez de nombreux végétaux.

Les saponosides doivent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau. Ils sont irritants, caustiques, et donc support d'une toxicité [31]. Les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine :

- Les saponosides à génines stéroïdiques sont presque exclusivement présents chez les angiospermes monocotylédones. Ils possèdent le squelette de la cholane comme les stérols végétaux ou animaux et sont utilisés pour l'hémisynthèse des corticoïdes [32].

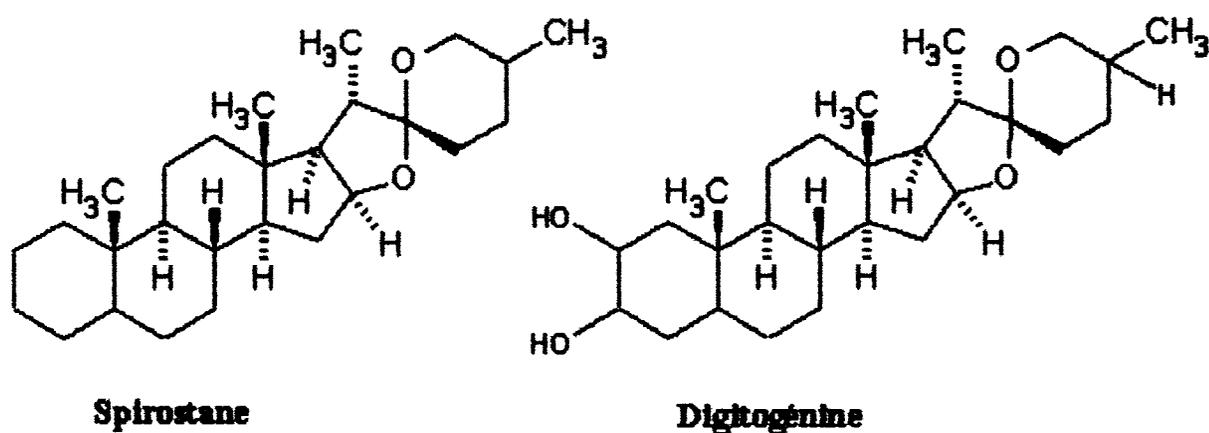


Figure 11 : quelques structures des saponosides à génines stéroïdiques.

- Les saponosides à génines triterpéniques constituent la majorité des sapogénines des dicotylédones et appartiennent à 3 types : l' $\alpha$ -amyrine, le  $\beta$ -amyrine (voir figure 11) et le lupéol [32].

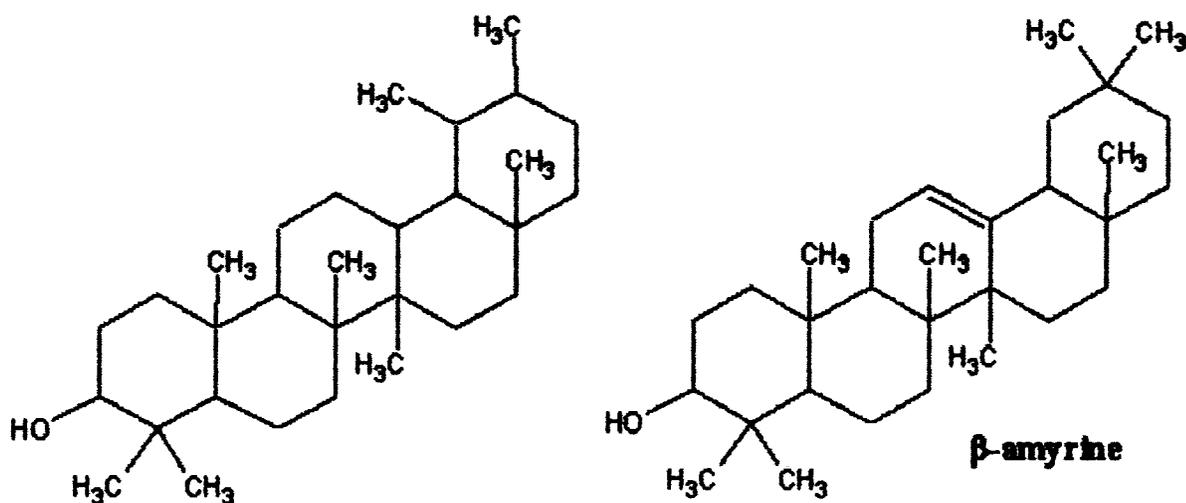


Figure 12 : la structure de base des saponosides triterpéniques.

**B. Propriétés physico-chimiques :**

Les saponosides possèdent un ensemble de propriétés physico-chimiques et physiologiques parmi lesquelles :

- Pouvoir aphrogène (faculté de mousser fortement en solution aqueuse après agitation).
- Ils se présentent, le plus souvent, sous forme amorphe.
- Ils sont insolubles dans les solvants organiques tels que l'éther, benzène et le chloroforme mais, ils sont solubles dans l'eau, les alcools dilués. Ils agissent sur la lumière polarisée et leurs points de fusion sont toujours élevés, compris entre 200°C et 300°C [32].

**C. Propriétés pharmacologiques :**

Les hétérosides cardiotoniques sont des sédatifs du système nerveux central, analgésiques et anesthésiques.

Beaucoup de saponosides sont de puissants antifongiques. Cette propriété serait due à leur pouvoir complexant qui s'exercerait sur les stéroïdes de la membrane des champignons. Ils présentent aussi des activités antisiphilitiques, antirhumatismale, dépurative, diurétique, anti-inflammatoire, analgésique, antidiabétique, antitussive, etc. [33].

La saponine du commerce est utilisée pour la préparation de savons liquides et de produits d'hygiène (pâtes, dentifrices, shampoings, sels de bain). Ces derniers lui doivent leurs propriétés détergentes et dégraissantes [34].

**II.2.7. Alcaloïdes :**

**A. Définition :**

Le terme d'alcaloïde a été introduit par W. Meisner au début de XIX<sup>ème</sup> siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases. Ils sont des substances azotées complexes d'origine naturelle [35].

Les alcaloïdes sont donc les composés essentiellement présents chez les angiospermes. Chez le végétal, les alcaloïdes existent sous la forme des sels (citrates, malates, isobutyrate, benzoates...) ou sous celle d'une combinaison avec les tanins. Ils possèdent un squelette hétérocyclique azoté, à l'exception de quelques substances où l'azote est extra cyclique [36].

On distingue trois classes d'alcaloïdes [9, 37] :

- Les alcaloïdes vrais existant à l'état des sels et sont bio-synthétiquement formés à partir des acides aminés.

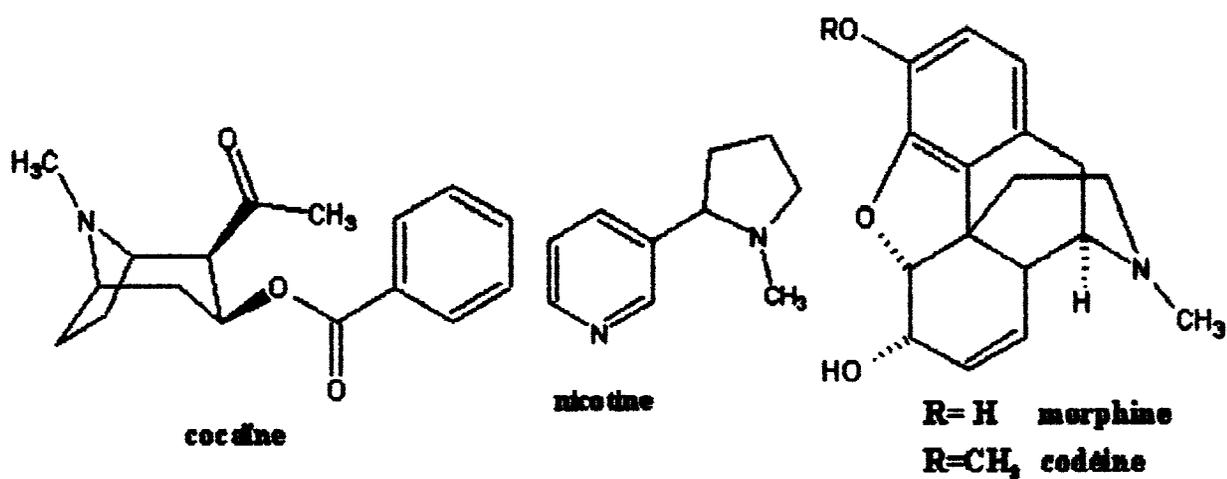


Figure 13 : quelques structures des alcaloïdes vrais.

- Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas des dérivés des acides aminés.

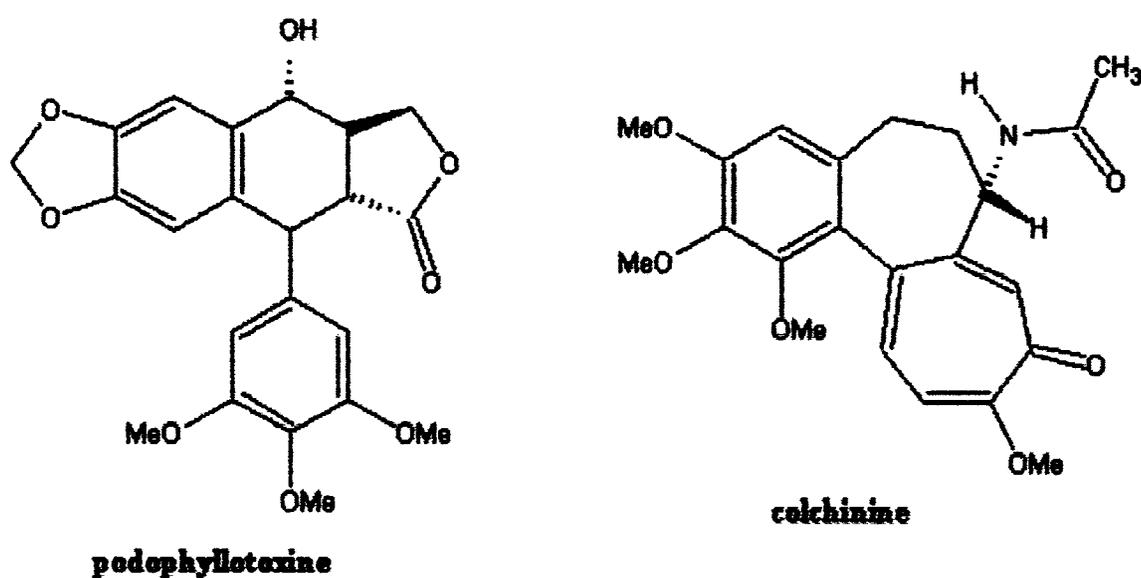


Figure 14 : quelques structures des pseudo-alcaloïdes.

- les proto- alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils ont un caractère basique et sont élaborés in-vivo à partir d'acide aminé.

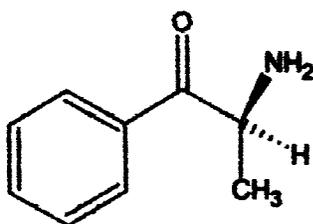


Figure 15 : structure de cathinone

**B. Propriétés physico-chimiques :**

Les alcaloïdes ont des masses moléculaires variant de 100 à 900 g/mol, rarement colorés. Ils sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires et solubles dans les alcools de titre élevé. La basicité des alcaloïdes est très variable, cette propriété étant étroitement fonction de la disponibilité du doublet libre de l'azote [36].

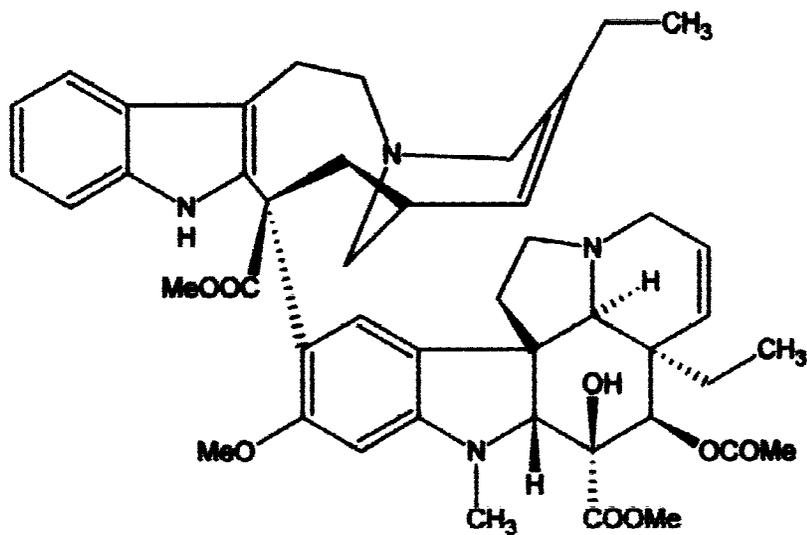
La basicité des alcaloïdes permet de former des sels avec les acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates...) ou organiques (tartrates, sulfamates, maléates...). Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués [38].

**C. Propriétés biologiques :**

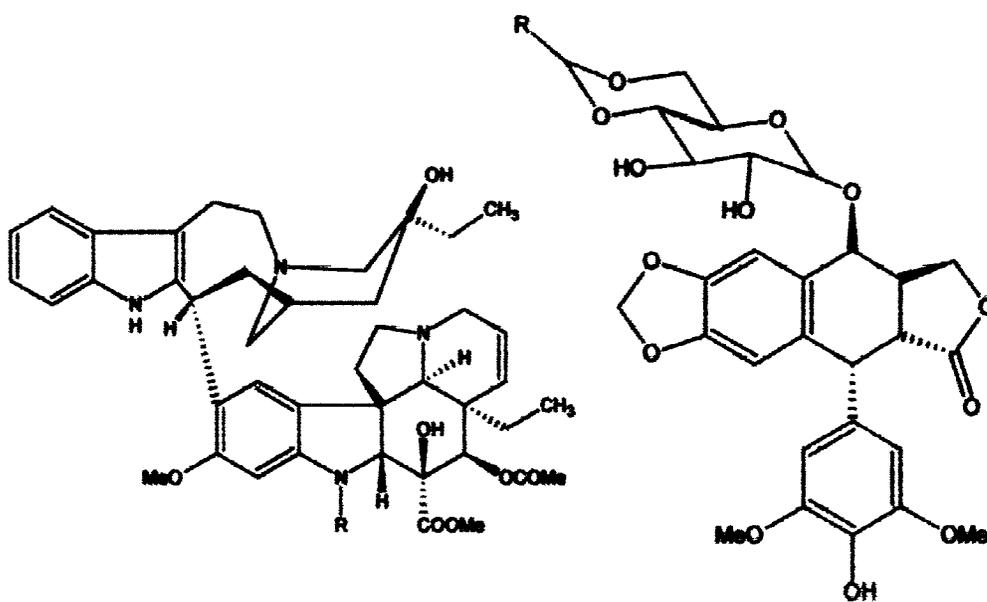
Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes par leur activité pharmacologique dans les divers domaines. La chimiothérapie anticancéreuse en utilise plusieurs, dont les plus importants dérivent de la pervenche ou de la mandragore [36]. Les alcaloïdes de la pervenche *Vincarosea* ont été isolés à partir de 1957 pour être utilisés en clinique au début des années 1960 : vinblastine et vincristine, puis vindésine et vinorelbine qui en dérivent par modification chimique. Ils ont une affinité pour la tubuline des microtubules intracellulaires qui constituent le fuseau achromatique indispensable à la division cellulaire (mitose), et les fibres des cellules nerveuses [38]. Cette affinité explique que ces médicaments bloquent la mitose (antimitotiques au sens strict) et ont une toxicité nerveuse, provoquant la constipation et des troubles de la sensibilité [39]. La podophylotoxine est un alcaloïde extrait de la mandragore. On utilise en chimiothérapie deux de ses dérivés, isolés à la fin des années 1960, le téniposide et l'étoposide. Ils inhibent l'action de la topo-isomérase. Ils en réduisent la multiplication des cellules. Le taxol (paclitaxel) est extrait de l'écorce d'if. Comme son analogue le taxotère (docétaxel), il a une affinité pour la tubuline et stabilise les microtubules intracellulaires que les vinca-alcaloïdes déstabilisent. Ces deux dérivés de l'if ont un effet antitumoral important. La colchicine, alcaloïde extrait du colchique, est utile pour le traitement de la goutte. Elle n'est pas utilisée en cancérologie mais sert à bloquer les mitoses des cellules en culture pour étudier leurs caryotypes et leurs chromosomes. La morphine et la codéine sont des alcaloïdes, extraits du pavot, utilisés dans le traitement des douleurs intenses [36, 37].

La cocaïne est un anesthésique local, anesthésique de surface et bloque les échanges ioniques au travers de la membrane neuronale. Par ailleurs, la cocaïne est un

sympathomimétique, elle provoque une stimulation adrénergique en bloquant le recaptage de la noradrénaline [40].



**vinorelbine**



**R = CH<sub>3</sub>    vinblastine**

**R = CHO    vincristine**

**R = CH<sub>3</sub>    étoposide**

**R = Thiényl    téniposide**

**Figure 16 : quelques structures des alcaloïdes.**

## II.2.8. Terpènes :

### A. Définition :

Ce sont des produits naturels, formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isoprènes (voir figure 17) [41].

Les terpènes sont des hydrocarbures formés par plusieurs isoprènes. Ils forment une famille d'arômes (pour une bonne partie) très courant dans les végétaux.

La diversité des structures terpéniques naturelles rend délicate difficile toute tentative de généralisation [42, 43].

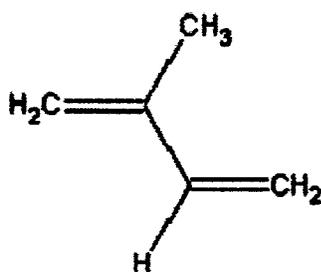


Figure 17 : structure de l'unité isoprène

Il est cependant utile voire indispensable d'insister sur le fait que l'existence des terpènes est conditionnée par trois séquences réactionnelles fondamentales :

- formation de " l'isoprène actif " à partir de l'acétate via l'acide mévalonique,
- couplage " tête à queue " des unités en C<sub>5</sub> justifiant l'existence des mono, sesqui, di, sester et polyterpènes,
- Couplage " queue à queue " des unités en C<sub>15</sub> ou C<sub>20</sub> justifiant l'existence des triterpènes.

La très grande majorité des terpènes est spécifique du règne végétal, mais cette spécificité n'est pas absolue [44].

### B. Propriétés physico-chimiques :

Le terpène insaturé est plus facilement oxydé. Il n'y a pas de fonction chimique commune aux terpènes, seule leur structure et leur biosynthèse en font une catégorie, aussi se contente-t-on ici d'en citer quelques exemples et certaines de leurs propriétés [41].

Les terpènes peuvent être classés par leur nombre de motifs isoprènes ainsi que par leurs arrangements :

- Les **monoterpènes** constituants odorants des essences végétales. Ils sont tous liquides. Dans ce groupe, on rencontre [42]:

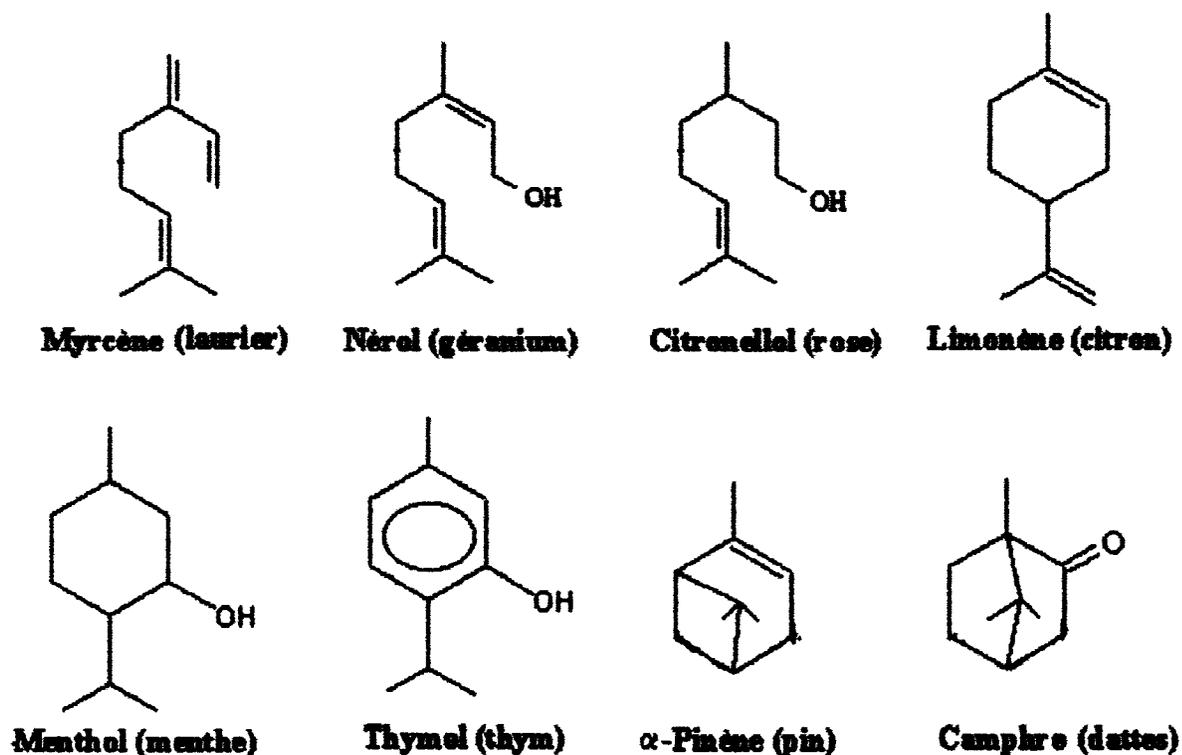
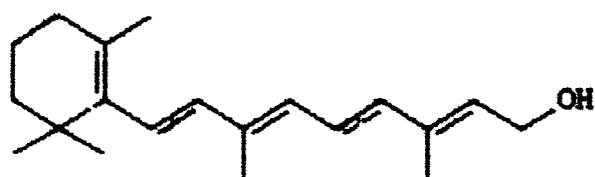


Figure 18 : quelques structures des monoterpènes.

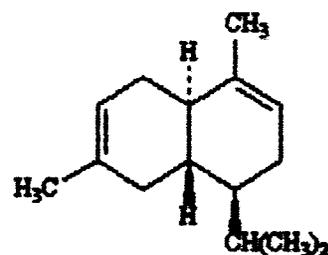
- Les **polyterpènes** regroupent les diterpénoïdes (constituants des résines), les sesquiterpénoïdes (constituants de cires d'insectes ou de microorganismes) et les triterpénoïdes (constituants universels de cellules végétales), voir figure 19 [44].

**Diterpènes**



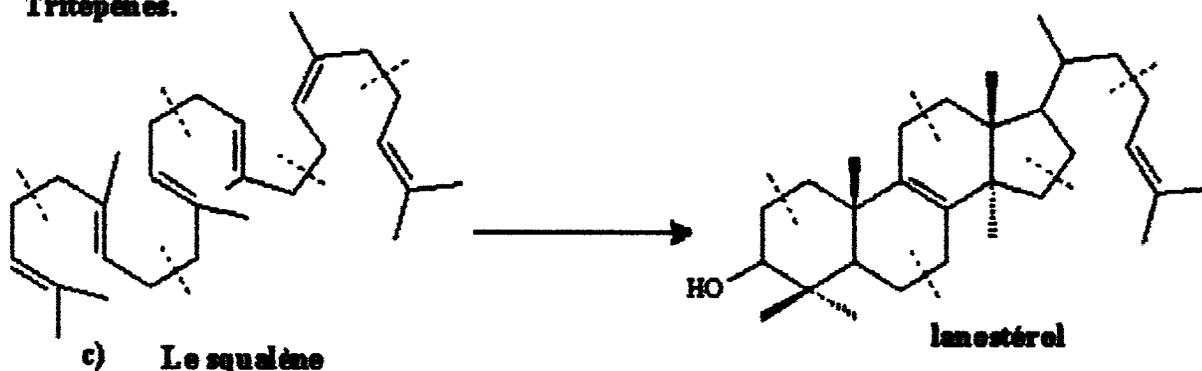
a) Vitamine A résultant de la coupure du carotène.

**Sesquiterpènes**



b)  $\beta$ -Cadinène (cade)

**Triterpènes**



c) Le squalène

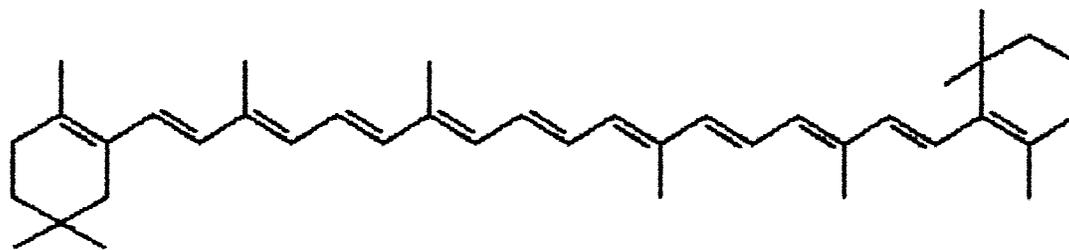
lanostérol

**Figure 19 : Structure des polyterpènes.**

Le lanostérol est ensuite transformé en cholestérol, c'est de plus un des constituants de la graisse de la laine de mouton.

**- Tétraterpènes :**

Le  $\beta$ -Carotène (voir figure 20) possède 11 doubles liaisons conjuguées, d'où sa couleur, qu'il donne aux carottes. Il joue un rôle essentiel dans la croissance et la vision, son oxydation provoque la coupure de la double liaison centrale et la formation de deux molécules d'un aldéhyde " le Rétinal " dont la réduction donne la vitamine A.



**Figure 20 : Structure du  $\beta$ -carotène.**

**- Polyterpènes :**

Le caoutchouc naturel est un polymère de l'isoprène. Il est produit par la coagulation par la chaleur de la sève de l'hévéa. Toutes ses doubles liaisons sont en Z, chaque molécule comporte de 1000 à 5000 motifs isopréniques. L'isomère où toutes les liaisons sont en E, est la gutta-percha qui est une matière dure et cassante, (voir figure 21).



**Figure 21 : Structures du caoutchouc et du gutta- percha.**

Les terpènes ne sont vraiment formés dans la nature à partir de l'isoprène, qui n'a jamais été détecté dans un organisme vivant. Le véritable précurseur universel de tous les terpènes est l'acide mévalonique.

**C. Les propriétés biologiques :**

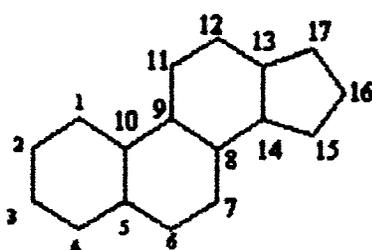
Les terpènes possèdent généralement des propriétés laxatives, antimicrobiques, antiseptiques, fongicides, insecticides et ils attirent les pollinisations.

Les diterpènes possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques comme le maintien du rythme cardiaque en cas d'affaiblissement, antihypertensive et anti-tumorale [42, 45].

**II.2.9. Stérols et Stéroïdes :**

**A. Définition :**

Les stérols et stéroïdes rencontrent dans la nature à tous les échelons du règne végétal et du règne animal, ils possèdent une structure chimique comportant un squelette perhydrocyclopentanophénatrène, avec une numérotation spécifique (voir figure 22) [43].



**Figure 22 : Structure du squelette des stérols et des stéroïdes.**

Les stéroïdes comportent généralement des méthyles en C<sub>10</sub> et C<sub>13</sub> et souvent une chaîne alkyle en C<sub>17</sub>. Les stérols comportent un hydroxyle en position C<sub>3</sub>.

$\alpha$  et  $\beta$  sont des affixes spécifiques selon que le groupe substituant est dessous ou dessus du plan de la molécule projetée selon le schéma précédent. Bien que n'étant pas des terpènes, ils sont biogénétiquement dérivés des triterpènes [41, 46].

### B. Propriétés générales :

Le cholestérol est le plus ancien des stéroïdes connus. Isolé dans les calculs biliaires dès le XVIII<sup>ème</sup> siècle. Sa formule globale fut établie en 1888 et sa structure complète en 1955. Il comporte 8 carbones asymétriques, un seul isomère, sur les 256 possibles, existe naturellement. Le cholestérol est-il formé dans les cellules nerveuses des mammifères soit sous forme libre soit sous forme d'ester d'acide gras. C'est un précurseur de l'acide cholique (acide biliaire) et des hormones stéroïdiques [46].

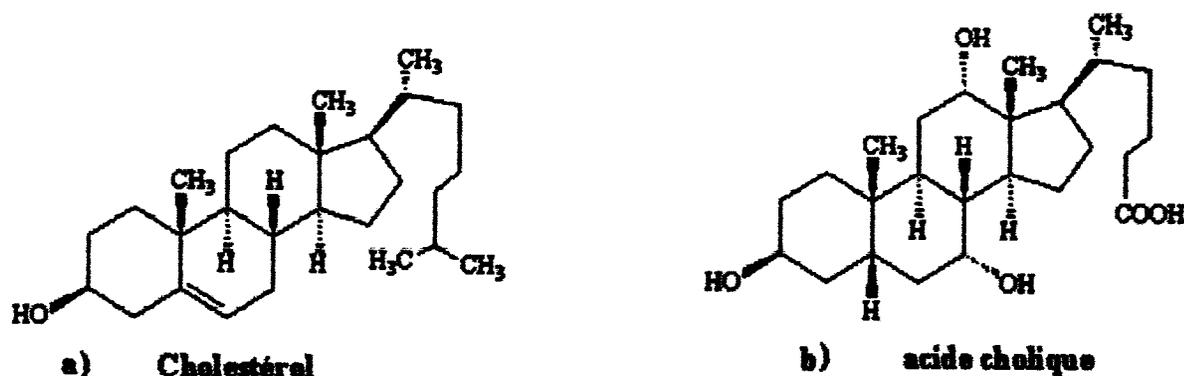
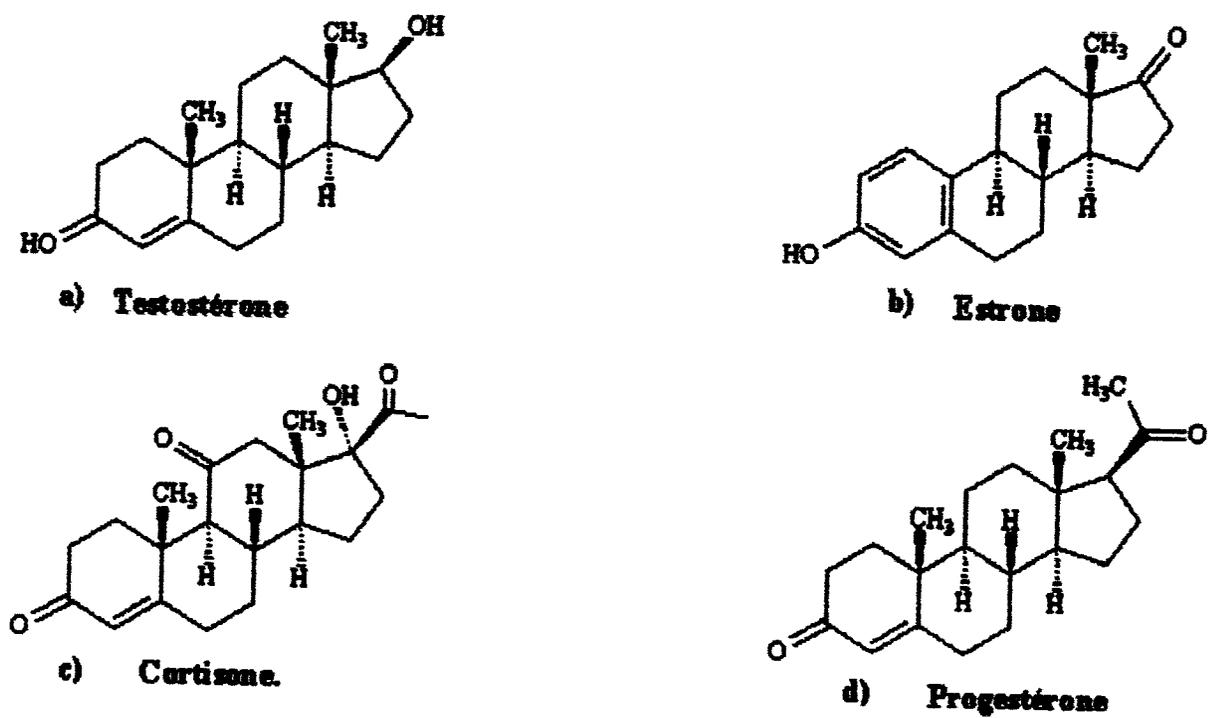


Figure 23 : Structure de cholestérol et de l'acide cholique

Les hormones sont des molécules émises par une glande dans le sang, chargée de transmettre une information à un organe récepteur, qui peut seul la reconnaître, afin de le faire agir. Elles ont des structures différentes, acides aminés, polypeptides ou stéroïdes. Ces dernières sont les hormones sexuelles. Elles règlent les caractères sexuels secondaires et la physiologie de la reproduction, (voir figure 24) [47].



**Figure 24 : Structures des hormones**

Les hormones mâles, la testostérone et l'androstérone, sont produites par les testicules. Les hormones femelles, l'œstrone (folliculine), l'œstradiol et la progestérone règlent le cycle menstruel et l'évolution de la grossesse.

L'usage des hormones sexuelles est le contrôle de l'ovulation et de différentes perturbations liées aux déséquilibres de la production naturelle d'hormones, traitement de l'ostéoporose post-ménopause etc.

D'autres hormones sont produites au niveau des glandes surrénales, la principale est la cortisone, utilisée comme anti-inflammatoire [47].

### **III. Généralités sur les huiles essentielles :**

#### **III.1. Introduction et Historique :**

La connaissance des propriétés bénéfiques des essences de plantes est une science ancienne. En Inde, des eaux aromatiques étaient utilisées il y a 7000 ans, en Mésopotamie, les huiles étaient utilisées il y a 4000 ans pour lutter contre les épidémies, à Babylone, on brûlait du cyprès, en Egypte l'usage de plantes aromatiques et des résines odorantes atteignit des sommets (embaumement des morts, cérémonies religieuses, désinfection des habitations, parfumage des cheveux et du corps...). A la même époque, les védas (livres sacrés de l'hindouisme) donnent des formules de bains et de massages à la cannelle, à la cardamome ou au gingembre [6].

La distillation serait née en Perse 1000 ans avant notre ère. L'essence de térébenthine fut probablement la première huile essentielle. Les Grecs et les Romains étaient de grands adeptes des onguents, des huiles parfumées et autres bains aromatiques [6].

Ce sont les Arabes qui ont perfectionné les techniques de distillation au Moyen-Age. Ainsi, Geber décrit la distillation sèche et la distillation aqueuse dès le IX<sup>ème</sup> siècle, alors qu'Ibn Sina dit Avicenne, le prince des médecins, développe l'utilisation des huiles essentielles dans certains traités [7].

En France, au XV<sup>ème</sup> siècle, les apothicaires portaient le nom d'"aromateri". Puis cette science fut oubliée avec l'avènement de la civilisation industrielle. C'est en 1928, qu'un chimiste français, R.M. Gattefossé, ressuscite l'aromathérapie par accident : sa main, brûlée par une explosion et plongée par réflexe dans le "premier liquide" à la portée des mains, guérit rapide et sans trace. Il s'agissait d'huile essentielle de lavande [7].

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition biochimique analysable [5].

#### **III.2. Définition :**

Les huiles essentielles ou essences aromatiques végétales sont des liquides odorants et très volatils, de consistance huileuse, insolubles dans l'eau sans ajout d'émulsifiant, elles se dissolvent rapidement dans les huiles végétales grasses et dans l'alcool. Les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.). Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, soit dans le calice, l'écorce ou tout autre partie de la plante [48, 49].

Selon A.F.N.O.R., les huiles essentielles sont obtenues par distillation lente à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques soit par distillation sèche. Elles sont localisées surtout dans les fleurs et les feuilles, on les trouve également dans le bois, l'écorce, les fruits, les graines, les racines. Elles sont synthétisées naturellement grâce à l'énergie du soleil par des cellules sécrétrices, puis stockées dans des poches parfois visibles à l'œil nu (feuilles d'orangers, etc.) [50].

L'huile essentielle est un concentré de principes actifs (enzymes, polysaccharides, alcaloïdes, terpènes, tanins, résines, etc.) et il faut souvent de très grandes quantités de plantes pour obtenir quelques gouttes d'huile essentielle ou essence (100 kg de violettes pour 30 g d'essence ou encore 115 kg de pétales de rose pour 25 ml). D'où l'importance d'une bonne conservation : à l'abri de la lumière (flacons sombres), de l'air et de la chaleur; on pourra les conserver de 12 à 18 mois selon la plante [5,48].

### **III.3. Rôle des H.E. pour le règne végétal :**

On ne sait pas exactement ce que représentent les huiles essentielles pour le règne végétal. Certains pensent qu'il s'agit d'hormones végétales, d'autres disent que les huiles essentielles sont des messagers entre les insectes et les plantes. Toujours est-il que les plantes les utilisent aussi pour se protéger contre les virus et toute sorte de parasites et de microbes[51].

D'un point de vue traditionnel, on considère que l'huile essentielle, par son pouvoir attractif sur l'eau, produit une ambiance propice à la protection des végétaux ; elle les entoure d'une véritable "aura" composée de vapeur d'eau et d'arôme. On peut établir un parallèle entre cette protection physiologique du monde végétal et l'action des huiles essentielles sur le psychisme humain. On peut parler de "protection psychique" engendrée par les essences [51].

### **III.4. Biosynthèse aromatique :**

Le soleil constitue la source d'énergie de la vie terrestre. Sans l'énergie du rayonnement solaire aucune forme de vie ne pourrait exister sur terre. Les végétaux qui ont constitué le premier maillon de la chaîne vitale, il y a 3,5 milliards d'années (cyanobactéries ou algues bleues), tirent leurs ressources des éléments constitutifs de leur univers : soleil (lumière-énergie du rayonnement solaire), air (oxygène et gaz carbonique), terre (minéraux et oligo-éléments) et eau (substances en solution) [6].

Les composés aromatiques des plantes (essences, baumes), sont des sous-produits de la photosynthèse, élaborés dans des cellules sécrétrices spécialisées situées dans les fleurs,

fruits, feuilles, écorces, bois et racines [7]. Par l'intermédiaire de divers systèmes enzymatiques, auront lieu les synthèses des molécules finales. Les deux voies principales de la production des essences sont la voie des terpénoïdes et celle des phénylpropanoïdes. (Voir figure 25 : Schéma général de la biosynthèse des huiles essentielles [9]).

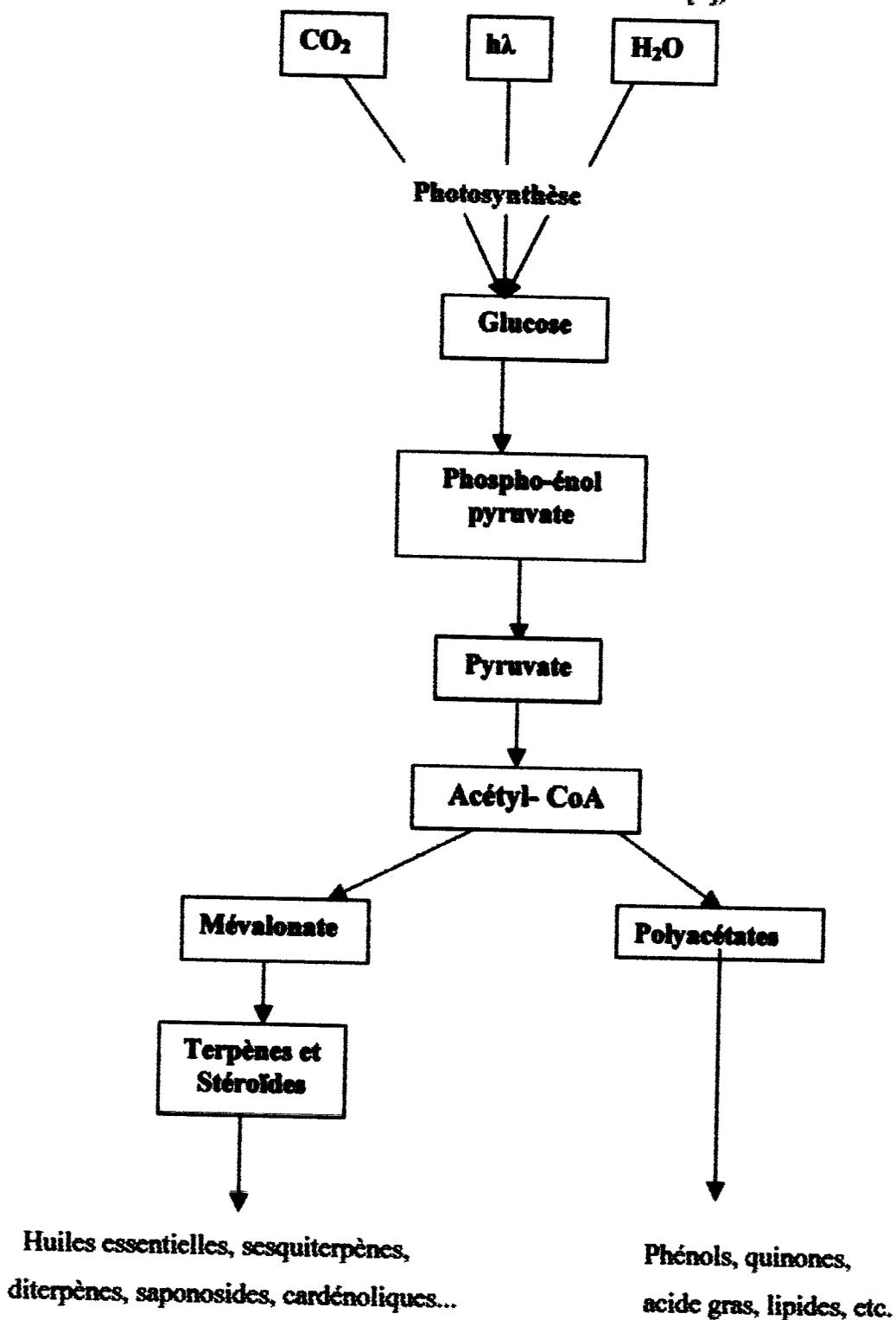


Figure 25 : Schéma général de la biosynthèse des huiles essentielles [9].

Elaborés à partir des même précurseurs, les terpénoïdes et les stéroïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux.

Selon les chercheurs, tous les terpénoïdes sont construits à partir d'unités isoprénique. Toutefois, l'isoprène n'a jamais pu être isolé. Par contre, on a trouvé dans les tissus vivants un intermédiaire : l'acide mévalonique (voir figure 26 [43]).

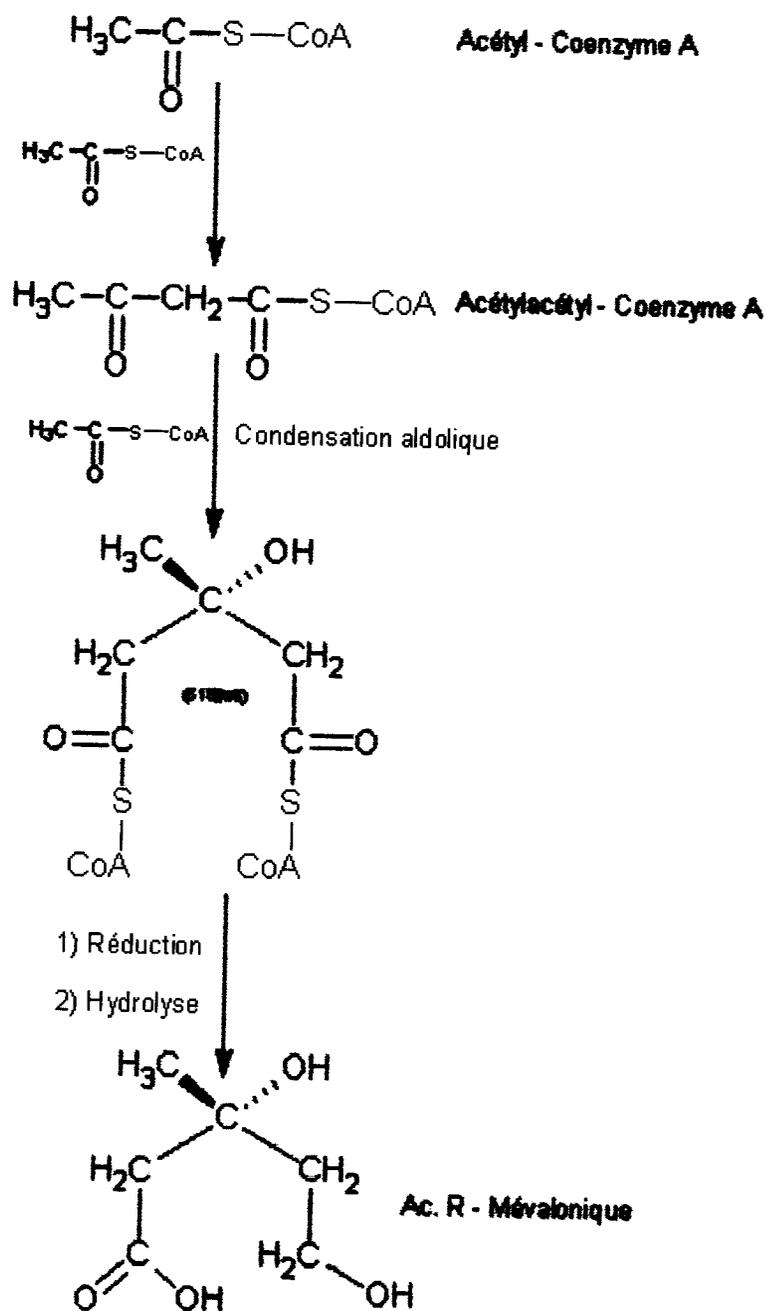


Figure 26 : Biosynthèse de l'acide mévalonique [43].

La première étape est l'activation de la molécule d'acide acétique. Ceci est réalisé par estérification avec le groupe thiol d'une molécule complexe, le coenzyme A, que nous écrirons HS-CoA. Le méthyle du thiol-ester formé, l'acétyl-CoA est très réactif.

La condensation aldolique de l'acétyl-CoA sur l'acétoacétyl-CoA conduit au (3S) 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA. Celui-ci est ensuite irréversiblement réduit par le NADPH en acide (3R) mévalonique (MVA). L'autre isomère n'agit pas comme précurseur.

L'isomérisation de celui-ci fournit une molécule hautement réactive, le pyrophosphate d'isopentén-2-yle ou le diméthylallylpyrophosphate (DMAPP) qui peut facilement s'ioniser.

Le MVA est activé (enzymatiquement) par phosphorylation. Une élimination avec décarboxylation donne ensuite l'isopenténylpyrophosphate (IPP) [41], (voir figure 27 [43]).

Les terpènes sont biosynthétisés à la suite du couplage d'au moins 2 entités à 5 carbones dont la structure est celle de l'isoprène ou 2-méthylbuta-1,3-diène. Selon le nombre de ces entités les terpènes sont classés en monoterpènes à 10 carbones, sesquiterpènes à 15 carbones, diterpènes à 20 carbones, tétra, etc.

La diversité des structures terpéniques naturelles rend délicate sinon difficile toute tentative de généralisation. Il est cependant utile voire indispensable d'insister sur le fait que l'existence des terpènes est conditionnée par trois séquences réactionnelles fondamentales :

- Formation de l'isoprène actif à partir de l'acétate via l'acide mévalonique.
- Couplage tête à queue des unités en C<sub>5</sub> justifiant l'existence des monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, sesterpènes et polyterpènes.
- Couplage queue à queue des unités en C<sub>15</sub> ou C<sub>20</sub> justifiant l'existence des triterpènes.

Hormis ces trois séquences capitales le reste de la biosynthèse sera facilement interprété comme une suite de réactions très classiques pour l'organicien : formation d'ions carboniums par solvolysse de pyrophosphates allyliques, ouverture d'époxydes ou protonation d'une double liaison ; cyclisations électrophiles, réarrangements de type Wagner-Meerwein et autres, etc. [43, 44].

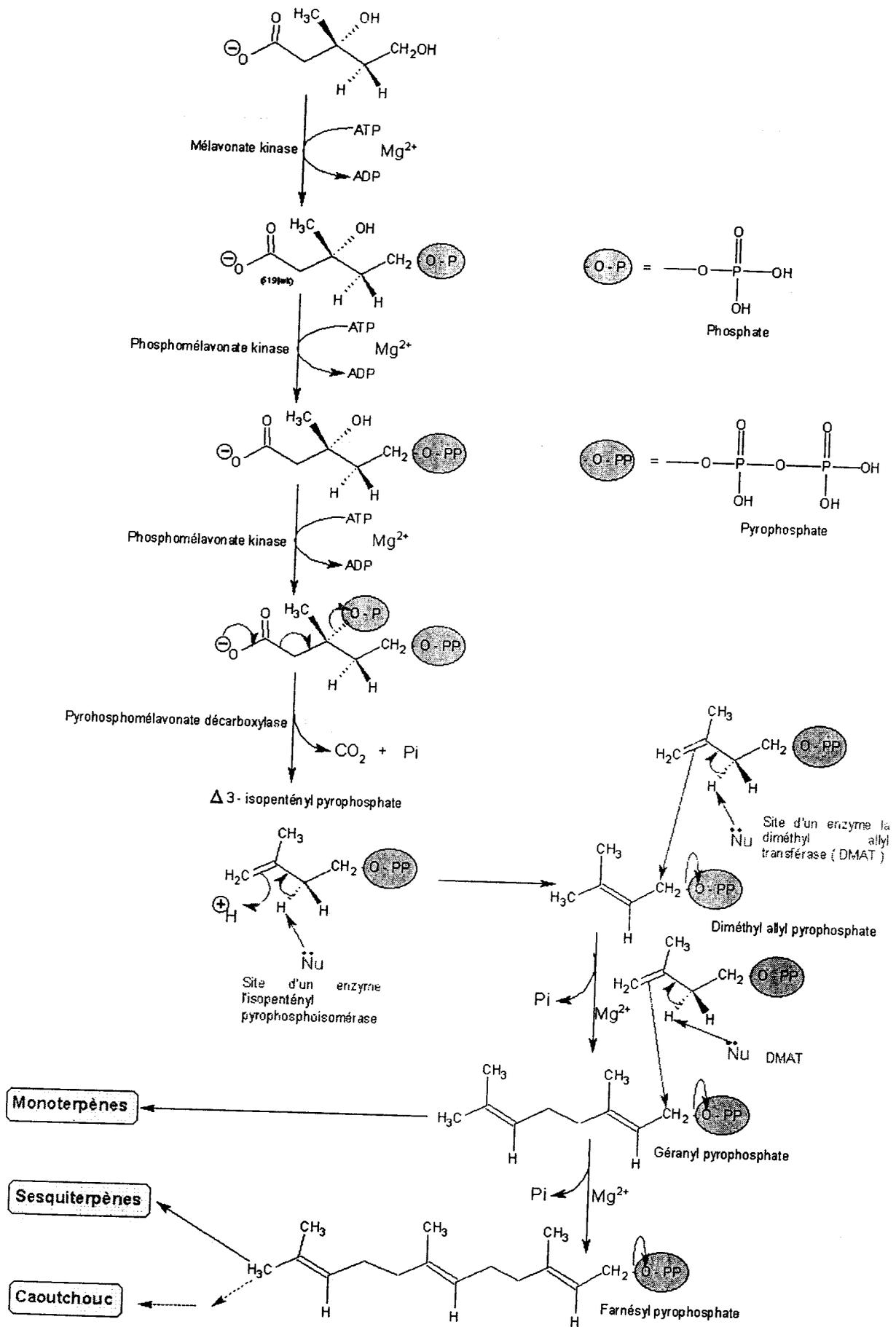


Figure 27 : Biosynthèse des terpénoïdes via le mévalonate [43].

### III.5. Différents procédés d'obtention des H.E. :

Il existe plusieurs méthodes pour l'extraction des huiles essentielles :

- Expression à froid ou **macération**, qui est un procédé discontinu qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à température ambiante, chaud ou à l'ébullition, pour en extraire les constituants solubles [6].
- **L'Expression** : procédé le plus simple. On l'utilise quand l'huile essentielle existe en quantité suffisante pour couler d'elle-même. C'est le procédé quasi exclusif des hespéridés (citron, orange etc.). Il est parfois produit industriellement en même temps que les jus de fruits : le fruit entier est pressé fortement, puis le jus et l'essence sont séparés par centrifugation [6].
- Extraction par **solvants organiques volatils** qui fixent les substances aromatiques des végétaux. Après évaporation des solvants, on a un mélange d'essence et de composés de type huile grasse, cire, pigments, etc. C'est une méthode industrielle qui permet une extraction sélective des huiles essentielles, mais le produit final sera moins fin et contiendra parfois des traces de solvant [6].
- **L'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique** : Dans cette technique, un courant de CO<sub>2</sub> à forte pression fait éclater les poches à essence, et entraîne les huiles que l'on récupère en l'état [6].
- Extraction par **enfleurage**, c'est une méthode plus guère utilisée, car trop complexe, sauf pour les fleurs principalement. Celles-ci sont étalées délicatement sur des plaques grasses (cires, vaselines...) qui absorberont tout le parfum. Les corps gras vont ensuite être épuisés par un solvant (alcool, éther...). Une fois l'arôme des fleurs absorbé on remet des fleurs fraîches, et ceci jusqu'à saturation du corps gras. Au bout de 24 heures, le corps gras et les huiles essentielles sont séparés. Il ne reste plus qu'à recueillir la précieuse huile essentielle [6].
- Extraction par distillation à la vapeur d'eau. Toutes les autres huiles essentielles sont obtenues par **distillation** à la vapeur d'eau, sans solvant chimique et sous basse pression, ceci pour conserver intactes toutes les propriétés des plantes [6]. Parmi les différents modes d'extraction nous citons principalement :
  1. La méthode de **Parnas-Wagner** ou entraînement à la vapeur : Le matériel végétal est placé sur une grille perforé au-dessus de la base de l'alambic et n'est pas en contact avec l'eau. Les principes volatiles sont entraînés par les vapeurs d'eau puis refroidis et enfin séparés de la phase par décantation [49].

## **Chapitre II :**

**Etude générale**

***de Ruta chalepensis L.***

## **I. Introduction :**

L'utilisation de *Ruta chalepensis* L. (Rue) par l'homme remonte à fort longtemps, puisque dans l'antiquité déjà, les Egyptiens, les Perses, les Grecs savaient procéder à leurs extractions et mettaient à profit leurs propriétés aromatiques et médicinales.

Au début du XVI<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation de Rue aussi pour alléger la douleur d'audition ou contre les maladies nerveuses, l'états grippaux, la toux, l'arthrite, les varices, les blessures légères, le rhumatisme, les règles douloureuses, la douleur de rein, et de poitrine et l'inflammation de la gorge [1, 2].

En effet, *Ruta chalepensis* L. encore très utilisées dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, abortif, antiépileptique, emménagogue et pour le traitement de pathologies cutanées [3, 4].

*Ruta chalepensis* L. est un petit arbrisseau de la famille des rutacées, le nom rutacée est ancien dérivé d'un mot grec reuo, dont la signification est de " qui libère, qui protège ", il fait allusion aux propriétés médicinales de ces plantes qui avaient la réputation de " soulager " les maux de l'empoisonnement. *chalepensis* signifiant " d'Alep " (ville de Syrie), indique le lieu d'origine des spécimens ayant servi à identifier et classer cette espèce en premier lieu ou simplement l'abondance de celle ci, dans la région. Toute la plante écarte un parfum grave, particulier, en raison de l'essence que contiennent toutes ses parties : dans les feuilles, dans ce qui est sépale et dans les pétales [5, 6].

## **II. Rutaceae :**

### **II. 1. Définition :**

Selon L. Watson et M. J. Dallwitz, (1992) [7], l'aire de distribution de la famille des rutacées s'étend aux régions tempérées chaudes et tropicales des deux hémisphères. Cette famille de plantes dicotylédones qui comprend 160 genres et de 1 300 à 1 600 espèces dont beaucoup sont très importantes pour l'homme, qui a d'autre part obtenu de nouvelles variétés. Il s'agit en général de plantes ligneuses (arbres ou arbustes souvent xérophytes et fréquemment aromatiques, parfois épineux), aux feuilles simples ou composées, sans stipules, éparses ou opposées. Un de leurs caractères communs est la présence sur les feuilles de glandes oléifères qui apparaissent par transparence comme des points translucides. Toutes les parties de la plante possèdent en outre des tissus sécrétant des huiles essentielles à odeur aromatique.

Les fleurs, généralement régulières et hermaphrodites, sont formées par 4 ou 5 sépales imbriqués, libres ou non, et par 4 ou 5 pétales généralement libres. Les carpelles sont soudées en un gynécée à ovaire pluriloculaire supère, parfois infère.

On peut diviser cette famille en deux sous-familles [4] : les rutoïdées et les aurantioïdées.

1. Les rutoïdées comprennent plusieurs genres comme :

- **Ruta** : les plantes de ce genre sont vénéneux et aromatique.
- **Dictamnus** : des produits très utilisés en parfumerie, sont extraits des plantes de ce genre.
- **Pilocarpus** appelé aussi **Jaborandi** : les plantes appartenant à ce genre, possèdent des propriétés diurétiques et sudorifiques.
- **Xantoxylum** : les fruits et les écorce de ces plantes sont aromatiques.
- **Phellodendron** : L'écorce de ces plantes donne un liège d'une qualité inférieure à celui de "*Quercus suber*".

2. Les aurantioïdées : c'est un groupe de plantes sempervirentes d'une très grande importance économique pour leurs fruits et les agrumes. Ces fruits possèdent une très grande valeur alimentaire, surtout pour leur contenu en vitamine C et P. Ils sont comestibles. Ils sont également utilisés pour fabriquer des confitures, des bonbons, des boissons, des liqueurs et dont on extrait de l'acide citrique, du calcium ou du citrate, et surtout des huiles essentielles utilisées en parfumerie [8].

## II. 2. Caractéristiques générales :

Les caractères morphologiques de cette famille sont assez variables. Le plus caractéristique est la présence de glandes à huiles essentielles visibles sur les feuilles sous la forme de point translucides.

Ce sont des arbres ou des arbustes, ou très rarement des plantes herbacées, producteurs d'huiles essentielles des régions tempérées à tropicales.

Les fruits sont des baies, des drupes, des samares, des capsules ou des follicules [9].

On peut citer :

- Le genre *Citrus* dont les différents croisements ont abouti à l'éventail des fruits comestibles que nous connaissons.
- Le genre "*Ruta*" avec par exemple la rue officinale.
- Les genres qui étaient placés dans la famille des Ptaéroxylacées.

### III. Présentation générale de la plante :

#### III.1. Synonymes :

Des noms vernaculaires lui sont connus : [10]

**Arabe** : fidjel, sadab.

**Castillan** : arruda, rude.

**Portugais** : arruda.

**Français** : rue, péganion, grande rue, rue fétide.

**Italien** : route, rua, aruga aimerait, erba ruga, ricola, arruda.

**Anglais** : wine rue, rue, herb-of-grace.

**Allemand** : Raute, WinRaute, Edelraute, Gartenraute.

#### III.2. Description botanique de *Ruta chalepensis* L. :

D'après **Quezel et Santa, (1963)** [11], **Beniston, (1984)** [6], **Monterde P. (1986)**[12]. *Ruta chalepensis* L., est une plante aromatique, spontanée ou cultivée, vivace à tiges dressées, de taille moyenne jusqu'à 90 cm, glauque, glanduleuse dans le haut, à feuilles 2 à 3 fois divisées en segments oblongs, alternes d'un vert souvent jaunâtre découpées en segments de forme ovales, inflorescence terminale (voir figure 28 [13]). Les fleurs jaunes assez grandes, sur des pédoncules ramifiés partant de l'aisselle des feuilles ou au sommet de la tige, s'épanouissent de février à juin. Le calice à 4-5 sépales ovales, est nettement plus court que les 4-5 pétales étalés, dans lequel les pétales présentent des divisions ou laciniées marginales nombreuses et fines, concaves et bordés par une frange de filaments allongés. L'ovaire à 4-5 lobes est muni de 8-10 fossettes à nectar, et entouré par les 8-10 étamines (voir figure 29 et 30 [13]).



**Figure 28 : photo de *Ruta chalepensis* L. en pleine floraison.**

Les fruits à capsule lobée, déhiscente à sa partie supérieure par 4 fentes (voir figure 31 [13]). Il s'ouvre au sommet à maturité, libérant des graines brunâtres, oblongues, déprimées et verruqueuses, à embryon courbe et albumen charnu. La plante dégage une odeur forte et pénétrante, désagréable et fétide. La saveur est âcre et amère.



Figure 29 : fleurs

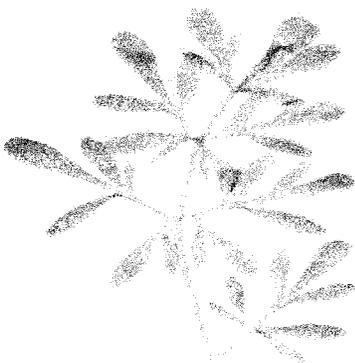


Figure 30 : feuille

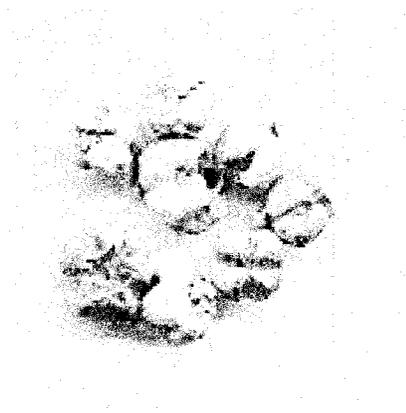


Figure 31 : fruits

### III.3. Systématique et Classification :

L'organographie et l'anatomie des plantes permettent de regrouper un certain nombre de caractères communs à plusieurs groupes de végétaux. Elles retiennent aussi quelques caractères originaux et différentiels.

Le tout permet d'établir une classification appelée systématique.

#### III.3.1. Classification :

D'après **Quezel et Santa** en 1963 [11], nous pouvons classer notre plante selon la clé de détermination suivante :

**Embranchement** : Phanérogame.

**Sous-embranchement** : Angiosperme.

**Classe** : Dicolypétale.

**Sous classe** : Dialypétale.

**Famille** : Rutacée.

**Genre** : *Ruta*.

**Espèce** : *Ruta chalepensis* L.

D'après **Quezel et Santa.**, (1963) [11], Il existe trois sous espèce différente :

- ***Ruta Angustifolia* L.** : Franges des pétales aussi longues que la largeur de ceux ci, bractée de l'inflorescence très petites 1-1,5 mm. On la trouve dans toute l'Algérie.

- = *Ruta Graveolens* L.: est une espèce très semblable à *Ruta chalepensis* L., qui se distingue de précédente dans laquelle les pétales présentent des divisions ou laciniées marginales nombreuses et fines. On la trouve dans toute l'Algérie sauf sur les hauts plateaux et l'Atlas saharien aride.
- = *Ruta Linifolia* L.: appelé aussi *Ruta Montana* Glas. Franges des pétales égalant au plus la demi longueur de ceux-ci, bractées ovales largement foliacées, longues de 3-4 mm. On la trouve dans toute l'Algérie sauf sur les hauts plateaux et l'Atlas saharien aride.

D'après Gernier et Goll, (1961) [14], Honnic et Donin, (1990) [15], *Ruta chalepensis* L. appelé aussi *Ruta angustifolia* (grande rue) et sa sous espèce *Ruta Bracteosa* (rue d'Algérie). Ce sont des plantes vivaces glauques, à odeur très désagréable.

### III.3.2. Caractéristiques :

Si la propriété dans la systématique la plus utilisée est celle donnée par P. Jéat, (1990) [16]. Que nous pouvons résumer comme suit :

#### 1. Organes reproducteurs :

- = Type d'inflorescence: racème de racèmes
- = Répartition des sexes: hermaphrodite
- = Type de pollinisation: entomogame
- = Période de floraison: février à juin

#### 2. Graines :

- = Type de fruit: capsule
- = Mode de dissémination: barochore.

#### 3. Habitat et répartition :

- = Habitat type: garrigues méditerranéennes occidentales.
- = Aire de répartition: région méditerranéenne.

### III.4. Habitat et distribution :

*Ruta chalepensis* L. est originaire de la méditerranée, l'Europe méridionale, l'Eurasie et les Iles Canaries, et a une distribution cosmopolite, en étendant par ce qui est du Sud-Est de l'Europe Nord de l'Afrique, régions méditerranéennes et zones tempérées subtiles.

**Climat :** c'est une plante héliophile, qui vit en plein soleil, bien qu'elle tolérée aussi isomiombre. Elle préfère des situations sèches, rocheuses et abritées. Elle est résistante aux gels, en tolérant jusqu'à  $-15^{\circ}\text{C}$  [17] .

**Sol :** elle croît dans des sols calcaireux, chauds, drainé, pierreux et perméable. Les sols argileux compacts ne lui conviennent pas [18].

**Culture :** puisqu'elle est propagée par les pieux des tiges et elle croît de manière éternelle dans des terrains fertiles, alors les récoltes fréquentes du feuillage sont possibles [19].

### **III.5. Huile essentielle :**

#### **III.5.1. Propriétés physico-chimiques :**

Pour toutes les huiles essentielles, on exigera évidemment l'analyse complète, à la fois des constantes physiques et chromatographiques. Par ailleurs, disposer des constantes analytiques physico-chimiques ne saurait dispenser d'effectuer les recherches d'ordre pharmacologique, desquelles pourront être déduites de manière plus exacte les propriétés thérapeutiques [20]. D'une manière générale, les essences possèdent en commun un certain nombre de propriétés physico-chimiques (voir chapitre I), selon une étude expérimentale sur Rue de la zone méditerranéenne [21], huile essentielle du *Ruta chalepensis* L. a :

- Une densité spécifique à  $20^{\circ}\text{C}$  varie de 0.81 à 0.86, il proche de la densité de 2-undécanone (0.853) et Limonène (0.844).
- Les valeurs des miscibilités à l'éthanol à 70% varie de 1 à 4 volume.
- Un indice de réfraction à  $20^{\circ}\text{C}$  varie de 1.4250 à 1.4560.
- Point de congélation varie de  $-16$  à  $+7^{\circ}\text{C}$ .

#### **III.5.2. Composition chimique de *Ruta chalepensis* L. :**

*Ruta chalepensis* L. contient dans toutes ses parties, une huile essentielle (0,7-2,0 %) qui contient des dizaines de composants organiques, dont le constituant majoritaire est le 2-undécanone (75 %). D'autres constituants sont présents en quantités variables tels que : le 2-nonanone, des acides en quercétol et rutinose  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$  et les flavonoïdes, elle contient une substance qui lui doit son nom, la rutine ou rutoside, proche de la vitamine P, de formule  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$  [22, 23].

Par ailleurs, le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les différentes familles de composés chimiques existantes dans la plante de *Ruta chalepensis* L., (voire figure 32). Plusieurs études faites sur cette plante par des chercheurs de différent pays, ont abouti à la séparation et l'identification des composés chimiques de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la

chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) et chromatographie sur couche mince (CCM) [24, 25, 26 ].

L'étude des **coumarines** de *Ruta chalepensis* L. a permis d'identifier [26, 27, 28] :

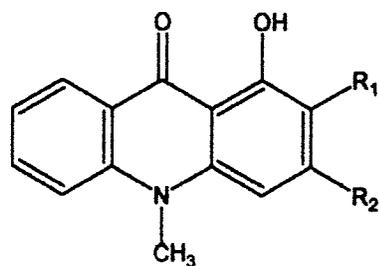
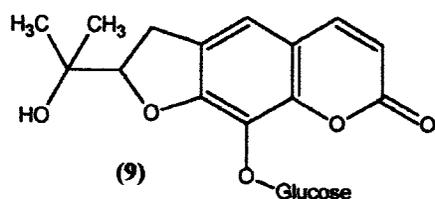
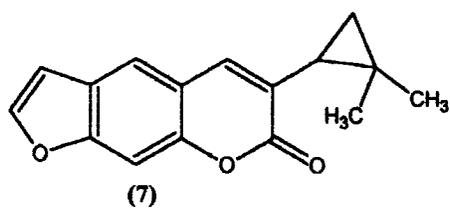
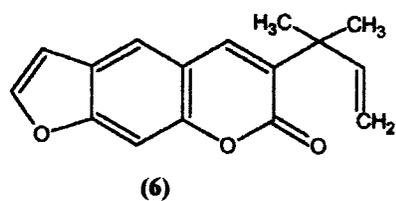
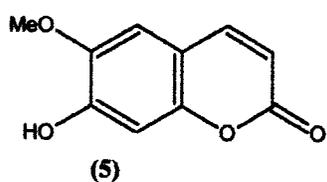
- des furocoumarines : la Psoralen (1), la Bergapten (2), la Xanthotoxin (3), l'Isopimpinellin (4), la Scopolétol (5), la Chalepensisine (6) et la Clausindine (7).
- des coumarines glucosidiques : Daphnorétine (8) et la Rutarensine (9).

L'étude des **alcaloïdes** de *Ruta chalepensis* L. a permis d'identifier [26, 29, 30] :

1-hydroxy-10-méthylacridone (10), Arborinine (11), Dictamine (12), Kokusaginine (13), Skimmianine (14), Rutacridone (15), Rutacridon-epoxide (16), (-) Pumiliotoxine (17), (-)- $\alpha$ -Subine (18), Graveoline (19), Graveolinine (20).

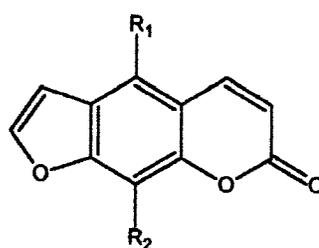
L'étude des **stérols et stéroïdes** de *Ruta chalepensis* L. a permis d'identifier [26, 31]:

Sitostérol (21), Rhodexin A (Sarmentogenin 3-O- $\alpha$ - rhamnopyranoside) (22), Tétracétate Rhodexin A (23).



10  $R_1 = R_2 = H$

11  $R_1 = R_2 = OCH_3$

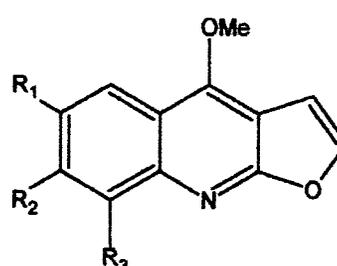
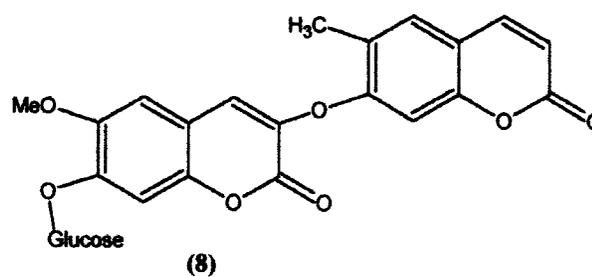


(1)  $R_1 = R_2 = H$

(2)  $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

(3)  $R_1 = H, R_2 = OCH_3$

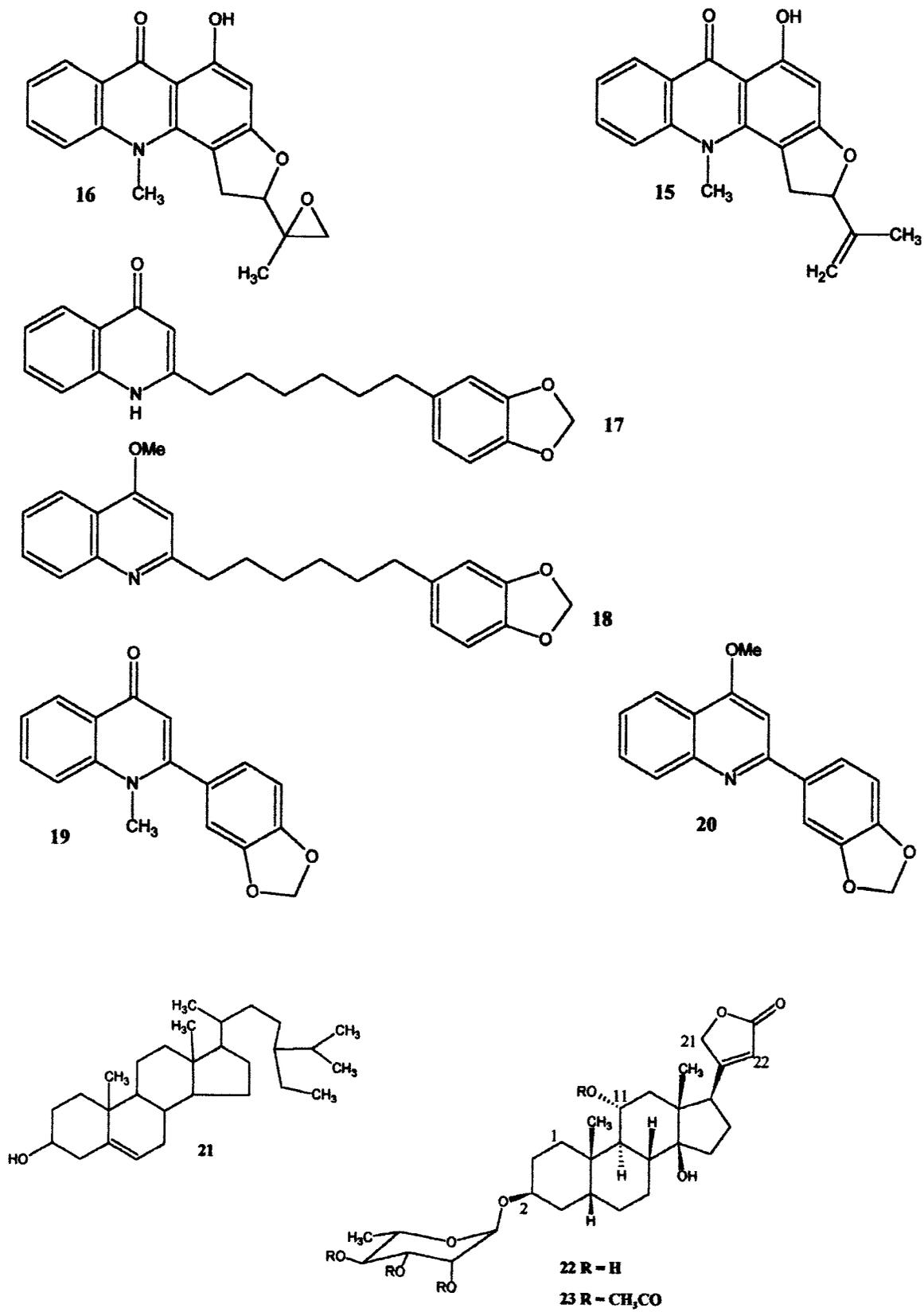
(4)  $R_1 = R_2 = OCH_3$



12  $R_1 = R_2 = R_3 = H$

13  $R_1 = R_2 = OCH_3, R_3 = H$

14  $R_1 = H, R_2 = R_3 = OCH_3$



**Figure 32** : Les différentes familles de composés chimiques de *Ruta chalepensis* L.

### **III.7. Synthèse de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. :**

Comme tout produit de luxe, l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. est confrontée à de nombreuses contrefaçons. Sa composition chimique confère à l'huile des propriétés précises permettant son authentification. L'huile de synthèse n'est fabriquée qu'à partir des constituants présents en majorité dans l'huile naturelle, essentiellement des monoterpènes et des monoterpènes oxygénés, tels que le limonène, 2-nonanone, 2-octanone, 2-undécanone, 2-décane, 2-dodécanone, et 2-tridécanone. Cependant, elle ne contient pas un isomère du 2-nonanol et 2-undécanol responsable du pouvoir anti-microbien dans l'huile naturelle [31].

C'est grâce à l'absence de ce constituant que l'on peut détecter, par spectrophotométrie, la présence d'huile de synthèse dans les produits. La faible diversité des constituants de cette huile limite ses qualités organoleptiques. Cependant, elle peut représenter un avantage économique pour les utilisateurs grâce au moindre coût de son procédé d'élaboration [32].

D'un point de vue économique, l'huile de synthèse présente des avantages pour les utilisateurs. Cependant, son élaboration à partir de 7 constituants, au lieu de 148 pour l'huile essentielle naturelle, en limite les propriétés physico-chimiques. Si celle-ci n'apparaît pas compatible avec l'élaboration de produits de haute qualité, elle est adaptée à la fabrication de produits de consommation de masse [33].

L'huile naturelle ne peut être remplacée par l'huile de synthèse dans les produits de qualité [31].

### **III.8. Usage de la plante :**

#### **1. Culinaires [34, 35] :**

- Les feuilles hachées finement sont servies en salade en petite quantité en Italie et en Allemagne.
- En petite quantité également, les feuilles fraîches ou séchées servent à aromatiser les fromages, les viandes, la volaille, les jus de légumes, les ragoûts et les vins.
- En Angleterre, les feuilles étaient autrefois bouillies avec de la mélasse pour les conserver longtemps.
- Les feuilles séchées servent à faire un thé emménagogue qu'on ne doit toutefois pas prendre tout de suite après les repas.
- Les Italiens utilisent la rue pour aromatiser un vin nommé "Grappa con Ruta". La rue aromatisé aussi les alcools de type Vermouth.
- Les Africains du Nord utilisent les graines dans la préparation d'un vin de palme.

- Les Éthiopiens broient les graines pour en faire une sauce forte et utilisent les feuilles comme présure. Ils mélangent également les feuilles avec les feuilles de café pour en faire un breuvage semblable au café.
- Au Moyen-Orient, la Rue est utilisée dans la fabrication d'un produit à base de beurre de chèvre ou de brebis qui se conserve pendant quatre mois.
- L'industrie alimentaire utilise l'huile de rue comme aromate de type "noix de coco" dans la fabrication de breuvages non-alcoolisés, pâtisseries, bonbons, produits laitiers glacés et poudings. A très fortes doses c'est un véritable toxique.
- L'huile de Rue est utilisée en parfumerie.

## 2. Médicinales :

- **Doses** : Règle générale, 1 à 5 gouttes d'huile essentielle de Rue en infusion ou en décoction représente une dose typique. En santé animale, **Bairacli-Levy, J.** conseille une demi-poignée de Rue dans 800 ml d'eau qu'on administre à raison d'une tasse deux fois par jour [37].
- **Peau** : L'effet de la Rue sur la peau revêt deux aspects. D'une part, la rue, comme plusieurs rutacées et certaines ombellifères, contient des composés susceptibles de provoquer des dermatites sous l'action du soleil [38]. D'autre part, il est reconnu depuis longtemps que le jus ou la sève des feuilles de la Rue sert d'antidote contre les morsures de serpent, les piqûres d'insectes et les allergies dues aux plantes. Elle servirait également à soigner les maladies de peau comme le psoriasis ainsi que les blessures [39].
- **Système nerveux** : La Rue est antispasmodique. Les Arabes en mâchent les feuilles, ce qui est sensé calmer tout trouble d'origine nerveuse. Les feuilles fraîches écrasées en application externe soulagent la sciatique. Traditionnellement, la Rue était utilisée dans les cas d'épilepsie. Les victimes de la maladie portaient des feuilles de Rue au cou pour prévenir les crises [40].
- **Circulation sanguine** : Une des propriétés reconnues de la Rue par Metzger, F.W., est sa capacité pour abaisser la pression artérielle, ce qui en fait une plante utile pour le traitement des vaisseaux sanguins. La Rue accroît également le flot sanguin du système gastro-intestinal, protégé dans le cas de coliques ou troubles digestifs [41].
- **Sens** : Les anciens reconnaissaient les vertus de la Rue dans les cas de trouble de la vue. En homéopathie, le jus extrait des plantes fraîches est utilisée pour

renforcer la vue, il conseille pour soigner les cataractes de dissoudre les fleurs de Rue dans un plat d'eau peu profond exposé au soleil. On baigne les yeux plusieurs fois par jour avec le liquide jaune obtenu en pressant les fleurs ayant trempées dans l'eau [37]. Le jus chauffé soulagerait également les maux d'oreilles.

- **Fertilité** : Le pouvoir de la Rue est redoutable en ce domaine, la plante agissant sur l'utérus. En petites doses, la Rue est bonne pour le soulagement des dysménorrhées. A plus forte dose, la Rue est abortive et son utilisation a donc été envisagée comme "pilule du lendemain". Gandhi et Lal en 1991 [42] ont déterminé que les racines broyées, les parties aériennes et l'extrait à l'eau des parties aériennes ont des propriétés anti-conceptives qui ne sont pas attribuable à la rutine. Autrefois, la Rue était utilisée comme anaphrodisiaque pour encourager à la chasteté.
- **Parasites** : La Rue est un antihelminthique, un vermifuge et un anti-amibien [43].
- **Autres** : la Rue serait aussi bonne pour renforcer les os et les dents [41].
- **Usage vétérinaire** : La Rue a déjà été employée dans de nombreux remèdes vétérinaires surtout pour aider à la délivrance et contre la météorisation chez les bovins, caprins et ovins. D'autres usages, ceux-là empiriques, incluent le traitement des fièvres persistantes des bovins, des parasites intestinaux, de la morve des chevaux, des parasites externes et la prévention de la rage [39]. En homéopathie animale, la Rue entre dans la composition d'un remède antirhumatismal et d'une poudre calcique.

Les symptômes d'un empoisonnement à la Rue chez les animaux sont : salivation, gastro-entérite aiguë, excitation puis prostration, bradycardie et avortement.

### 3. Agricoles :

La rue, de par sa forte odeur et ses composés puissants, est utilisée pour le contrôle des ravageurs, notamment contre les insectes. La rue est toxique pour les mollusques, les poissons et les oiseaux. Elle serait aussi nématocide.

- **Maladies bactériennes** : Selon Smale et Wilson en 1964 [44], l'extrait à l'eau/acétone/éthanol (1/1/1) de la rue a des propriétés antibactérienne mais pas antifongiques. La Rue serait efficace entre autres contre des maladies de plante telles que la tumeur du collet "*Agrobacterium tumefaciens*", la pourriture molle

“*Erwinia carotovora*”, la pustule bactérienne “*Xanthomonas phaseoli*” et la tache bactérienne “*Pseudomonas syringae*”.

- **Répulsif d'insectes nuisibles :** La Rue repousse le coléoptère japonais, insecte nuisible qu'on ne retrouve au Québec que dans l'extrême sud. Metzger, F.W., a pu repousser une population moyenne de coléoptère japonais sur des pêchers en utilisant une dilution de 1/25 d'extraits de rue [41].

Hough-Goldstein en 1990 [45], a démontré l'efficacité d'une suspension à 10% de Rue comme répulsif contre le doryphore de la pomme de terre, ce qui est aussi efficace que la tanaisie.

Selon Speiden-Gregg en 1950 [46], l'extrait à l'éther des graines de la Rue est efficace contre le puceron de la féverole “*Aphis craccivora*”. La rue repousserait également les chenilles en général, les mouches d'étable et domestiques, ainsi que les puces.

Pour des petites surfaces, on peut éparpiller les feuilles ou rameaux de rue dans la zone à protéger. Il sera bon d'écraser les feuilles d'abord afin d'accroître le dégagement de l'odeur. Pour de plus grandes surfaces à traiter, on pourra asperger un purin de la plante fabriqué en laissant tremper des feuilles dans de l'eau pendant une journée.

- **Attractif d'insectes nuisibles :** la Rue est un attractif très puissant pour l'aleurode des serres “*Trialeurodes vaporariorum*”. On peut l'utiliser avantageusement en plaçant un ou des plants de Rue dans les serres afin de dépister les aleurodes. Si celles-ci sont présentes dans la serre, elles se retrouveront d'abord sur la Rue. Les lâchers de guêpes parasitaires “*Encarsia formosa*” se feront alors au besoin [32, 46].

### III.9. Toxicité de la plante :

*Ruta chalepensis* L. est une plante très puissante. Elle ne doit jamais être consommée par des femmes enceintes car elle est abortive. De grandes doses sont toxiques et provoquent la confusion mentale. L'huile essentielle est de plus stupéfiante, elle peut même provoquer la mort. L'huile essentielle est extrêmement irritante pour la peau et les muqueuses. elle est considéré toxique en doses plus grandes de 2 g de la poussière sèche par jour.

La manutention de la plante peut causer des réactions allergiques (photodermatites) semblables à celles de l'herbe à puce chez certaines personnes [14, 26].

### **Références Bibliographiques**

- [1] **Sources, V al. Et** : Plantes médicinales d'utilisation populaire relatives comme toxiques. Bulletin de tu fais le compte rendu. Plantes médicinales 19-37, (1988).
- [2] **Petit-Paly, G., M. Rideau et J.C. Chenieux.**, Etude de quelques rutacées à alcaloïdes. Tome II. *Ruta chalepensis* L. : revue botanique, chimique et pharmacologique. Plantes médicinales et phytothérapie, 16 (1): 55-72, (1982).
- [3] **Johnson T. In** : Ethnobotany desk référence, CRC Press Boca Raton London, New York, Washington, D.C., USA, p. 730, (1999).
- [4] **Roig, JT** : plantes médicinales, aromatiques ou toxiques de cuba. La havane. Ed. scientifique-technique, p 1125, (1988).
- [5] **Mansour S. Al-Said, Tariq M.A., Al-Yahya M.A. and Ageel A.M.**, Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. J. Ethnopharmacol. 28 : 305-312, (1990).
- [6] **Beniston .**, fleurs d'Algérie. N° d'édition : 1922/ 84. Alger. (1984).
- [7] **L. Watson and M. J. Dallwitz** : The families of flowering plants. (1992).
- [8] **Sanhueza, M.**, Etude farmacognóstico de *Ruta graveolens*. Thèse de diplôme. Inst. Farm et Aliment. La Havane. (1991).
- [9] **Kerekes, J. and L. Hornok.** Experience with *Ruta graveolens* cultivation on a sandy soil. Herba Hungarica, 10(2/3) : 35-38. (1971).
- [10] **Kong, et Cal.**, Antifertility principal of *Ruta chalepensis*. Medicinal plant, 55(2) 176-178 (1989).
- [11] **QUEZEL P et S. SANTA.**, Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. CNRS. (Paris). (1963).
- [12] **Monterde P.**, Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. Tome II. Editeurs Beyrouth, (Liban). (1986).
- [13] <http://www.uni-graz.at/~katzer/ger/spice-photo.htm#ruta-chal>.
- [14] **Gernier. J et Coll.**, Ressource médicinale de la flore Française. Tome I. Edition. Vigot frères. (Paris). (1961).
- [15] **Bonnie et Douin.** La grande flore. Tome II. Belin. (Paris). (1990).
- [16] **Julve. Ph.**, ff.baseflor. Index botanique, "Ecologique et chorologique de la flore de France". (1998).
- [17] **Schimer, Ou et al.** : Mutagenic compounds in an extract from *Rutae* herbs II. Mutat-Rue 243 (1) : 57-62 (1990).

- [18] P. Wuithier, raffinage et génie chimique, tome I, Edition tedmip, Paris (1972).
- [19] Mossner, H. et F. Czygan. Tissue cultures in medicinal plant breeding and cultivation. Acta Horticulturae N° : 73/ 47-57, (1978).
- [20] Guenther E. The Essential Oils. D. Van Nostrand CO. New York, 1, 229, (1948).
- [21] Paulette Vanier., Les huiles essentielles et la thérapie par les huiles essentielles. Vol. 9, N° 6, 1994, pp 69-73, (1994).
- [22] Abdolhossein Rustaiyan, Morteza Khossravi and Faramarz Sultani-Lotfabadi, Constituents of the Essential oil of *Ruta chalepensis* From Iran. J. Essent, Oil Res. 14, 378-379 (septembre, october 2002).
- [23] G. D. Bagchi, P.D.Dwivedi and Amrita Singh. Variations in Essential oil Constituents at Different Growth Stages of *Ruta chalepensis* on Cultivation at North Indian Plains. J. Essent, Oil Res., 15, 263-264 (July/August 2003).
- [24] Olga Tzakou and Maria Couladis. Essential oil of *Ruta chalepensis* L.From Greece. J. Essent, Oil Res.,13, 258-259 (July/August 2001).
- [25] A.Verzera, L.Mondello and S. Ragusa. L'olio essenziale delle Foglie di piante tipiche della Flora mediterranea. Essenze Derivati agrumari,70,207-210. (2000).
- [26] G.D. Bagchi, P.D. Dwivedis and S. Mandal. Essential oil Constituents of *Ruta chalepensis* plants grown in India. Indian. Perfumer47(1) :39-41. (2003).
- [27] Tian-Shung Wu., Li-Shian Shi and Jhi-Joung Wang. Cytotoxic and Antiplatelet Aggregation Principales of *Ruta graveolens*. Journal of the Chinese Chemical Society. 50, 171-178. (2003).
- [28] S. Milesi, B.Massot, E.Gontier and F. Bourgaud. *Ruta graveolens* L. : a promising species for the production of furacoumarines. Plant Science 161 : 189-199. (2001).
- [29] Thomas G. Back and Jeremy E. Wulff. First Syntheses of two quinoline alkaloids from the medicinal herb *Ruta chalepensis* via cyclization of an o-iodoaniline with an acetylenic sulfone. J. Org. Chem. 1710-1711. (2002).
- [30] Thomas G. Back, Masood Parvez and Jeremy E. Wulff. Congugate Addition of o-iodoanilines and methyl anthranilates to acetylenic sulfone. A New Route to quinolines including First Syntheses of two alkaloids from the medicinal herb *Ruta chalepensis*. J. Org. Chem. 68, 2223-2233. (2003).
- [31] Toshiya Masuda, Yasua Oyama and NYamamoto. Cytotoxic screening of medicinal and edible plants in Okinawa, Japan, and Identification of the Main toxic Constituents of *Rhodea japonica* (Omoto). Biosci. Biotechnol. Biochem., 67 (6), 1401-1404. (2003).

- [32] **Corduan, G. and E. Reinhard.** Synthesis of volatile oils in tissue cultures of *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*, 11:917-922. (1972).
- [33] **Aloisio Fernandes Costa e José Cardoso DO Vale.** Subsídios para o estudo das plantas aromáticas portuguesas. Essência de "*Ruta Chalepensis* L." ssp. "Bracteosa DC.", congresso LUSO- Espanhol de farmácia. (2000).
- [34] **K. H. C. Baser, T. Özek and S. H. Beis.** Constituents of the Essential oil of *Ruta chalepensis* L. From Turkey. *J. Essent, Oil Res.*, 8, 413-414, (July/August 1996).
- [35] **Mansour S. Al-Said, Tariq M.A., Al-Yahya M.A., and Rafatullah S.,** Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 28 : 305-312, (1990).
- [36] **Amr, A.S.** Effectiveness of synthetic and potential natural antioxidants in improving the stability of sheep's anhydrous butter fat during long-term storage. *J. Sci. Food Agric.*, 55 : 75-85, (1991).
- [37] **Bairacli-Levy, J.** Herbal handbook for farm and stable. Faber and Faber, Londres. (1973).
- [38] **Zobel, A.M. and S.A. Brown.,** Dermatitis-inducing furanocoumarins on leaf surfaces of eight species of rutaceous and umbelliferous plants. *Journal of Chemical Ecology*, 16 (3) : 693-700. (1990).
- [39] **Cabaret, J.** 167 plantes pour soigner les animaux. Éditions du Point Vétérinaire, Maisons-Alfort, France. (1986).
- [40] **Grieve, M.,** A modern herbal. Vol. II. Dover Publications, New York. (1981).
- [41] **Metzger, F.W.,** Repellency to the japanese beetle of extracts made from plants immune to attack. *USDA Technical Bulletin N° : 299.* (1932).
- [42] **Gandhi, M., R. Lal, A. Sankaranarayanan and P. L. Sharma.,** Post-coital antifertility activity of *Ruta graveolens* in female rats and hamsters. *Journal of Ethnopharmacology*, 34 : 49-59. (1991).
- [43] **Bianchini, F. and F. Corbetta.,** Health plants of the world ; atlas of medicinal plants. Newsweek Books, New York. (1977).
- [44] **Smale, B.C., R.A. Wilson and H.L. Keil.,** A survey of green plants for antimicrobial substances. *Phytopathology*, 54-748. (1964).
- [45] **Hough-Goldstein, J. A.,** Antifeedant effects of common herbs on the Colorado beetle (Coleoptera:Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 19 (2):234-238. (1990).
- [46] **Speiden-Gregg, E.** The encyclopedia of herbs and herbalism. Crescent books, New York. (1950).

# **Chapitre III :**

## **Exploitation de *Ruta* *chalepensis* L.**

## **I. Etude des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. des différentes stations :**

### **I.1. Introduction :**

*Ruta chalepensis* L. est une plante appartient à la famille des rutacées, aromatiques (voir chapitre II). L'identification botanique est faite en provenant de laboratoire de Botaniste du Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen.

Le choix de notre plante est basé sur :

- Une étude ethnopharmacologique faite par des différents chercheurs Biologistes.
- Une plante non exploitée par les chimistes sur tout à l'Ouest Algérien.
- Un petit arbrisseau sauvage ou cultivé riche en H.E.

Dans le chapitre présent, nous visons l'exploitation générale de la plante et ceci via un examen phytochimique, afin de déceler les différentes familles des composés qui s'y trouvent, puis l'étude sur les huiles essentielles fraîchement extrait : procédés d'obtention, rendement, paramètre de contrôle (propriétés organoleptiques, caractéristiques physico-chimiques) et la composition chimique. Il est à préciser que toute l'étude expérimentale est faite sur six plantes de *Ruta chalepensis* L. de l'Ouest Algérien, ils proviennent de Beni Mester, Terni, Laourith, Sebdou, Ouzidane et Ghazaouet.

### **I.2. Stations d'études :**

La matière végétale provient de la zone d'étude qui se trouve dans la wilaya de Tlemcen se situe à l'ouest Algérien, entre 35° 05' et 35° 25' de latitudes Nord, et entre 0° 15' et 2° 15' de longitude Ouest. Celle-ci se limite au nord par la mer méditerranéenne, au Nord-Est par la wilaya de Ain-Temouchent, à l'Est de la wilaya de Sidi-Bel-Abbes, au Sud par la wilaya de Naâma, et à l'Ouest par le Maroc.

La carte de situation ci-après (voir figure 33), montre la position géographique des stations choisies entre prendre. Le choix de cette étude est soumis à différente donnée climatologique et altimétrique. Elles sont au nombre de six : Beni Mester, Terni, Laourith, Sebdou, Ouzidane et Ghazaouet.

### **I.3. Situation géographique des stations d'études :**

Nous avons récolté nos échantillons à partir de six stations qui différentes par leurs situations géographiques et leurs étages bioclimatiques sont résumés dans le tableau 2.

La localisation des différentes stations d'étude est indiquée dans la carte topographique de la wilaya de Tlemcen.

- 1) Station (Laourith) : elle se situe dans la ville de Tlemcen.
- 2) Station (Beni Mester) : elle se situe à 12 km au Nord Ouest de la ville de Tlemcen.
- 3) Station (Ouzidane) : elle se situe à 7 km au Nord Est de la ville de Tlemcen.
- 4) Station (Terni) : elle se situe à 20 km au Sud Ouest de la ville de Tlemcen.
- 5) Station (Sebdou) : elle se situe à 37 km au Sud Ouest de la ville de Tlemcen.
- 6) Station (Ghazaouet) : elle se situe à 68 km au Nord Ouest de la ville de Tlemcen.

**Tableau 2** : Etude bioclimatique des six zones d'études (tirée de la carte bioclimatiques de la wilaya de Tlemcen) [1].

<i>Caractères</i> <i>Zones</i>	Longitude	Latitude	Altitude	Climat
<b>Ghazaouet</b>	1°52'	35°46'	45 m	Semi-aride inférieur à hiver tempéré
<b>Ouzidane</b>	1°19'	34°55'	550 m	Semi-aride supérieur à hiver froid
<b>Beni Mester</b>	1°20'	34°54'	812 m	Semi-aride inférieur à hiver doux
<b>Laourith</b>	1°18'	34°54'	800 m	Semi-aride inférieur à hiver frais
<b>Terni</b>	1°21'	34°48'	1000 m	Semi-aride inférieur à hiver froid
<b>Sebdou</b>	1°30'	34°32'	930 m	Aride supérieur à hiver froid

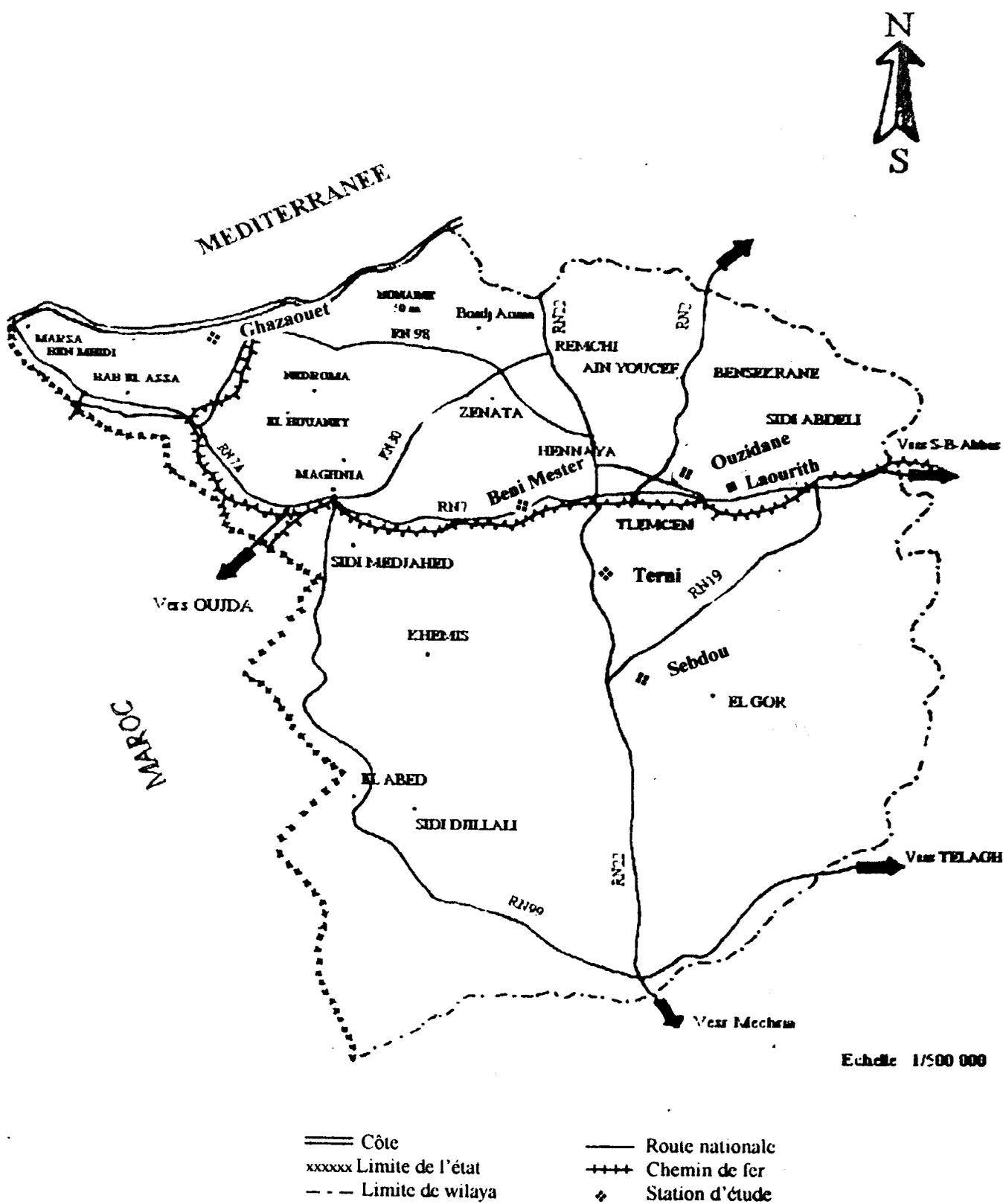


Figure 33: Carte de localisation des zones de récolte (tirée d'une carte topographique de la wilaya de Tlemcen) [1].

#### **I.4. Cueillette et période de cueillette :**

Seule la partie aérienne de la plante est concernée. Nous avons effectué nos récoltes à différentes périodes de l'année Octobre 2004, Février, Avril, Juin et Août en 2005, pour la zone de Beni Mester, pour les autres zone exceptées, les récoltes ont été faites en Avril 2005.

## **II. Examen phytochimique :**

### **II. 1. Introduction :**

La mise au point de nouveaux médicaments s'effectue maintenant dans les universités, dans des organismes de recherche scientifique, de recherche médicale et dans l'industrie. Malgré les progrès de la thérapeutique, il reste place pour de nouvelles médications :

- Soit parce que certaines substances actives sont assez mal toléré ou au contraire entraînent l'accoutumance,
- Soit par suite de l'apparition de nouveaux syndromes ou de souches microbiennes résistantes,
- Soit enfin parce que l'on est encore désarmé contre un certain nombre de maladies.

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

- ❖ **L'étude pharmacologique** est caractérisée par l'observation du comportement des plantes dans leur environnement nature ;
- ❖ **L'étude ethnopharmacologique** qui consiste à recueillir des renseignements sur l'utilisation des plantes auprès des populations vivant encore près de la nature en Afrique, dans le sud-est asiatique, en Amérique du sud ou dans les îles du Pacifique ;
- ❖ **l'étude phytochimique** qui consiste à rechercher des catégories de molécules dans les plantes qui peuvent servir, non seulement, à la découverte des agents thérapeutiques, mais aussi, elles peuvent être à l'origine de la révélation de nouvelles sources de matériaux économiques telles que, les huiles, les tanins, les alcaloïdes... [2]

L'étude bibliographie révèle quelques études sur *Ruta chalepensis* L., telles que ; l'isolation de quelque alcaloïdes et coumarines de la plante [3], la détermination de la composition chimique de l'H.E. de la plante de provenance l'Iran, Grec, l'Italie, Turquie, l'Argentine [4, 5, 6, 7, 8]. C'est la raison pour la quelle, il est primordial de réaliser une étude chimique basée dans un premier temps sur des tests phytochimiques et dans un second temps sur la détermination de la composition chimique de l'H.E. de *Ruta chalepensis* L. de l'Ouest Algérien (chapitre IV). En effet, les tests phytochimiques permettent la détection des différentes familles de composés présents dans la plante de provenance l'Algérie.

La mise en évidence des différentes familles de composés chimiques, s'effectue par des tests physiques ou chimiques réalisés sur la plante ou sur un extrait de la plante. Ces tests sont basés sur :

- des réactions de coloration et de précipitation,
- des examens en lumière ultraviolette,
- des essais de solubilité, notamment dans l'eau et dans l'alcool.

## **II. 2. Extractions et examens phytochimiques :**

### **II. 2.1. Conditions opératoires :**

La matière végétale est constituée de feuilles, tiges, racines et les grains de *Ruta chalepensis* L. Pour les feuilles, les tiges, et les racines ont été récoltées en Avril 2005 et les grains ont été récoltés en Juin 2005 à Ouzidane (Tlemcen-Algérie).

Nous avons fait une série d'extractions en utilisant des solvants à polarité croissante (l'éther diéthylique, l'éthanol et l'eau distillée).

La méthode d'extraction utilisée est la percolation, elle consiste à utiliser un appareil spécial : extracteur de soxhlet ; voir la figure 34. L'avantage de ce type d'extraction est que le solvant condensé, s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée du contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute.

Les extraits obtenus sont conservés dans des flacons en verre, fermés et gardés dans le réfrigérateur.

Une partie des extraits est utilisée pour les examens phytochimiques, l'autre partie est utilisée pour les tests antimicrobiens (voir chapitre V).

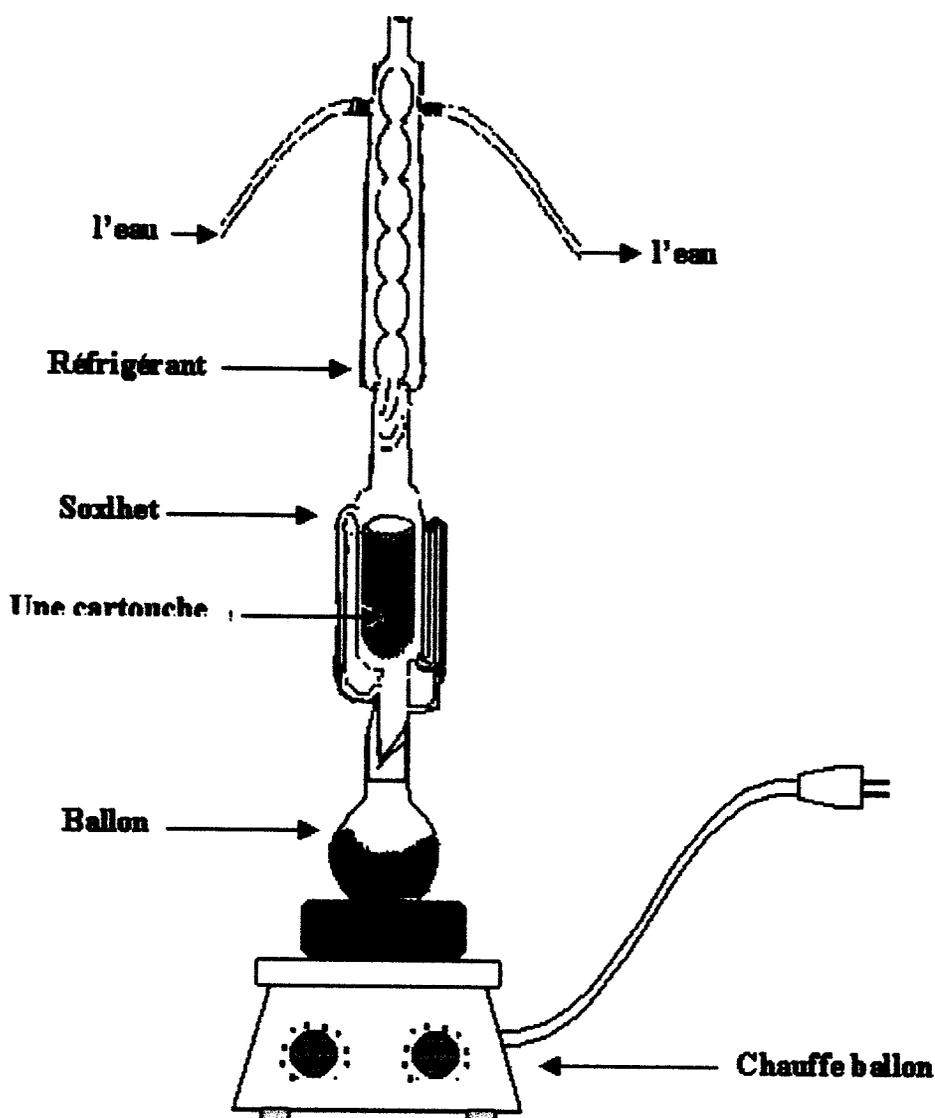


Figure 34 : Extracteur de soxhlet.

## II. 2.2. Calcul du rendement :

- ❖ **Définition** : Le rendement en extrait est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait obtenu après évaporation de solvant et la masse de la matière végétale à traiter [9].
- ❖ **Expression des résultats** : Le rendement d'extrait exprimé en pourcentage,  $R^{mt}$  est donné par la formule suivante [9]:

$$R^{mt} = \frac{m}{m_0} \times 100$$

**m** : masse en gramme de l'extrait obtenu après évaporation des solvants organiques.

**m<sub>0</sub>** : masse en gramme de la matière végétale sèche à traiter.

### II. 3. Résultats et interprétations :

Dans cette partie du travail, nous visons la caractérisation des grandes familles de composés chimiques co-existants dans les différents organes de la plante étudiée.

Les rendements d'extractions et les aspects des extraits sont donnés dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Les rendements d'extractions et les aspects des extraits.

<i>Extraits</i> <i>Organes</i>	Extrait 1 (%)	Extrait 2 (%)	Extrait 3 (%)
<b>Feuilles</b>	8.4 Pâte noire verdâtre	20.4 Solide noir verdâtre	9.9 solide marron foncé
<b>Tiges</b>	2.0 Pâte vert foncée	2.3 Solide jaune noirdâtre	6.0 solide marron
<b>Grains</b>	8.8 Pâte noire jaunâtre	25.9 Solide jaune	13.7 solide marron
<b>Racines</b>	2.3 Pâte jaune noirdâtre	3.12 Pâte orange	5.6 solide marron

D'après ces résultats, Pour les feuilles et les grains, les rendements des extraits éthanoliques sont plus importants que ceux obtenus par l'eau, ces derniers sont supérieurs à ceux obtenu par l'éther diéthylique. Ceci s'explique par la forte polarité de l'éthanol comparée à celle de l'éther diéthylique, qui permet d'extraire la totalité des composés présents dans la plante. L'eau est un solvant très polaire, il extrait surtout les composés fortement polaires.

Pour les tiges et les racines, les résultats obtenus montrent que les rendements obtenus par l'eau sont supérieurs à ceux obtenus par l'éthanol, supérieurs à ceux obtenus par l'éther diéthylique. Ceci s'explique par le fait que les parties de la plante contiennent beaucoup plus de composés fortement polaires que ceux moyennement ou non polaires. D'autre part, les résultats révèlent aussi que les grains sont plus riches en composés que les feuilles, que les racines et les tiges.

Les résultats de l'examen phytochimique, réalisé sur les feuilles, les tiges, les racines et les grains de *Ruta chalepensis* L. épuisés successivement par l'éther diéthylique, l'éthanol et l'eau distillée, sont représentés respectivement dans les tableaux 4, 5 et 6.

**Tableau 4 : Résultats de l'examen phytochimique sur les extraits à l'éther diéthylique.**

<i>Les familles</i> / <i>Les extraits</i>	RcF1	RcT1	RcR1	RcG1
<b>huiles essentielles</b>	+++	+++	+	+++
<b>Stérol et stéroïdes</b>	+++	+++	+	+++
<b>Flavonoïdes</b>	-	-	-	-
<b>Emodoles</b>	-	-	+	-
<b>coumarines</b>	++	+	+++	++
<b>Alcaloïdes</b>	++	++	+++	+++
<b>Acide gras</b>	+	+	-	++

D'après les résultats du tableau 4, les huiles volatiles, alcaloïdes, coumarines, stérols et stéroïdes sont présents dans toutes les parties de la plante étudiée en quantités très variables. Cependant, les flavonoïdes sont totalement absents dans tous les organes. Par ailleurs, les émodoles sont faiblement présents dans les racines, mais ils sont totalement absents dans les autres organes. D'autre part, les résultats révèlent aussi que les acides gras sont faiblement présents dans les feuilles et les tiges, totalement absents dans les racines et moyennement présents dans les fruits.

**Tableau 5 : Résultats de l'examen phytochimique sur les extraits à l'éthanol.**

<i>Les extraits</i> <i>Les familles</i>	RcF2	RcT2	RcR2	RcG2
<b>Coumarines</b>	+	+	+	+
<b>Anthracyanosides</b>	-	-	-	-
<b>Stérol et stéroïdes</b>	+	+	+	+
<b>Anthocyanosides</b>	-	-	-	-
<b>Tanins</b>	-	-	-	-
<b>flavonoïdes</b>	+	+	+	+
<b>Alcaloïdes</b>	+++	++	++	+++
<b>Composés réducteurs</b>	+	+	+	+

D'après les résultats de ce tableau, nous pouvons constater, que les flavonoïdes, coumarines, composés réducteurs, stérols et stéroïdes sont faiblement présents dans toutes les parties de la plante étudiée. Par ailleurs, anthracyanosides, anthocyanosides et tanins sont totalement absents dans tous les organes. D'autre part, les résultats révèlent aussi que les alcaloïdes sont moyennement présents dans les tiges et les racines mais une très forte présence dans les feuilles et les fruits.

**Tableau 6 : Résultats de l'examen phytochimique sur les extraits à l'eau.**

<i>Les extraits</i> <i>Les Famille</i>	RcF3	RcT3	RcR3	RcG3
<b>Tanins</b>	-	-	-	-
<b>Composés réducteurs</b>	+	++	++	+
<b>Alcaloïdes</b>	+	+	++	+
<b>Anthraquinones</b>	-	-	-	-
<b>Amidon</b>	-	-	-	-
<b>Saponosides</b>	++	+	+	+++

(-) : Test négatif

(+) : test faiblement positif

(++) : test positif

(+++): test très positif

En effet, les résultats du tableau 6 montrent que les composés réducteurs, alcaloïdes et saponosides sont présents dans toutes les parties de la plante étudiées en quantités très variables. Par ailleurs, les tanins, anthraquinones et l'amidon sont totalement absents dans tous les organes.

En comparant nos rendements d'extractions par l'extracteur de Soxhlet pour différents solvants, nous visons la caractérisation des grandes familles de composés chimiques co-existants dans la partie aérienne de *Ruta chalepensis* L. avec ceux de Maroc (tableau 7).

**Tableau 7 :** Comparaison des rendements d'extractions et les familles de composés de *Ruta chalepensis* L. [10].

Solvants	Rendements d'extractions (%)	Familles de composés chimiques
L'éther de pétrole	3,09	Terpène et huiles essentielles, alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes, flavans, phénols, stérol et stéroïdes.
Hexane	0.81	
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.09	
EtOAc	1.06	
MeOH	2.61	
H <sub>2</sub> O	-	

D'après ce tableau, nous pouvons constater, que la Rue de Maroc présente un rendement d'extractions par l'éther de pétrole plus élevé que ceux obtenus par les autres solvants, mais il est proche de celui noté dans le cas de l'extraction des racines de la Rue d'Ouzidane par l'EtOH (3,12).

#### II. 4. Conclusion :

Ces résultats montrent que les teneurs d'extractions de *Ruta chalepensis* L. est plus importante dans les grains et les feuilles, cependant, elle est beaucoup moins importante dans les racines et les tiges selon les différents solvants. Ces résultats confirment ceux qui ont été rapportés par la littérature [10].

Le criblage phytochimique basé sur des tests spécifiques a permis de caractériser les différentes familles de composés chimiques existantes dans la plante *Ruta chalepensis* L. Par ailleurs, Pour les fruits, une forte présence des huiles volatiles, les alcaloïdes, les stérols et stéroïdes et les saponosides. D'autre part, pour les tiges, une forte présence des stérols et

stéroïdes. Mais Pour les feuilles, une forte présence des huiles volatiles, les alcaloïdes, les stérols et stérôdes. En fin Pour les racines, une forteépence des stérols et stéroïdes, les coumarines et les alcaloïdes.

L'examen révèle, cependant que, les anthracyanosides, anthocyanosides, les tanins et les amidons sont totalement absents dans la plante.

### **III. Extraction des huiles essentielles :**

#### **III. 1. Introduction :**

Les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. sont très utilisées en pharmacie, parfumerie, cosmétique ainsi que dans les industries agroalimentaires. Cependant, en se basant sur les résultats de l'examen phytochimique, nous pouvons dire que la Rue est riche en H.E., suite auquel, nous procéderons à la distillation. Pour ce faire, Une fois la plante récoltée, nos échantillons sont nettoyés, étalés et séchés à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant une à deux semaines. Des températures entre 20 et 32°C. Elles sont entreposées en baril de carton et passées au tamis pour en enlever les impuretés. Une fois, cette période de temps s'écoulait la matière végétale est morcelée manuellement pour le destiner directement à l'extraction.

#### **III. 2. Procédés d'extraction des H.E. et rendement :**

##### **III. 2.1. Conditions opératoires :**

Pour l'extraction des H.E. de *Ruta chalepensis* L., Il est à noter que seule la partie aérienne de la plante à été prise en considération pour différentes stations. D'autre part, pour la station de Beni Mester, qui a été faite en avril, on a fait l'extraction des H.E. pour différentes parties de la plante (les feuilles, les fruits, les tiges et les racines).

L'extraction des H.E. de *Ruta chalepensis* L. a été réalisé au laboratoire de Chimie Organique, Substances naturelles et Analyses (COSNA).

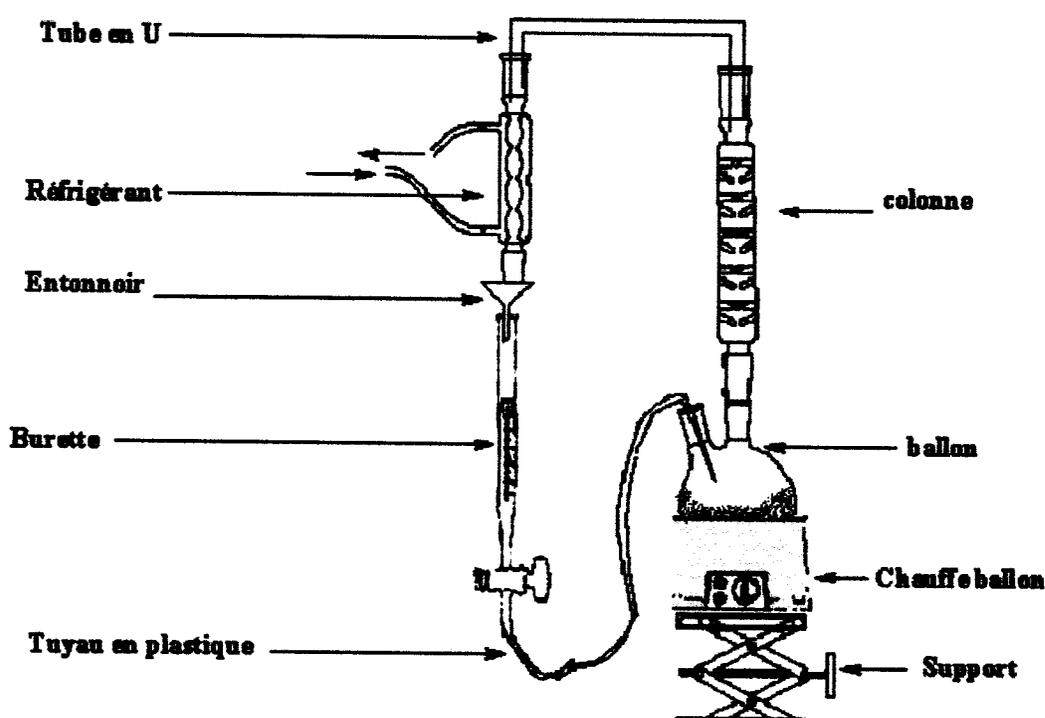
Pour notre travail, nous avons utilisé la technique classique de Moritz ou d'hydrodistillation. Le montage utilisé est constitué d'un ballon bicol en verre de 2 litres, contenant de l'eau distillée, et d'un matériel, placé au-dessus d'un chauffe ballon et surmonté d'une colonne en verre, celle-ci est reliée à un réfrigérant à l'aide d'un tube en "U".

Pour la récupération de l'huile essentielle, nous avons utilisé une burette. Cette dernière est reliée au ballon par un tuyau en plastiques qui permet le retour de l'eau évaporée et condensée au ballon (voir figure 35). La plante qui est en contacte de l'eau, est directement

chauffée. Les vapeurs refroidies décantent, l'huile essentielle surnageant qui est séparé de la phase aqueuse.

Après plusieurs essais d'extraction, nous avons opté pour une durée d'extraction de 2<sup>h</sup>30', une fois les huiles essentielles obtenues, elles sont conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière, fermés et gardés au réfrigérateur.

Parmi les méthodes les plus utilisées pour l'obtention des huiles essentielles, l'hydrodistillation reste un procédé simple, rapide et efficace.



**Figure 35 :** Montage utilisé pour extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.

### III. 2.2. Estimation de la durée optimale d'extraction :

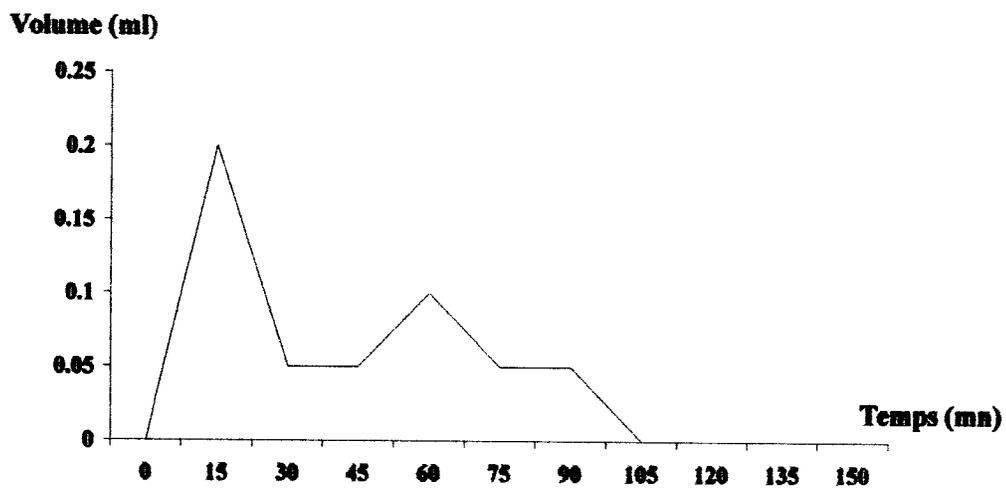
Nous avons essayé d'estimer la durée optimale d'extraction de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L., c'est le temps nécessaire pour extraire plus de 95% des huiles essentielles de notre plante. La matière végétale utilisée est récoltée en Octobre 2004 de Beni Mester. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 8 et illustré par la figure 36.

**Tableau 8 : La variation de volume d'H.E en fonction de la durée d'extraction.**

Temps (mn)	00	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	V total (ml)
V d'H.E (ml)	00	0,2	0,05	0,05	0,1	0,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,5

D'après ce tableau, nous pouvons constater, que le volume le plus élevé est obtenu au bout de 15 mn après la première goutte de reflux d'extraction tandis que jusqu'à 90 mn d'extraction il atteint son maximum ; cela peut être expliqué par la localisation exogène des glandes sécrétrices au niveau de cette plante.

La durée moyenne de l'extraction est d'environ deux heures et 30 minutes, une fois les huiles essentielles obtenues, elles sont conservées dans des flacons en verre, fermés et gardés au réfrigérateur.



**Figure 36 : La cinétique de l'hydrodistillation.**

On peut conclure que la durée moyenne de l'extraction d'huile essentielle dépend principalement de la localisation exogène des glandes sécrétrices dans la plante.

**N.B :** La durée de toutes les extractions que nous avons effectuées, était supérieure à 2<sup>H</sup>30' (généralement 05<sup>H</sup>).

### III. 2.3. Calcul du rendement $R^{dt}$ :

- ❖ **Définition** : Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenu et la masse du matériel végétale à traiter [9].
- ❖ **Expression des résultats** : Le rendement en H.E. exprimé en pourcentage,  $R^{dt}$  est donné par la formule suivante :

$$R^{dt} = \frac{M}{M_0} \times 100$$

**M** : masse en gramme d'huile essentielle.

**M<sub>0</sub>** : masse en gramme de la matière végétale sèche à traiter.

Auparavant, l'humidité d'un échantillon représentatif de la biomasse plantaire a été déterminée par étuvage à 100°C jusqu'à poids constant. Les teneurs moyennes en huiles essentielles ont été calculées par rapport à la matière sèche et exprimées en pourcentage.

### III. 2.4. Calcul d'humidité :

- ❖ **Définition** : L'humidité du matériel végétale est le rapport entre la perte en poids d'un certain d'échantillon et la masse du prise d'essai [9].
- ❖ **Expression des résultats** : L'humidité exprimée en pourcentage, le taux d'humidité **H %** est donné par la formule suivante :

$$H \% = \frac{A}{P} \times 100$$

**P'** : poids de l'échantillon humidifié après séchage en gramme.

**P** : poids de l'échantillon initial en gramme.

**A** : masse en gramme de la perte en poids (**P - P'**).

### III. 2.5. Calcul du rendement $R^{dt'}$ :

- ❖ **Définition** : Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal sèche [9].
- ❖ **Expression des résultats** : Le rendement en H.E. exprimé en pourcentage,  $R^{dt'}$  est donné par la formule suivante :

$$R^{dt'} \% = \frac{R^{dt}}{(100 - H \%)} \times 100$$

H % : La valeur d'humidité.

R<sup>dt</sup> : La valeur du rendement en H.E.

**N.B.** : Nous avons exprimé les rendements en H.E. par rapport à la matière sèche pour ce la, nous procédions parallèlement à chaque extraction à la détermination de la teneur en eau de la matière végétale.

### III. 3. Résultats et interprétations :

Les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L., obtenues par l'hydrodistillation sont de couleurs jaune clair allant jusqu'au jaune foncé et dégageant une forte odeur désagréable.

Les teneurs moyennes en huiles essentielles ont été calculées par rapport à la matière végétale sèche. Les huiles essentielles ainsi obtenues sont conservées à base température dans des tubes sous abri de la lumière jusqu'à leur usage.

Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 9, 10 et sont illustrés sous forme d'histogrammes de 1 et 2.

**Tableau 9** : La teneur en huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. des différentes périodes de cueillette.

<i>Périodes</i> \ <i>Teneurs</i>	R <sup>dt</sup> (%)	R <sup>dt'</sup> (%)	H %
Octobre 2004 (BO1)	0.38	0,45	13,5
Février 2005 (BF2)	0.25	0,28	9,17
Avril 2005 (BA3)	0.74	0,82	9,16
Juin 2005 (BJ4)	0.72	0,78	7
Août 2005 (BA5)	0.66	0,72	8,75

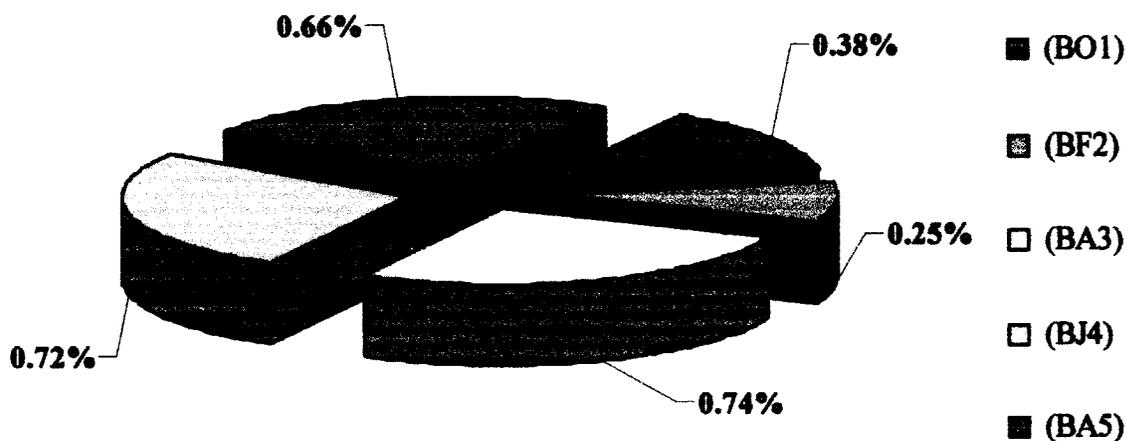
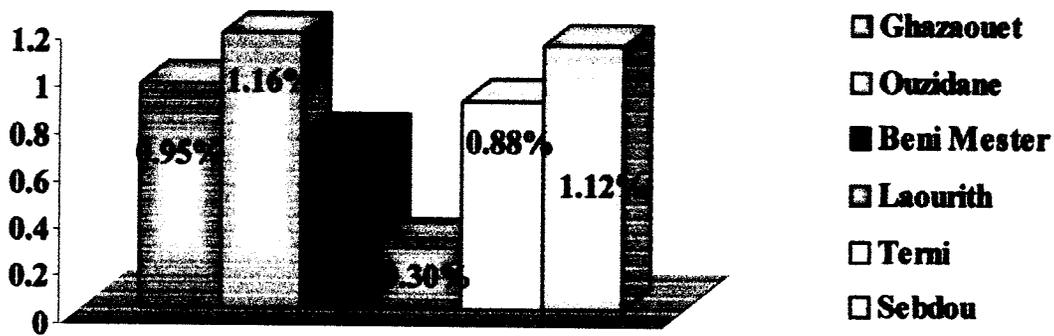


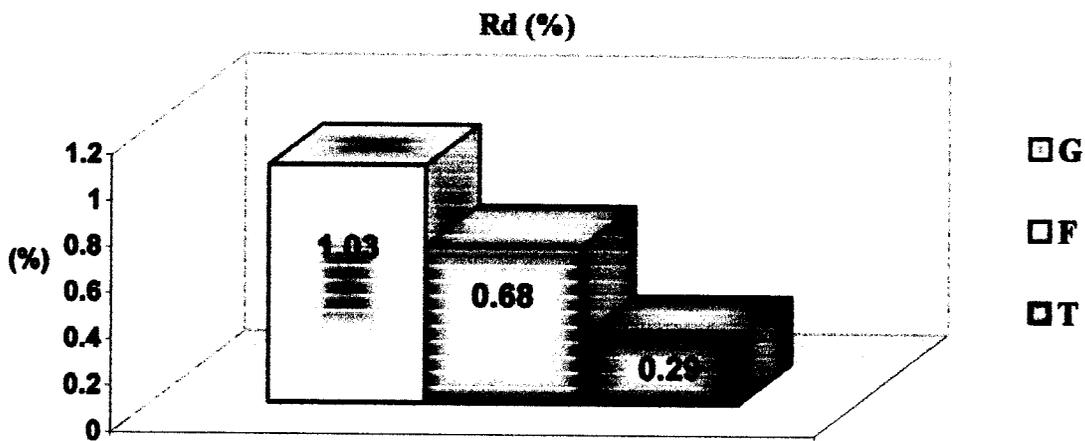
Figure 38 : Rendements moyens d'extractions de Beni Mester des différentes périodes.

Tableau 10 : Les teneurs des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. des différentes zones d'études en avril 2005.

<i>Stations</i>	<i>Teneurs</i>	Partie de la plante	R <sup>dt</sup> (%)	R <sup>dt'</sup> (%)	H %
Ghazaouet (GA6)	Partie aérienne		0,95	1,06	10
Terni (TA7)			0,88	0,98	10
Ouzidane (OA8)			1,16	1,27	9
Sebdou (SA9)			1,12	1,24	9,5
Laourith (LA10)			0,30	0,35	15,5
Beni Mester (BA3)			0,74	0,82	9,16
Beni Mester (BG3)		Grains	1,03	1,22	15,57
Beni Mester (BF3)		Feuilles	0,68	0,69	1,45
Beni Mester (BT3)		Tiges	0,29	0,31	6,45



**Histogramme 1 : Rendements moyens d'extractions des différentes zones d'études.**



**Histogramme 2 : Rendements moyens d'extractions de Beni Mester des différentes parties de la plante, récoltées en Avril 2005.**

D'après les résultats des tableaux précédents, nous remarquons l'extrême diversité des valeurs enregistrées pour les différentes périodes de cueillette. Cette remarque s'applique particulièrement pour le rendement d'extraction de l'huile essentielle ou le minimum est de 0.25 % pour la période de Février et le maximum est de 0.74 % pour la période d'Avril (pleine floraison). D'autre part, il est intéressant de remarquer que la concentration en huile essentielle est beaucoup plus importante dans les fruits (1.03%) que dans les feuilles (0.68%), que dans les tiges (0.29%).

Il apparaît au vu des résultats des tableaux précédents que les meilleurs rendements en huile essentielle sont obtenus pour les stations d'Ouzidane (1.16 %), Sebdou (1.12%) et Ghazaouet (0.95 %). Par contre, le plus faible rendement est enregistré pour le site de

Laourith (0.30 %). Les zones de Terni et Beni Mester présentent des teneurs en huile essentielle intermédiaires (0.88% et 0.74% respectivement).

Le faible rendement en huile essentielle de la matière végétale traité (sèche partiellement) par rapport au matériel végétal sec totalement est due au fait que la matière végétale contient d'humidité importante, avec une différence remarquable par rapport à l'autre matière végétale.

est la somme d'humidité entraîne un fort teneur en huile essentielle, au détriment de la qualité de l'essence.

### III. 5. Qualité de l'H.E. de *Ruta chalepensis* L. et son contrôle :

#### III. 5. 1. Introduction :

Les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. sont très utilisées en pharmacie, parfumerie, cosmétique ainsi que dans les industries agroalimentaires. Cependant, en se basant sur les résultats de propriétés organoleptiques et propriétés physico-chimiques.

Pour le contrôle des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L., on prescrit la détermination d'un certain nombre de constantes physiques : densité relative, l'indice de réfraction, la miscibilité à l'éthanol à 70%, etc. On impose également la mesure d'un certain nombre d'indice chimique : l'indice d'acide, l'indice de saponification et l'indice d'ester. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer ces propriétés physico-chimiques pour des différentes partie de la plante (les feuilles, les fruits et les tiges) de Beni Mester à cause des faibles quantités de leurs huiles essentielles.

#### III. 5. 2. Propriétés Organoleptiques :

Les résultats des propriétés organoleptiques de l'H.E. obtenues par l'extraction des échantillons provenant de la région de Beni Mester des différentes partie de la plante, différentes périodes et des six stations sont regroupés dans le tableau 12.

**Tableau 12 : Propriétés organoleptiques des H.E. de *Ruta chalepensis* L.**

<i>Provenance de la plante</i> / <i>Propriétés</i>	Couleur	Nature d'huile
(BO1)	Jaune légèrement foncé	visqueuse
(BF2)	Jaune légèrement foncé	visqueuse
(BA3)	Jaune légèrement foncé	visqueuse
(BJ4)	Jaune légèrement foncé	visqueuse
(BA5)	Jaune légèrement foncé	visqueuse
(GA6)	Jaune légèrement clair	Huileuse
(TA7)	Jaune pâle	Huileuse
(OA8)	Jaune légèrement foncé	Très visqueuse
(SA9)	Jaune légèrement foncé	Très visqueuse
(LA10)	Jaune pâle	Huileuse

D'après les résultats ainsi obtenus, nous remarquons que l'huile essentielle de Beni Mester pour des différentes périodes et différents organes a un même aspect de jaune légèrement foncé visqueux. Cependant que l'aspect de l'huile essentielle de cinq stations est compris entre le jaune légèrement clair huileux pour Ghazaouet, Terni et Laourith et le jaune légèrement foncé visqueux pour Ouzidane et Sebdu.

**III. 5. 3. Propriétés Physico-Chimiques :**

Les résultats des propriétés physico-chimiques de l'H.E. obtenues par l'extraction des échantillons provenant du région de Beni Mester des différentes périodes et des six stations sont regroupés dans le tableau 13.

**Tableau 13 :** Propriétés physico-chimiques de l'H.E. de *Ruta chalepensis* L. des différentes périodes de Beni Mester et différentes stations.

<i>Propriétés</i> <i>Provenance</i> <i>de la plante</i>	$d_{4}^{20}$	$n_{D}^{20}$	$[\alpha]^{25}$	$T_{\text{Cog.}}$ (°C)	Mis. à l'EtOH	I.A.	I.E.
(GA6)	0.8116	1.4307	+5°	+7	1V/2V	3.42	36.18
(TA7)	0.8342	1.4311	+7°	+7	1V/2V	2.93	36.80
(OA8)	0.8193	1.4328	+10°	+5	1V/2V	3.78	32.57
(SA9)	0.8285	1.4323	+9°	+5	1V/2V	4.88	33.96
(LA10)	0.8357	1.4315	+6°	+5	1V/2V	5.61	33.33
(BA3)	0.8378	1.4310	+10°	-5	1V/2V	4.27	33.13
(BO1)	0.8636	1.4350	+7°	-5	1V/2V	4.21	35.53
(BF2)	0.8273	1.4344	+9°	-5	1V/2V	7.32	31.52
(BJ4)	0.8342	1.4316	+10°	<-10	1V/2V	4.52	30.55
(BA5)	0.8223	1.4334	+10°	-7	1V/2V	5.75	32.50

**Tableau 14 : Comparaison des Propriétés physico-chimiques de l'H.E. de *Ruta chalepensis* L. de diverses origines.**

<b>Propriétés Provenance de la plante</b>	<b><math>t</math> <math>d_4</math></b>	<b><math>n</math> <math>D^{20}</math></b>	<b><math>[\alpha]^{25}</math></b>	<b>Mis. à l'EtOH</b>	<b><math>T_{Coq.}</math> (°C)</b>	<b>I.E.</b>
<b>Iran [14]</b>	0.8387	1.4257	+0.78°	-	-7°C	-
<b>Argentine [8]</b>	0.8387	1.4257	+0.78°	-	-7°C	-
<b>Espagne [15]</b>	0.839	1.4329	+1°	2.2 Vol	-6°C	3
<b>Turquie [7]</b>	0.8363	1.4325	+1°43'	-	-	-
<b>Argentine [11]</b>	0.8407	1.432	+0.5°	-	-	-

**N.B :** Les résultats des propriétés physico-chimiques sont la moyenne arithmétique de deux à trois déterminations effectuées.

D'après les résultats ainsi obtenus, nous pouvons constater que :

- Les valeurs de densités relatives à l'huile essentielle de la plante varient entre [0.8116-0.8378]. Ces valeurs de densités se rapprochent à celle de bibliographie [0.8363-0.8407], sauf pour l'huile essentielle de la Rue de Beni Mester au mois d'octobre sont pratiquement de densité différente de valeur 0.8636.
- Les valeurs d'indices de réfractions des huiles essentielles de la Rue de Beni Mester récoltée en Juin et Août 2005 sont proches à celle de la Rue de la Turquie [7], de l'Argentine [8], de l'Iran [14] et de l'Espagne [15]. D'autre par, pour les autres huiles de Tlemcen, d'indices de réfractions varie entre [1.4307-1.4350]. Ces valeurs sont proches à celle de la Rue de d'Argentine [11].
- Les résultats du pouvoir rotatoire de nos huiles essentielles varient entre +5° et +10°. Ces derniers sont très loin de ceux donnés dans la littérature (+0.5°, +1°43'). on remarque que toutes les autres huiles essentielles sont dextrogyres (positive).
- Il est intéressant de remarquer que le point de congélation diminue ensuite augmente avec le vieillissement de la plante. Le minimum est enregistré pendant la période de Juin <-10°C. La majorité de ces résultats, sont proches de ceux obtenues par littératures (-6°C, -7°C), mais très loin pour les autres stations +5°C et +7°C.
- Nous constatons que la miscibilité à l'éthanol 70% est constante: 1V/2V, elle est pratiquement proche que celle d'Espagne (1V/2,2V)

- Pour l'ensemble des huiles essentielles, l'indice d'acide est très variable d'une huile à une autre (2.93 à 7.32). Donc nous avons 2.93 à 7.32 mg de composants acides libres dans 1g d'huile essentielle.
- Les résultats de l'indice d'ester sont compris entre 30.55 et 36.80, c'est-à-dire qu'il y a libération de 30.55 à 36.80 mg d'acide par l'hydrolyse d'ester contenu dans 1g d'huile essentielle.

Nos résultats sont dans l'ensemble conformes aux données de la littérature à l'exception de l'indice d'ester. Les caractéristiques physicochimiques de nos huiles avoisinent dans l'ensemble les normes.

### **III. 6. Conclusion :**

La qualité de l'essence de *Ruta chalepensis* L. dépend également de l'époque de la région et de la durée de séjour au sol. Ainsi l'huile extraite des diverses parties d'une même plante (fleur, feuille, tige, etc.) peuvent produire des propriétés organoleptiques les mêmes celle venant d'une région.

La qualité de l'essence d'une plante varie en fonction de la période de la journée où elle est récoltée. Il existe différentes qualités d'huiles essentielles naturelles de *Ruta chalepensis*. Elles diffèrent selon la variété des régions de la plante dont elles sont extraites, la période de récolte et le type de sol sur lequel se trouve le verger. Ces huiles présentent des compositions chimiques spécifiques.

L'obtention d'huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de bonne qualité exige donc des conditions climatiques et des conditions de culture bien particulières, c'est pourquoi les valeurs des propriétés physico-chimiques des différentes régions sont différentes de ceux donnés dans la littérature.

### **Références Bibliographiques**

- [1] A.N.A.T., Agence Nationale de l'Arrangement du territoire carte topographique de la wilaya de Tlemcen. (1989).
- [2] Mansour S. Al-Said, Tariq M.A., Al-Yahya M.A. and Ageel A.M. " Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine " J. Ethnopharmacol. 28 : 305-312, (1990).
- [3] Mansour S. Al-Said, Tariq M.A., Al-Yahya M.A., Rafatullah S., Ginnawi O.T and Ageel A.M. « Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine » J. Ethnopharmacol. 28 : 305-312, (1990).
- [4] Abdolhossein Rustaiyan, Morteza Khosravi and Faramarz Sultani-Loffabadi, Constituents of the Essential oil of *Ruta chalepensis* From Iran. J. Essent, Oil Res. 14, 378-379 (septembre, october 2002).
- [5] Olga Tzakou and Maria Couladis. Essential oil of *Ruta chalepensis* L. From Greece. . J. Essent, Oil Res.,13, 258-259 (July/August 2001).
- [6] A.Verzera, L.Mondello and S. Ragusa. L'olio essenziale delle Foglie di piante tipiche della Flora mediterranea. Essenze Derivati agrumari, 70, 207-210. (2000).
- [7] K. H. C. Baser, T. Özek and S. H. Beis. Constituents of the Essential oil of *Ruta Chalepensis* L. From Turkey. J. Essent, Oil Res., 8, 413-414, (July/August 1996).
- [8] G. Fester, E. Martinuzzi, Retamar y Rigcardi. Estudios Sobre Esencias Volatiles Argentinas. Esencias de Rutaceas. Instituto de Quimica orgánica. Facultad de Bioquimica. Vol. 1, 2<sup>nd</sup>. Ed. p.554. Argentina. (1972).
- [9] Carree P., Précis de technologie et de chimie industrielle. ED. Bailliere J.B. F T3. (1953).
- [10] M. Hmamouchi, M. Lahlou and A. Agoumi. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. 71, 308-314. Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat, B.P ; 6203, Maroc. (2000).
- [11] R. P. A. IÑIGO, M. E. L. DE VIAÑA and C. A. N. CATALAN. Essential oil of *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae). Ayacucho 419 (4000) S. M. de Tucuman. Argentina. (1979).
- [12] Chebli Bouchra, Achouri Mohamed and Idrissi Hassani Mina. Antifungal activity of Essential oil from several medicinal plants against four postharvest citrus pathogens. Phytopathol. Mediterr. 42, 251-256. (2003).

- [13] **Mme BENAMMARE FAIZA**, Contribution à l'étude des caractéristiques physico-chimiques et analyse Chromatographie (CCM, CPG) de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. (Fidjel). Mémoire de fin l'étude supérieure en Biologie, p.34, (2003).
- [14] **G. A. Fester, E. A. Martinuzzi and J. A. Retamar**. Algunas Esencias volatiles. J. Essent, Oil Res., 21, 30, (1992).
- [15] **Aloisio Fernandes Costa e José Cardoso DO Vale**. Subsídios para o estudo das plants aromáticas portuguesas. Essência de "*Ruta chalepensis* L." ssp. "*Bracteosa* DC.", congresso LUSO- Espanhol de farmácia. (2000).

## **Chapitre IV :**

**Etude analytique des  
huiles essentielles de  
*Ruta chalepensis* L.**

## **I. Analyse chimique des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. :**

### **I.1. Introduction :**

Comme toute substance, les huiles essentielles se caractérisent par une composition chimique ou biochimique analysable. Cependant, les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie en phase gazeuse (CPG) et Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) pour la détermination de leur composition chimique et l'identification de leur chimiotype.

La composition chimique de l'huile essentielle de l'Ouest Algérien, restent inconnues, alors l'objectif de cette étude, est de déterminer, d'un côté ces derniers, et d'un autre côté, d'étudier l'effet de la période de récolte, le lieu de récolte ainsi que la partie de la plante sur la production en huile essentielle. Pour l'avant dernier facteur, nous avons tenté de définir les chemotypes de la plante suivant un itinéraire nord-sud de la wilaya de Tlemcen dans l'Ouest Algérien, de la côte jusqu'à Sebdou sur une distance d'environ une centaine de kilomètres.

## **II. Application de la chromatographie sur couche mince (CCM) à l'Analyse de l'H.E. de *Ruta chalepensis* L. :**

### **II.1. Introduction :**

Les techniques de chromatographie se sont développées avec une telle rapidité au cours de ces 40 dernières années que leur utilisation en chimie analytique est devenue incontournable tant en laboratoire de recherche qu'en laboratoire de contrôle. A l'origine utilisée pour la séparation de substances colorées (d'où son nom), la chromatographie est aujourd'hui une méthode puissante d'analyse qualitative et quantitative.

La chromatographie sur couche mince est une méthode simple et rapide qui permet d'analyser des produits odorants purs, de suivre l'évolution d'une réaction ou de tester la pureté de composés organiques, etc. [1,2]. Cependant, nous nous sommes intéressés à l'application de la chromatographie sur couche mince (CCM) comme moyen d'analyse permet l'identification de certains composés des H.E. de la plante étudiée.

### **II.2. Définition et appareillage :**

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon a été déposé sur la

phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant [3, 4].

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont :

- **La cuve chromatographique** : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.
- **La phase stationnaire** : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant est fixée sur une plaque de verre à l'aide d'un liant comme le sulfate de calcium hydraté (plâtre de Paris) l'amidon ou un polymère organique.
- **L'échantillon** : environ un microlitre ( $\mu$ l) de solution diluée (2 à 5%) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- **L'éluant** : un solvant pur ou un mélange : il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon.

### II.3. Principe :

La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants (état liquide) et la phase stationnaire est généralement un adsorbant maintenu sur une plaque soit en verre soit en plastique rigide. L'échantillon soit liquide ou solubilisé dans un solvant volatil est déposé ponctuellement sur la phase stationnaire (sur la plaque). Les constituants de l'échantillon sont élués (entraînés) par la phase mobile qui grimpe par capillarité vers le haut de la plaque. Ils peuvent être identifiés par comparaison à l'élution simultanée de témoins.

Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires [3, 4].

### II.4. Conditions opératoires :

#### a. L'échantillon :

On préparera trois plaques CCM des huiles essentielles de la plante utilisée :

- L'H.E. de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester récoltée à différentes périodes de l'année : Octobre 2004, Février, Avril, Juin et Août en 2005. Procéder à la CCM (5 dépôts sur la même plaque).
- L'H.E. de *Ruta chalepensis* L. des différentes stations, qui a été faite en avril 2005 : Beni Mester, Terni, Laourith, Sebdu, Ouzidane et Ghazaouet. Procéder à la CCM (6 dépôts sur la même plaque).

- L'H.E. de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester des différentes parties de la plante récoltée en Avril 2005. Procéder à la CCM (4 dépôts sur la même plaque).

**b. Absorbant :**

Pour L'analyse des huiles essentielles de nos échantillons, nous avons utilisé comme absorbant une plaque en verre de gel de silice de dimension 20 x 20 cm, ce dernier fait partie des principaux absorbants utilisés en CCM puisqu'il assure une bonne séparation des composés d'une H.E.

**c. Eluant :**

Le solvant le plus efficace pour la séparation des constituants des H.E. est le mélange benzène-acétate d'éthyle dans les proportions volumiques 95/5 [4]. Cependant, vu la toxicité du benzène, nous avons utilisé comme l'éluant toluène- acétate d'éthyle (95/5).

**d. Révélation :**

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation. Les taches sont ensuite cerclées au crayon. Les méthodes usuelles de révélation sont les suivantes : radiations UV, fluorescence, iode, atomisation,...

La détection de nos échantillons a été réalisée en premier lieu avec la lampe UV (366-254 nm) mais puisque de nombreux composés n'absorbent pas la lumière UV, on a été obligé de rendre visible certaines tâches en pulvérisant notre plaque avec une solution de vanilline sulfurique à 1%.

**e. Calcul du facteur de rétention :**

Le paramètre le plus utilisé pour l'analyse qualitative est le facteur de rétention  $R_f$ .

❖ **Définition :** La valeur de  $R_f$  est définie par le rapport de la distance parcourue par la substance sur la distance parcourue par le front de solvant. La valeur de  $R_f$  est donc comprise entre 0 à 1.

❖ **Expression des résultats :** Le facteur de rétention  $R_f$ , est donné par la formule suivante :

$$R_f = \frac{d_c}{d_s}$$

$d_c$  : distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache) en cm.

$d_s$  : distance parcourue par le front du solvant en cm.

**N.B.** Le mode opératoire concernant la développement, la révélation et la détermination du facteur de rétention citées ci-dessus, sont décrits dans la partie expérimentale.

### **III. Application de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) à l'Analyse des H.E. de *Ruta chalepensis* L. :**

#### **III.1. Introduction :**

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode d'analyse immédiate, elle constitue pour le chercheur la méthode de choix indispensable à l'analyse qualitative et quantitative des mélanges complexes.

En 1906, un botaniste russe Mikhail Semenovitch Tswett purifie des pigments végétaux, comme la chlorophylle, sur une colonne de craie. Il donne alors à ce phénomène de séparation le nom de " **Chromatographie** " (du grec *chrôma*, couleur et *graphein*, écrire) qu'il définit comme l'enregistrement graphique des couleurs. On assiste alors à la naissance de la chromatographie, dont la définition a fortement évolué [1].

#### **III.2. Définition et Appareillage :**

La chromatographie en phase gazeuse est une méthode de séparation des composés susceptibles d'être vaporisée par chauffage sans décomposition. Elle permet ainsi l'analyse de mélanges très complexes dont les constituants peuvent différer d'une façon considérable par leur volatilité.

Un appareil de chromatographie en phase gazeuse comporte trois parties : l'injecteur, la colonne et le détecteur à travers lesquelles un gaz vecteur entraîne les substances d'un mélange à séparer. Le gaz vecteur le plus utilisé est l'hélium, les autres sont l'hydrogène, l'azote ou l'argon. Il doit être très pur et surtout ne contenir ni oxygène, ni eau. Le débit du gaz est ajusté par un régulateur [5].

- **Injecteur**

Il permet d'introduire un liquide ou une solution qui doit être vaporisé instantanément avant d'être transféré dans la colonne. D'une manière générale, la chambre d'injection doit être à une température plus élevée que celle de la colonne pour faciliter l'évaporation des échantillons. La température idéale est celle qui est 20°C plus élevée que le point d'ébullition de la substance la moins volatile. Cette opération est faite à l'aide d'une micro seringue.

Le choix de l'injecteur est dicté par le type de colonne utilisée et par la nature des produits à séparer.

- **Colonne :**

Il existe deux types de colonnes avec des variantes (figure 42):

- Colonnes remplies ou à garnissage (packed),
- Colonnes capillaires (open tubular).

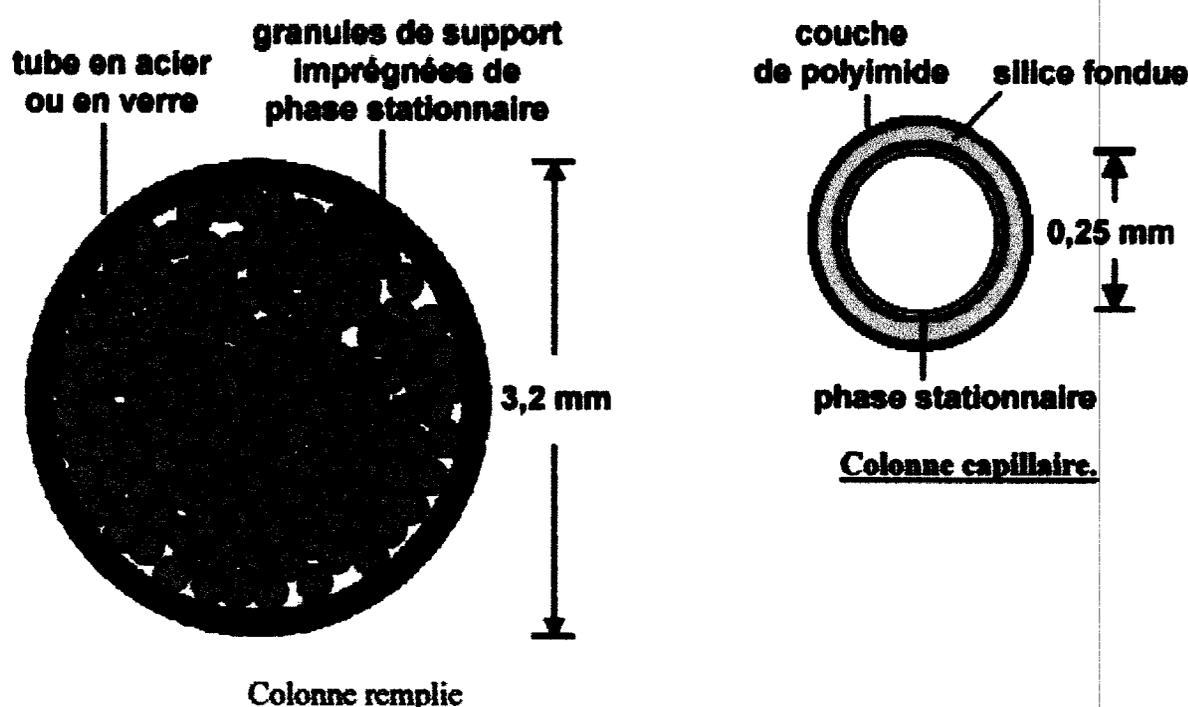


Figure 39 : deux types de colonnes.

- **Colonnes remplies ou à garnissage (packed)** sont constituées d'une tubulure en verre (inerte mais mauvais conducteur de chaleur), en aluminium acier inoxydable (assez inerte et bon conducteur de chaleur). Ces colonnes sont couramment d'un diamètre interne de 2 à 6 mm et d'une longueur de 0.5 à 10 m. elles sont remplies d'un support poreux, comme elles peuvent être remplies d'un adsorbant.

- **Colonnes capillaires** constituées par un tube silice fondue recouvert d'une mince couche de polyimide. Elles ont des diamètres internes de 0.25 à 0.5 mm et des longueurs comprises entre 15 à 100 m. L'efficacité des colonnes capillaires ne dépend que de la vitesse de passage dans la phase stationnaire.

• **Détecteur :**

Le détecteur est un instrument principal dans un chromatographe. Il est destiné à déterminer la répartition des gaz à la sortie de la colonne.

Par l'intermédiaire d'un enregistreur, le détecteur donne un chromatogramme. Pour qu'un détecteur puisse être utilisable, il doit posséder un certain nombre de qualités. Bien que de très nombreux types de détecteurs aient été décrits, une dizaine seulement d'entre eux sont utilisés dans la pratique. Les différents types de détecteurs sont : détecteur à conductibilité thermique-catharomètre (TCD), détecteur à ionisation de flamme (FID), détection par spectroscopie infrarouge (CPG/IR), détection par spectrométrie de masse (CPG/SM),... [6].

### III.3. Principe :

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire (emprisonnée dans la colonne) et la phase mobile qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne.

Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure,...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité,...). A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange.

Les analyses chromatographiques aboutissent à l'obtention d'un chromatogramme qui représente l'évolution d'un paramètre (signal électrique provenant du détecteur) lié à la concentration instantanée du constituant élué (ou soluté), en fonction du temps. Le chromatogramme est une représentation graphique où des pics émergent de la ligne de base, tracé obtenu en l'absence de composés [6].

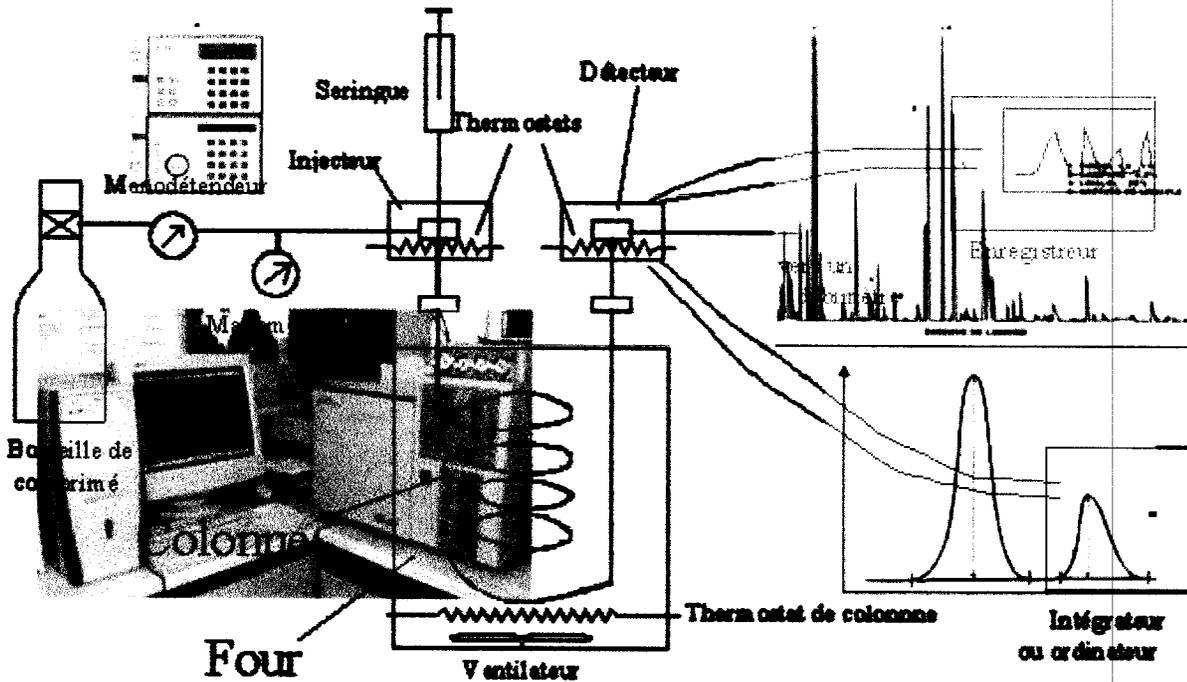


Figure 40 : Chromatographie en phase gazeuse (CPG).

### III.4. Séparation chromatographique :

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences de répartition des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une

entre les deux phases : l'une phase mobile et l'autre stationnaire. Ce phénomène est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre; ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier. À ce moment le rapport des concentrations est égal au rapport des répartitions dans les deux phases ou coefficient de partage K. Ce facteur, sans dimension, peut être relié au temps de rétention.

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

où  $C_s$  = concentration dans la phase stationnaire  
 $C_m$  = concentration dans la phase mobile

Plus K est grand, plus le composé est absorbé fortement dans la phase stationnaire et plus la rétention est grande et inversement. L'affinité de chaque constituant pour la phase stationnaire dépend de sa solubilité dans cette phase et de sa polarité. Les forces qui entrent en jeu sont donc les forces de Van der Waals, les ponts hydrogène, etc.

La phase stationnaire en chromatographie de partage doit être chimiquement inerte, c'est-à-dire qu'elle ne doit réagir avec aucun des constituants du mélange au cours de la séparation.

La valeur de K dépend de la structure du composé qui détermine son affinité pour chacune des phases ; de la nature de la phase stationnaire qui est un adsorbant ou un solvant pour chacun des composés, de la phase mobile, seulement si elle est un liquide, et donc un solvant pour chacun des composés et de la température qui affecte les pressions de vapeur et les solubilités.

Un des paramètres les plus important en chromatographie sur colonne est le volume de rétention. Le temps de rétention est habituellement utilisé à la place du volume de rétention et sa grandeur dépend ; de la nature de la phase stationnaire, de la nature de la phase mobile, du débit de la phase mobile et de la longueur de la colonne [6, 7].

### **III.5. Conditions opératoires:**

Les conditions analytiques sont les suivantes :

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse à régulation électronique de pression de type SHIMADZU – GC 17A, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et muni d'une colonne capillaire en silice fondue de type DB35 – MS, de 30 m de longueur, 0.25 mm de diamètre interne et 0.25 µm d'épaisseur

type DB35 – MS, de 30 m de longueur, 0.25 mm de diamètre interne et 0.25 µm d'épaisseur de film. La température de la colonne est programmée de 60°C à 220°C à raison de 5°C/mn et en isotherme (220°C) pendant 2mn. Les températures de l'injecteur et le détecteur sont fixées à 270°C. Le gaz vecteur utilisé est l'azote avec un débit de 1.8 ml/mn.

Pour toutes les analyses, on injecte manuellement 0,2µl d'échantillon d'huile essentielle avec l'acétone.

#### **IV. Application de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) à l'Analyse des H.E. de *Ruta chalepensis* L. :**

##### **IV.1. Introduction :**

La spectrométrie de masse est une technique de détection très puissante et très sensible qui permet d'obtenir la masse moléculaire d'un composé par analyse du rapport m/z et de corréler son spectre de masse avec sa structure. Elle est souvent couplée aux techniques de séparation, telles que la chromatographie en phase gazeuse GPC/MS ou en phase liquide HPLC/MS, auxquelles elle fournit un détecteur universel. Cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet une élucidation commode des structures des différents éléments des mélanges complexes même à l'état de traces.

Le service de la GPC/MS est offert à la communauté scientifique, aux chercheurs universitaires ou ceux du monde de l'industrie. Ce service est dédié à l'identification de composés d'un mélange complexe dans différents domaines [7].

##### **IV.2. Définition et Appareillage :**

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires. Elle permet de déterminer la masse moléculaire, de corréler le spectre d'un composé avec sa structure, d'expliquer des mécanismes de ruptures de liaisons, de trouver les facteurs rendant plus ou moins probable la formation de l'un ou l'autre des fragments ioniques. Par spectrométrie de masse, on peut réaliser des analyses qualitatives et quantitatives. Des limites de détection inférieures au nanogramme et même au picogramme ( $10^{-12}$  g) sont souvent atteintes.

La spectrométrie de masse est souvent couplée avec un système de chromatographie en phase gazeuse (GPC/MS), et cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces (quelques nanogrammes de mélange) [6, 7].

### IV.3. Principe [8, 9, 10] :

Le couplage du chromatographe et du spectromètre de masse est simplifié du fait de la nature de la phase mobile qui est gazeuse.

Le problème réside dans les différences de pression qui existent entre les deux appareils ; le chromatographe fonctionnant à pression atmosphérique et le spectromètre de masse sous un vide très poussé. Lorsqu'une molécule est introduite dans le spectromètre de masse, son ionisation produit plusieurs types d'ions. On obtient alors un spectre de masse qui est constitué des abondances de ces ions (en ordonnée), en fonction de leur rapport masse/charge (en abscisse).

Le couplage CPG/SM permet l'analyse de composés thermiquement stables, de masse moléculaire inférieure à 1000 u.

La spectrométrie de masse réalise un balayage de masse de 10 u jusqu'à 1000 u en 2 à 3s. Le signal obtenu est en 3 dimensions.

- ✓ Intensité (I)
- ✓ Temps de rétention (tr).
- ✓ Masse (m) sur charge (z).

Si l'on supprime l'axe des masses, on obtient un chromatogramme, qui est constitué du temps en abscisse, du courant total d'ions en ordonnée. Chaque pic représente un constituant.

Si l'on supprime l'axe des temps, on obtient un spectre de masse à l'instant t.

Deux modes sont disponibles :

**Le mode SCAN :** on réalise un balayage sur une gamme de masse prédéterminée. Il est à noter que plus on réalise un balayage de masse sur une gamme large, moins on sera sensible.

**Le mode SIM (Single Ion Monitoring) :** on choisit d'analyser de 2 à 3 masses jusqu'à 20 masses. Dans ces conditions, on aura plus de chances de détecter le sommet d'un pic.

- **Interface CPG/SM :**

L'interface CPG/SM est un problème délicat à résoudre. En effet, le chromatographe opère à pression atmosphérique, alors que le spectromètre de masse doit être maintenu sous vide poussé. Dans le cas de colonnes capillaires, le flux total peut être envoyé dans la source du spectromètre de masse, grâce à l'utilisation pompes puissantes permettant de maintenir la source d'ions à une pression d'environ  $10^{-4}$ Pa. Le couplage direct est réalisé via un bloc chauffé.

**Remarque :** dans le cas de colonnes remplies, le flux gazeux est trop important pour pouvoir être envoyé directement dans la source du spectromètre de masse. Dans ce cas, une partie du

flux gazeux de sortie du chromatographe est prélevée à l'aide d'une interface et introduite dans le spectromètre de masse.

Le couplage direct est grandement facilité, grâce à l'utilisation de colonnes en silice fondue qui est un matériau flexible, et permet des connections sans difficultés. Ainsi, l'extrémité de la colonne peut être amenée directement au niveau de la chambre d'ionisation. Un montage simple est réalisé à l'aide d'un joint d'étanchéité thermostable.

- **La source d'ions :**

Son rôle est de :

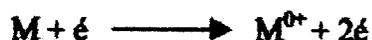
- produire des ions,
- les accélérer,
- Les concentrer sur la fente de sortie.

Deux techniques peuvent être utilisées

- l'impact électronique (EI),
- L'ionisation chimique (CI).

Un filament incandescent émet des électrons qui traversent la chambre d'ionisation. Ces électrons bombardent les molécules d'échantillon à l'état de vapeur, qui entrent dans la source. Les molécules se brisent en fragments, parmi lesquels on trouve des ions positifs qui formeront le spectre caractéristique de la molécule étudiée.

La plupart des molécules sont ionisées par un bombardement de l'ordre de 10 à 12 eV.



$V_e >$  potentiel d'ionisation.

$M^{0+}$  ion moléculaire.

Si on augmente l'énergie des électrons incidents, l'excédent d'énergie interne provoque la cassure d'un certain nombre de liaisons chimiques :



$V_e >$  Potentiel d'apparition.

$A^+$  ion fragment.

La fragmentation atteint un palier aux alentours de 50 eV. Par convention, l'enregistrement des spectres se fait à 70 eV : dans ces conditions les fragmentations sont produites avec un maximum de rendement et de reproductibilité d'un appareillage à l'autre. Les électrons sont recueillis sur le collecteur qui mesure le courant d'électrons émis par le filament.

Deux petits aimants placés de part et d'autre de la source donnent une trajectoire hélicoïdale à ce flux d'électrons, ce qui augmente la probabilité des collisions et donc le rendement d'ionisation.

Le repousseur (repeller) est porté à un potentiel positif faible, et chasse les ions de la source. Les ions sont ensuite accélérés grâce à l'existence d'un gradient de potentiel, et focalisés grâce à une optique ionique constituée de 3 électrodes.

La chambre d'ionisation est portée à une température d'environ 200°C. Elle peut être portée à plus haute température (de 200°C à 300°C) par un système de chauffage annexe. On évite ainsi des condensations et donc des dépôts de contaminants lors de l'analyse de produits peu volatils. Toutefois, ce chauffage entraîne une augmentation de l'énergie interne des molécules et favorise la fragmentation des ions moléculaires, dont l'intensité peut être diminuée, voire annulée.

- **Le quadripôle**

Le quadripôle est un analyseur de masse à champ électrique seul. Il est très utilisé dans la technique couplée CPG/SM, dont les applications n'exigent pas une haute résolution. Ce dispositif offre l'avantage d'être moins coûteux et peu encombrant. De plus, il permet un balayage très rapide de la gamme de masses à observer.

Un filtre quadripolaire est composé de quatre barres conductrices, raccordées électriquement deux à deux, de section idéalement hyperbolique. On superpose à une tension continue  $V_c$  une tension alternative  $V_a$  de fréquence  $n$  et d'amplitude maximale  $V_m$  ( $n$  est de l'ordre de 1,2 MHz et le rapport  $V_m/V_a$  de 6).

- **Le détecteur**

Les détecteurs est la zone où les ions sélectionnés sont multipliés. L'appareil est équipé d'un détecteur à dynode continue de type Channeltron. Le Channeltron est un tube en verre dont la face interne a été revêtu d'oxydes de plomb semi-conducteur, sur lesquels la multiplication des électrons a lieu. Il possède un gain de  $10^6$ . Le gain étant le nombre  $N$  d'électrons en sortie pour un ion à l'entrée.

- **Le vide :**

Le vide permet d'avoir un meilleur parcours des ions pour les raisons suivantes :

- permet d'avoir les trajectoires des ions libres de toute collision,
- réduit les réactions ions / molécule et les interférences dues au bruit de fond,
- évite les décharges électriques,
- allonge la durée de vie du filament, et du photomultiplicateur,
- Augmente la sensibilité.

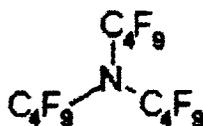
Classiquement, un appareil comporte quatre pompes :

- Deux pompes primaires : une des pompes sert d'amorçage (vide primaire relativement faible) pour les pompes secondaires, l'autre pompe est destinée aux accessoires interfaces GC/MS, ligne de gaz réactant, sas d'introduction directe).
- Deux pompes secondaires : côté source (capacité de pompage de l'ordre de 300 L/s et côté analyseur (capacité de pompage de l'ordre de 180 L/s).

Les niveaux de vide atteints sont au niveau primaire :  $5.10^{-2}$  Torr et secondaire :  $5.10^{-5}$  à  $5.10^{-6}$  Torr avec la colonne et un débit d'hélium de 2 ml/min.

- **Réglage du spectromètre en impact électronique :**

Le spectromètre se règle à partir du PFTBA ou FC43 (perfluorotributylamine), produit de référence, dont toutes les caractéristiques spectrales sont parfaitement connues



Il possède de bonnes propriétés chimiques, pour la spectrométrie de masse : produit stable, volatil avec des fragments répartis sur une large gamme de masse (de 31 à 614 en impact électronique). Les masses de références sont : 69, 131, 219, 414, 502, 614.

Les rapports de fragmentation sont calculés à partir du pic 69.

- ✓ 69 : 100%
- ✓  $30\% < 131 < 60\%$
- ✓  $40\% < 219 < 75\%$
- ✓  $2\% < 502$

Ce réglage doit être effectué à chaque début de séance, en mode automatique AutoTune (EI).

Le système entame alors une optimisation de chacun des paramètres du spectromètre. Il fixe par défaut trois paramètres : le repousseur, le courant d'émission, et l'énergie des électrons. Le réglage s'effectue sur la masse 502 ensuite s'ajuste sur les rapports des autres pics. Lorsque l'appareil a terminé son réglage, il enregistre les paramètres et imprime un bulletin.

La valeur importante dans ce rapport est celle du multiplicateur d'électrons qui peut indiquer que l'appareil est encrassé.

- **Entretien du spectromètre :**

Ce matériel de génération ancienne a besoin d'un entretien minutieux fréquent. Il est nécessaire de nettoyer la source régulièrement en la démontant entièrement et en frottant les

pièces métalliques avec un papier de verre extra-fin. Les parties qui le supportent, sont rincées dans une succession de liquides (eau distillée, alcools ou solvants chlorés...). C'est souvent à lors du démontage ou du remontage que l'on casse une pièce.

#### **IV.4. Divers modes de fragmentations :**

La probabilité de rupture d'une liaison dans l'ion parent dépend de l'énergie de cette liaison, de la possibilité de transitions de faible énergie et de la stabilité des fragments chargés ou non chargés résultant de cette rupture. Dans une certaine mesure, il est possible de prévoir les divers modes de fragmentation de l'ion parent en se basant sur nos connaissances relatives aux dégradations thermiques.

En raison de la très faible pression régnant dans le spectromètre (environ  $10^{-5}$  torr) les collisions intermoléculaires sont peu nombreuses et nous pouvons supposer qu'il s'agit essentiellement de décompositions monomoléculaires.

La charge et le radical de l'ion moléculaire induisent évidemment les réactivités différentes et l'on distingue des fragmentations (ruptures), de caractère ionique, induites par la charge, et d'autres de caractère radicalaire, induites par leur radical [11].

#### **IV.5. Conditions opératoires :**

Les huiles essentielles ont été analysées sur un chromatographe de type Varian (série CP-3800) équipé d'une colonne de type DB5ms : CP-sil 8 CB-MS colonne capillaire à faible polarité et à faible bleeding (longueur : 30 m, et de 0,248 mm de diamètre intérieur, l'épaisseur du film est de 0,25  $\mu\text{m}$  (film thickness)) couplé à un spectrographe de masse (SM) de type Varian Saturn 2000.

Energie d'ionisation électronique : 70 eV.

◆ **Les conditions analytiques sont les suivantes :**

Température de l'injecteur : 220°C.

◆ **Température du four :**

Température initiale : 50°C pendant 2 mn.

Température finale : 220°C pendant 20 min à raison de 4°C/mn.

Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 ml/min et les gaz auxiliaires sont l'hydrogène et l'air dépourvu de toute impureté organique.

Pour toutes les analyses, on injecte manuellement 0,02  $\mu\text{l}$  d'échantillon d'huile essentielle pure dans Split 1/8. Chaque échantillon d'huile essentielle est injecté trois fois de même que la solution de calibrage interne contenant un mélange d'alcane ( $\text{C}_6$  à  $\text{C}_{10}$ ).

### V. Méthode d'identification :

Pour l'identification des composés séparés de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L., nous avons utilisé :

- La méthode de comparaison de temps de rétention d'un composé à celui des étalons.
- Méthode d'identification par l'indice de KOVATS.

Dans le cas de programmation de température, l'indice de KOVATS est calculé selon la formule suivante [2] :

$$IK = 100 \times \frac{TR(i) - TR(P_z)}{TR(P_{z+1}) - TR(P_z)} + 100.z$$

Avec :

IK : l'indice de KOVATS.

TR (i) : temps de rétention du soluté.

TR (P<sub>z</sub>) : temps de rétention de l'alcane sortant avant le soluté avec z l'atome de carbone.

TR (P<sub>z+1</sub>) : temps de rétention de l'alcane sortant avant le soluté avec z l'atome de carbone +1.

Pour cela on injecte le mélange d'hydrocarbure (alcanes de C<sub>8</sub> à C<sub>20</sub>).

#### V.1. Identification des constituants d'un l'H.E. de *Ruta chalepensis* L. :

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), sur la chromatographie en phase gazeuse (GC) et sur chromatographie sur couche mince (CCM).

L'identification des molécules a été confirmée par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux connus dans la littérature [12, 13, 14]. Les indices de rétention des composés ont été calculés grâce aux temps de rétention d'une série de n-alcanes avec une interpolation linéaire. Ceci nous a permis d'identifier neuf (09) composés contenus dans les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. d'Algérie (voir tableau 15).

**Tableau 15 :** La liste des composés identifiés dans les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. d'Algérie.

N°	Nom du composé	TR <sub>DB35</sub> (min)	IR <sub>cal</sub>	Ik <sub>cal</sub>	IR <sub>ref</sub> [12,13,14]	Technique
1	Limonène	9.94	1021	1170	1026	IR, SM
2	2-Nonanone	12.41	1086	1280	1091	IR, SM
3	2-Nonanol	12.75	1097	1292	1099	IR, SM
4	2-Décanone	15.37	1192	1382	1194	IR, SM
5	n-Décanol	15.97	1270	1394	1273	IR, SM
6	2-Undécanone	18.32	1296	1567	1296	IR, SM
7	2-Undécanol	20.27	1302	1655	1308	IR, SM
8	2-Dodécanone	21.11	1390	1685	1395	IR, SM
9	2-Tridécanone	23.83	1493	1787	1494*	IR, SM

TR<sub>DB35</sub> : temps de rétention du composé sur la colonne DB35 – MS;

IR<sub>cal</sub> : indice de rétention du composé calculé en utilisant une colonne DB5 – MS;

IR<sub>ref</sub> : indice de rétention du composé de référence déterminé sur une colonne DB5 – MS;

\* : valeur extrapolée.

Ik<sub>cal</sub> : l'indice de KOVATS du composé sur la colonne DB35.

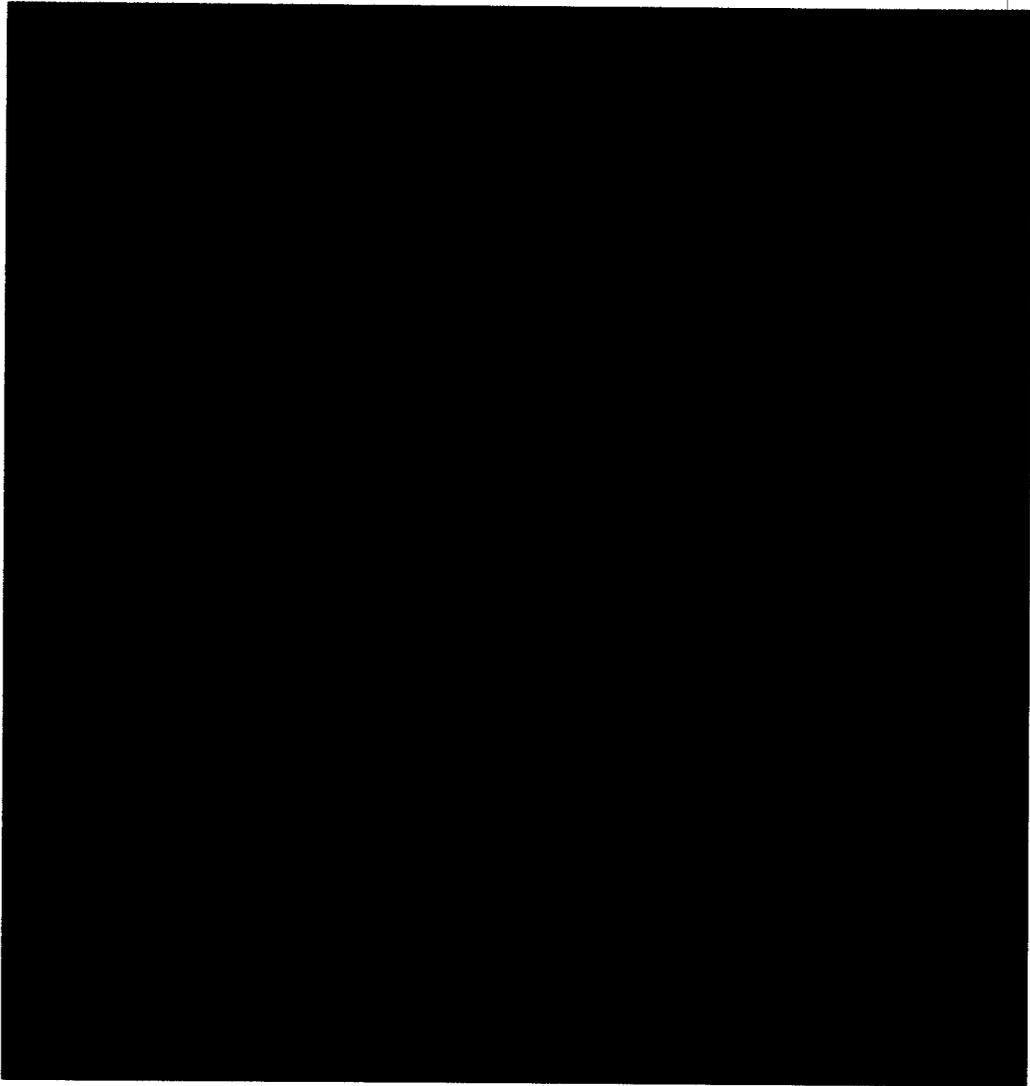
## VI. Résultats et interprétations :

### VI.1. Résultats de la CCM :

L'application de la chromatographie sur couche mince (CCM) comme moyenne d'analyse nous a permis de révéler pour chaque extrait d'huile essentielle, pour la révélation de nos constituants d'huile essentielle, nous avons utilisé deux méthodes usuelles de révélation :

- Par la lampe ultraviolette, en exposant les plaques à une source de radiation UV, certains composés apparaissent sous forme de taches brillantes. C'est un indicateur fluorescent est incorporé à l'adsorbant, la plaque entière devient fluorescente lorsqu'elle est soumise à une radiation UV ; les composés sont révélés sous forme de taches sombres.
- Par réactif de coloration, en pulvérisant les plaques à une solution de vanilline sulfurique à 1%. On a pris une photo pour trois plaques, après un mois (voir figure 41, 42 et 43). Les couleurs des taches changent lentement suivant le temps.

Les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux 16, 17 et 18.



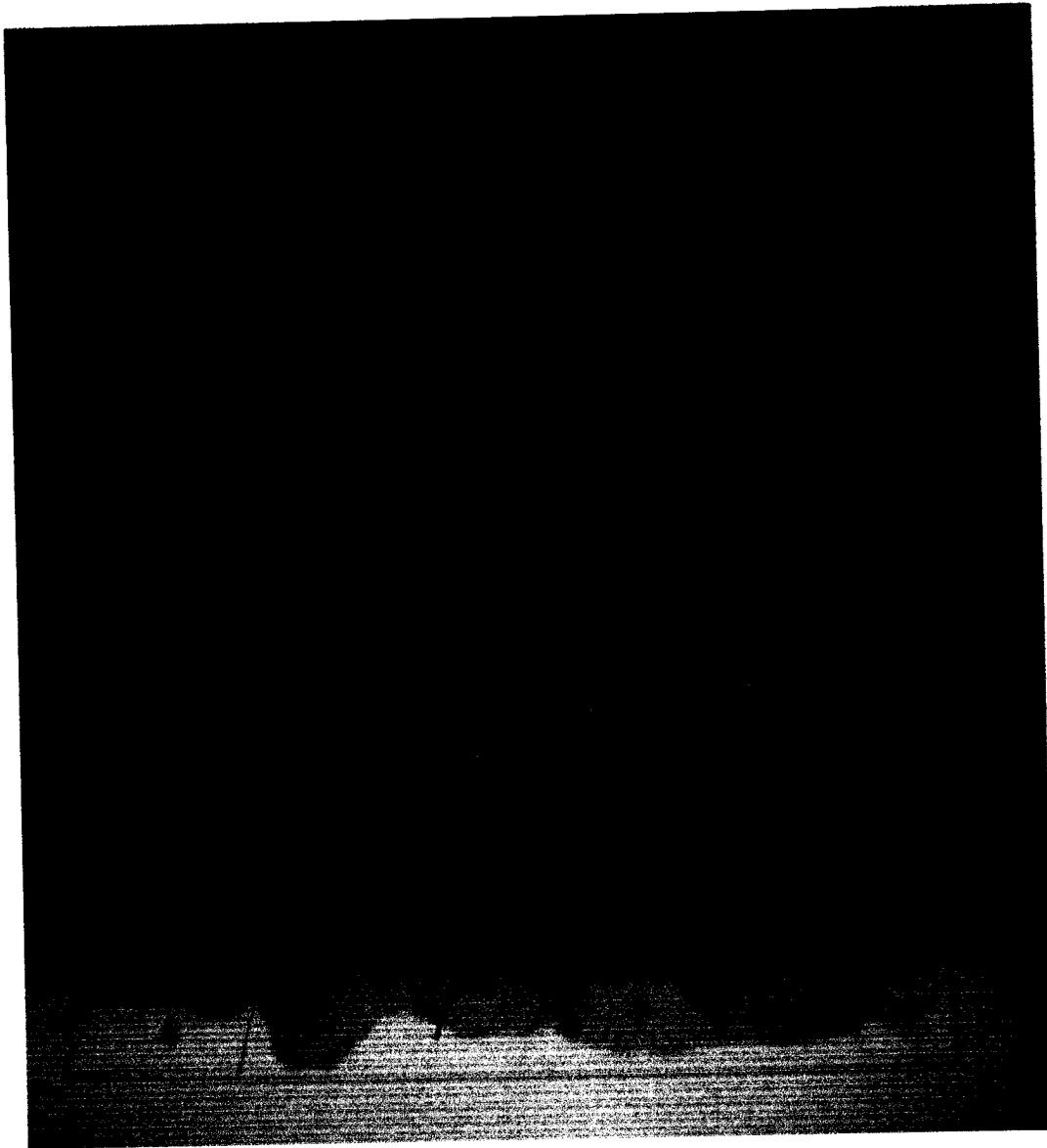
**Figure 41 : les H.E de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester récoltée à différentes périodes de l'année : Octobre 2004 (1) , Février 2005 (2), Avril 2005 (3), Juin 2005 (4) et Août 2005 (5).**

**Tableau 16 : Résultats de la CCM des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester récoltée à différentes périodes de l'année.**

Echantillons	N° des taches	Révélation par vanilline sulfurique		Détection par UV (nm)			Visible	
		R <sub>f</sub>	Couleur	R <sub>f</sub>	Couleur UV <sub>254</sub>	Couleur UV <sub>366</sub>	R <sub>f</sub>	Couleur
Octobre 2004	1	0.03	Violet	0.25	Violet		0.85	Marron clair
	2	0.21	Noir	0.53	Jaune			
	3	0.31	Bleu violacé	0.59	Jaune fluorescent	Jaune		
	4	0.48	Gris noir	0.69	Bleu fluorescent			
	5	0.59	Jaune	0.73	Bleu			
	6	0.90	Noir					
Février 2005	1	0.03	Violet	0.25	Violet		0.85	Marron clair
	2	0.21	Noir	0.53	Jaune			
	3	0.31	Bleu violacé	0.59	Jaune fluorescent	Jaune		
	4	0.48	Gris noir	0.69	Bleu fluorescent			
	5	0.59	Jaune	0.73	Bleu			
	6	0.90	Noir					
Avril 2005	1	0.03	Violet	0.59 0.69	Jaune fluorescent	Jaune	0.85	Marron clair
	2	0.21	Noir		Bleu fluorescent			
	3	0.31	Bleu violacé					
	4	0.48	Gris noir					
	5	0.59	Jaune					
	6	0.90	Noir					
Juin 2005	1	0.03	Violet	0.53 0.59	Jaune	Jaune	0.85	Marron clair
	2	0.21	Noir		Jaune fluorescent			
	3	0.31	Bleu violacé	0.73	Bleu			
	4	0.48	Gris noir					
	5	0.59	Jaune					
	6	0.90	Noir					
Août 2005	1	0.03	Violet	0.25	Violet		0.85	Marron clair
	2	0.21	Noir	0.59	Jaune fluorescent	Jaune		
	3	0.31	Bleu violacé	0.73	Bleu			
	4	0.48	Gris noir					
	5	0.59	Jaune					
	6	0.90	Noir					

D'après ces résultats, nous remarquons, que les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester récoltée à différentes périodes de l'année, possèdent un ou plusieurs constituants communs.

La détection par vanilline sulfurique nous a permis de révéler un nombre de taches importantes que celle par UV. Pour l'échantillon de Beni Mester, on a observé à l'œil ; une tache de couleur marron clair ayant pour  $R_f$  0,85. Une autre tache est observée par UV, de couleur jaune et ayant pour  $R_f$  0,59.



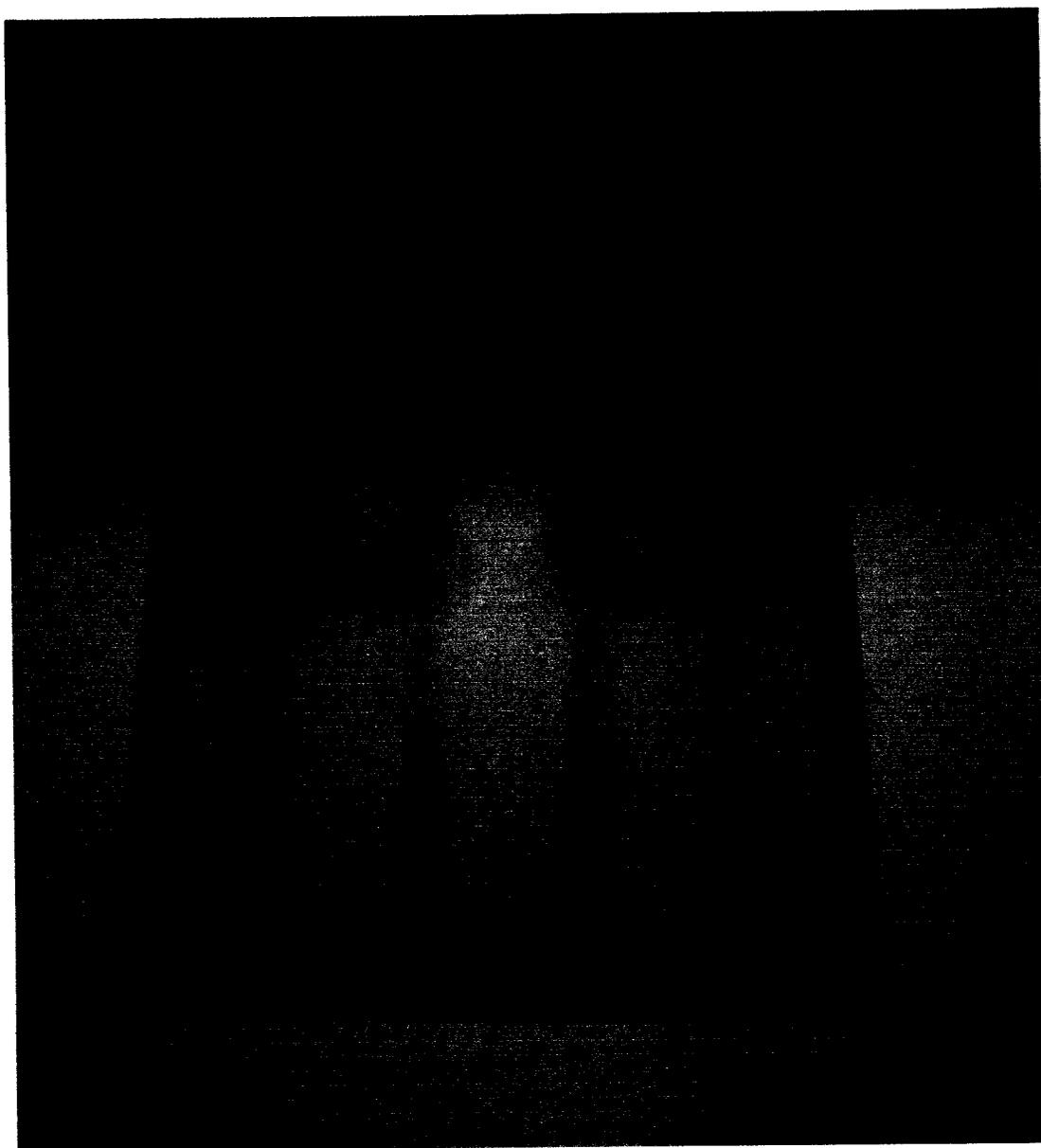
**Figure 42 :** les H.E de *Ruta chalepensis* L. des différentes stations récoltées en avril 2005 : Ghazaouet (6), Beni Mester (3), Terni (7), Ouzidane (8), Sebdou (9) et Laourith (10).

**Tableau 17 :** Les résultats de la CCM des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. des différentes stations récoltées en avril 2005.

Echantillons	N° des taches	Révélation par vanilline sulfurique		Détection par UV (nm)		
		R <sub>f</sub>	couleur	R <sub>f</sub>	couleur UV <sub>254</sub>	couleur UV <sub>366</sub>
<b>Lsourith</b>	1	0.01	Noir	0.25	Violet fluorescent	
	2	0.04	Violet	0.57	Jaune	
	3	0.21	Noir	0.62	Jaune fluorescent	
	4	0.34	Bleu violacé	0.72	Bleu fluorescent	
	5	0.51	Gris noir	0.79	Bleu	
	6	0.90	Noir			
<b>Ghazaouet</b>	1	0.01	Noir	0.25	Violet fluorescent	
	2	0.04	Violet	0.53	Jaune	
	3	0.21	Noir	0.57	Jaune	
	4	0.34	Bleu violacé	0.66	Bleu	
	5	0.54	Gris noir	0.69	Bleu	
	6	0.90	Noir			
<b>Beni Mester</b>	1	0.01	Noir	0.49	Jaune	Jaune fluorescent
	2	0.04	Violet	0.53	Jaune	
	3	0.21	Noir			
	4	0.34	Bleu violacé			
	5	0.53	Gris noir			
	6	0.90	Noir			
<b>Terni</b>	1	0.01	Noir	0.53	Jaune	
	2	0.04	Violet	0.56	Jaune fluorescent	
	3	0.21	Noir	0.73	Bleu	
	4	0.34	Bleu violacé			
	5	0.51	Gris noir			
	6	0.90	Noir			
<b>Ouzidane</b>	1	0.01	Noir	0.23	Violet	
	2	0.04	Violet	0.62	Jaune fluorescent	
	3	0.21	Noir	0.73	Bleu	
	4	0.34	Bleu violacé			
	5	0.51	Gris noir			
	6	0.90	Noir			
<b>Sebdou</b>	1	0.01	Noir	0.67	Jaune	
	2	0.04	Violet			
	3	0.21	Noir			
	4	0.34	Bleu violacé			
	5	0.51	Gris noir			
	6	0.90	Noir			

D'après ces résultats, nous remarquons, que les huiles essentielles du *Ruta chalepensis* L. de différentes stations, révélées par vanilline sulfurique, possèdent un ou plusieurs constituants communs.

La détection par vanilline sulfurique nous a permis de révéler un nombre de taches importantes que celle par UV. On a pu distinguer par UV<sub>366</sub> ; une tache de couleur Jaune fluorescent d'un R<sub>f</sub> allant de 0.53 provenant de Beni Mester, l'autre tache distinguer par UV de couleur jaune d'un R<sub>f</sub> allant de 0.59.



**Figure 43** : les H.E de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester des différentes parties de la plante, récoltée en avril 2005 : Grains (3.G), Feuilles (3.F), Tiges (3.T) et Partie aérienne (3).

**Tableau 18 : Résultats de la CCM des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester des différentes parties de la plante, récoltée en avril 2005.**

Echantillons	N° des taches	Révélation par vanilline sulfurique		Détection par UV (nm)			Visible
		R <sub>f</sub>	Couleur	R <sub>f</sub>	Couleur UV <sub>254</sub>	Couleur UV <sub>366</sub>	Couleur
Les fruits	1	0.01	Noir	0.023	Violet fluorescent		
	2	0.12	Violet	0.18	Violet fluorescent		
	3	0.20	Noir	0.25	Violet fluorescent		
	4	0.28	Bleu violacé	0.53	Jaune	Jaune fluorescent	Jaune
	5	0.47	Bleu foncé	0.56	Jaune fluorescent		
	6	0.53	Jaune	0.69	Violet fluorescent		
Les feuilles	1	0.01	Noir	0.49	Jaune		
	2	0.15	Noir	0.53	Jaune	Jaune fluorescent	Jaune
	3	0.20	Bleu				
	4	0.25	Bleu violacé				
	5	0.28	Bleu clair				
	6	0.43	Jaune				
Les tiges	1	0.01	Noir	0.20	Violet		
	2	0.15	Noir	0.49	Jaune		
	3	0.28	Bleu	0.53	Jaune	Jaune fluorescent	Jaune
	4	0.43	Bleu clair	0.69	Violet fluorescent		
	5	0.53	Jaune				
	6	0.90	Noir				
La partie aérienne	1	0.01	Noir	0.49	Jaune		
	2	0.15	Noir	0.53	Jaune	Jaune fluorescent	Jaune
	3	0.28	Bleu violacé				
	4	0.43	Bleu foncé				
	5	0.53	Jaune				
	6	0.90	Noir				

D'après ces résultats, nous remarquons, que les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester des différentes parties de la plante, récoltée en Avril 2005, possèdent un ou plusieurs constituants communs.

On peut souligner que l'analyse des H.E. de *Ruta chalepensis* L. de nos échantillons par chromatographie sur couche mince (CCM), a montré l'existence de plusieurs constituants et la présence de même constituant majoritaires.

#### VI.2. Résultats de la CPG :

Les résultats de la chromatographie en phase gazeuse (CPG) obtenus pour les huiles essentielles, sont regroupés dans les tableaux 19, 20 et 21 (voir les chromatogrammes 1 à 13 enregistrés sur une DB35).

**Tableau 19 : Résultats de la CPG des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester récoltée à différentes périodes de l'année.**

Nom du composé	N° du pic	Octobre 2004		Février 2005		Avril 2005		Juin 2005		Août 2005	
		T <sub>R</sub> (mn)	% aire								
Limonène	1	9.94	0.49	9.94	0.37	9.94	2.57	9.93	0.27	9.98	0.56
*2-Octanone	2	12.02	1.75	12.01	1.30	12.03	1.35	11.99	1.30	12.02	1.72
2-Nonanone	3	12.43	3.62	12.42	4.53	12.47	22.97	12.41	8.83	12.47	5.37
2-Nonanol	4	12.75	0.26	12.75	0.07	12.75	0.32	12.73	0.10	12.77	0.34
-	5	13.52	1.08	13.51	0.325	13.52	1.751	13.50	0.468	13.55	0.47
2-Décanone	6	15.37	0.68	15.36	0.77	15.37	1.69	15.35	1.35	15.40	1.76
n-Décanol	7	15.97	13.86	15.95	5.13	15.98	11.01	15.95	12.20	15.95	14.66
-	8	17.91	8.50	17.90	16.19	17.94	1.37	17.91	6.36	16.83	0.24
*Linalol	9	18.09	9.18	18.04	8.71	18.10	0.04	18.12	3.61	17.99	4.54
2-Undécanone	10	18.32	27.08	18.29	33.28	18.30	43.88	18.33	46.50	18.43	51.10
2-Undécanol	11	20.27	0.86	20.26	1.19	20.27	0.93	20.25	1.33	20.31	1.18
2-Dodécanone	12	21.47	5.62	21.46	3.34	21.48	4.63	21.46	6.53	21.52	5.77
2-Tridécanone	13	23.83	1.09	23.82	1.34	23.84	0.74	23.81	1.12	23.82	0.95

\* Composés détectés mais non identifiés, seulement supposés à partir de la bibliographie [14, 15, 16, 17].

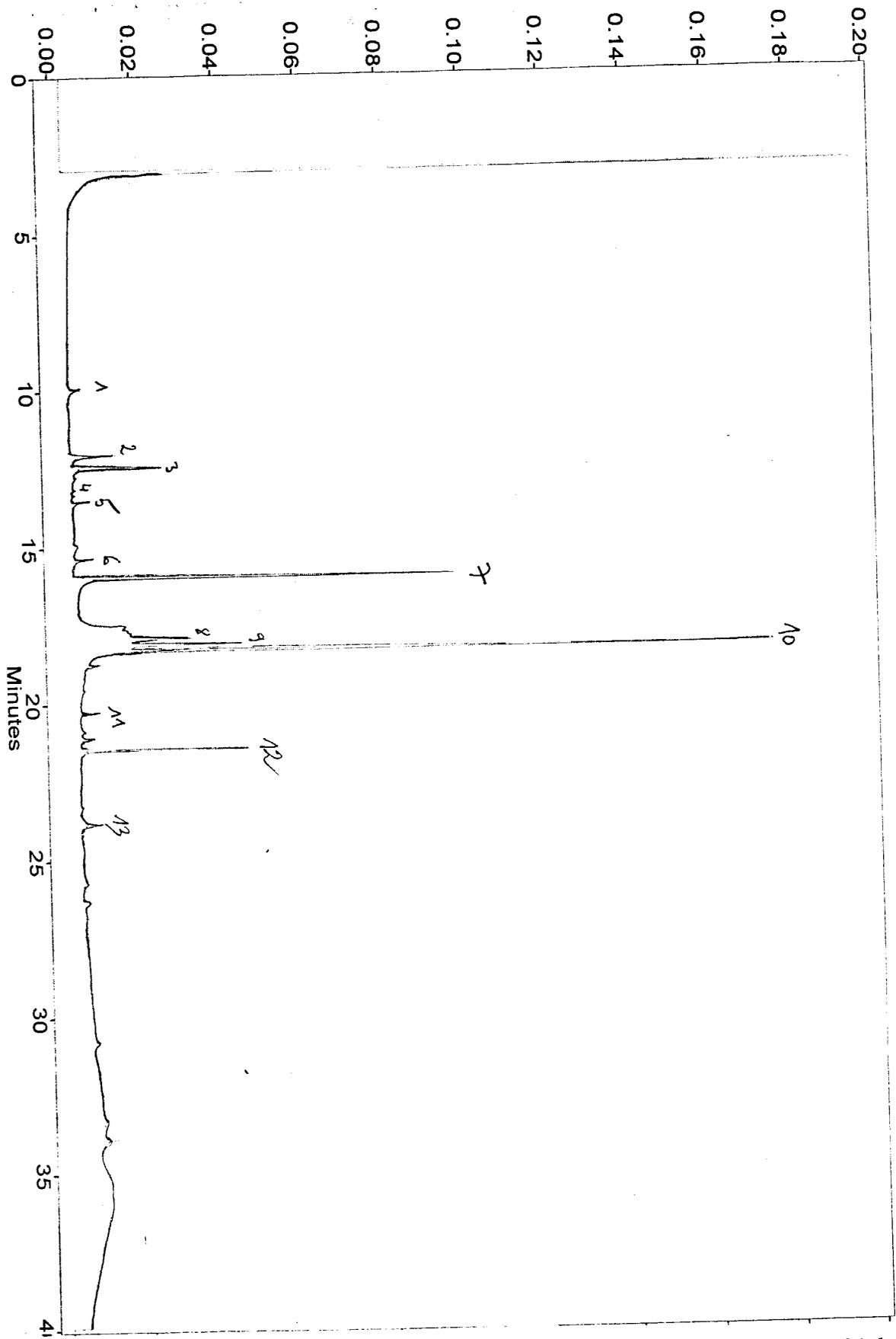
D'après le tableau 19 (voir les chromatogrammes 1 à 5), les résultats de l'analyse des H.E. de *Ruta chalepensis* L. de nos échantillons par CPG ont mis en évidence quatre composés en majorité parmi maintes autres s'y trouvant en minorité. C'est composés sont, respectivement selon les différentes périodes de cueillette cités, le 2-undécanone augmente de façon très appréciable de la première à la cinquième récolte (27.08 % à 51.10 %).

Le 2-nonanone augmente en proportion de la première à la troisième récolte (3.62 % à 22.97 %), pour diminuer en juin (8.83 %) et Août (5.37 %).

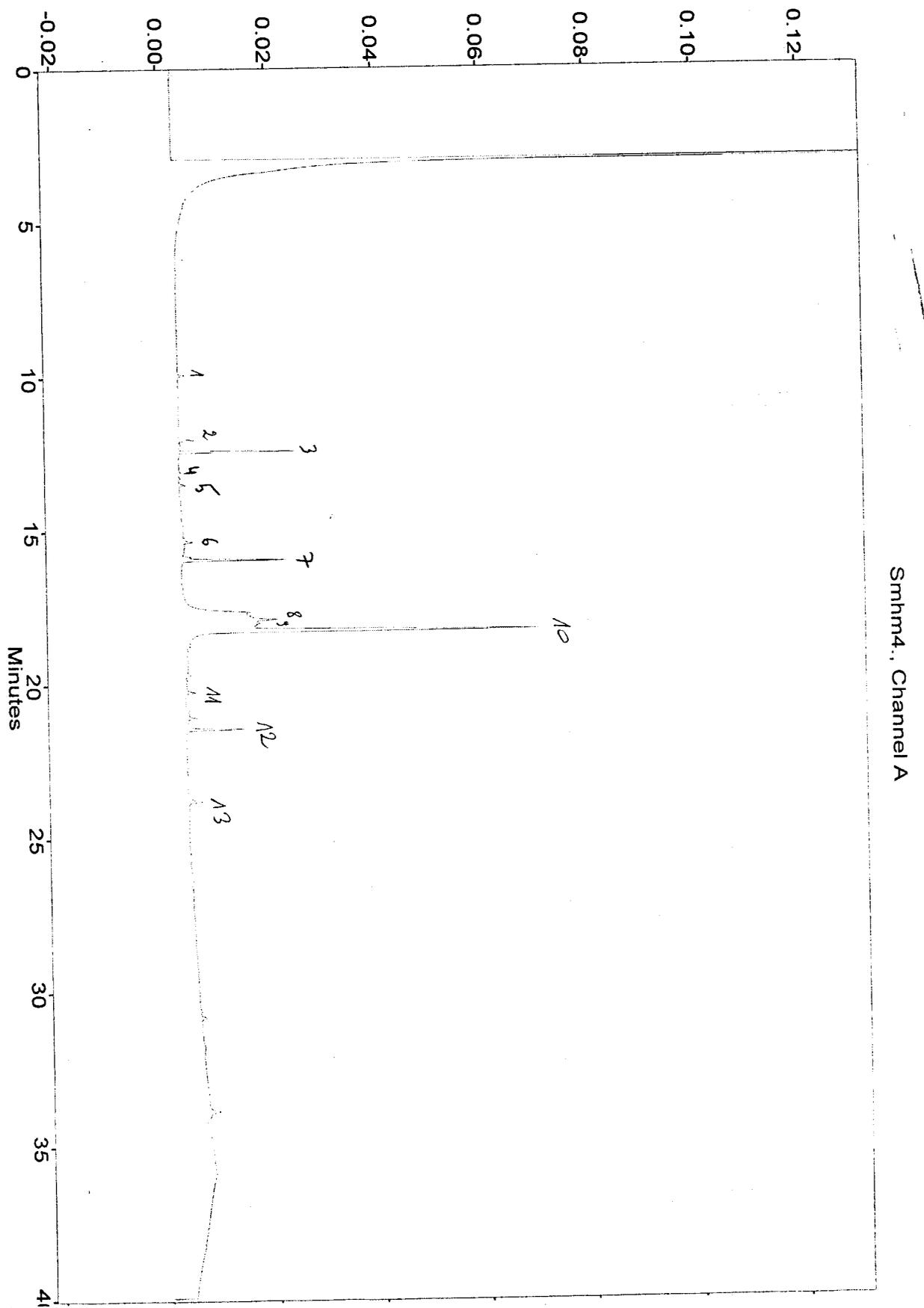
On note également que le n-décanol affiche la plus grande proportion pendant la cinquième récolte (14.66%).

Le Linalol diminue en proportion de la première à la troisième récolte (9.18% à 0.04%), pour augmenter en juin (3.61%) et Août (4.54%).

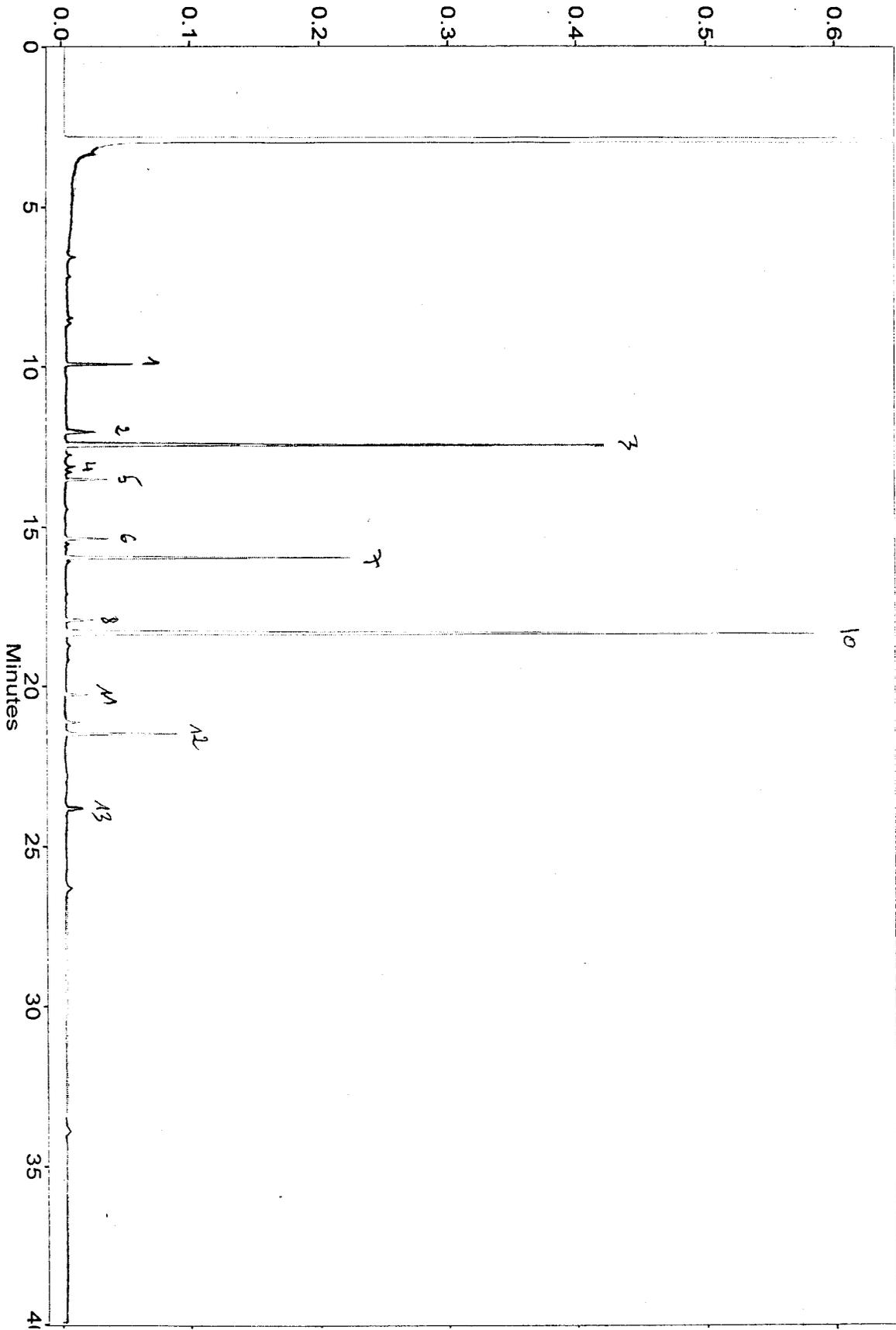
Enfin, il est important de remarquer les fortes teneurs enregistrées pour un constituant non identifié (16.19%) durant la deuxième récolte. Cependant, la différence entre c'est huiles essentielles réside dans le pourcentage des constituants et non pas dans la nature de ces derniers.



Chromatogramme 1 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Octobre 2004 de Beni Mester (BO1).

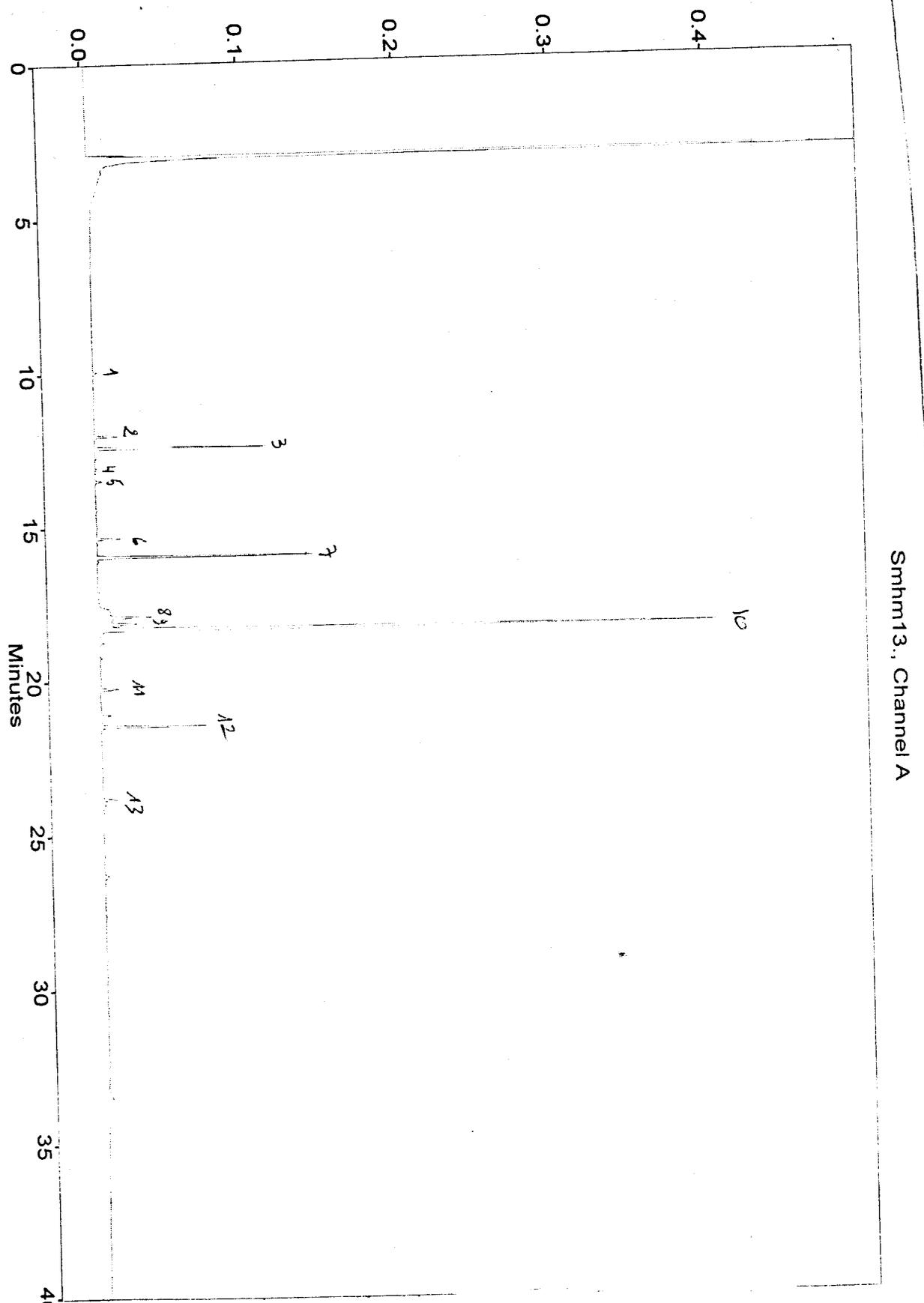


Chromatogramme 2 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Février 2005 de Beni Mester (BF2).

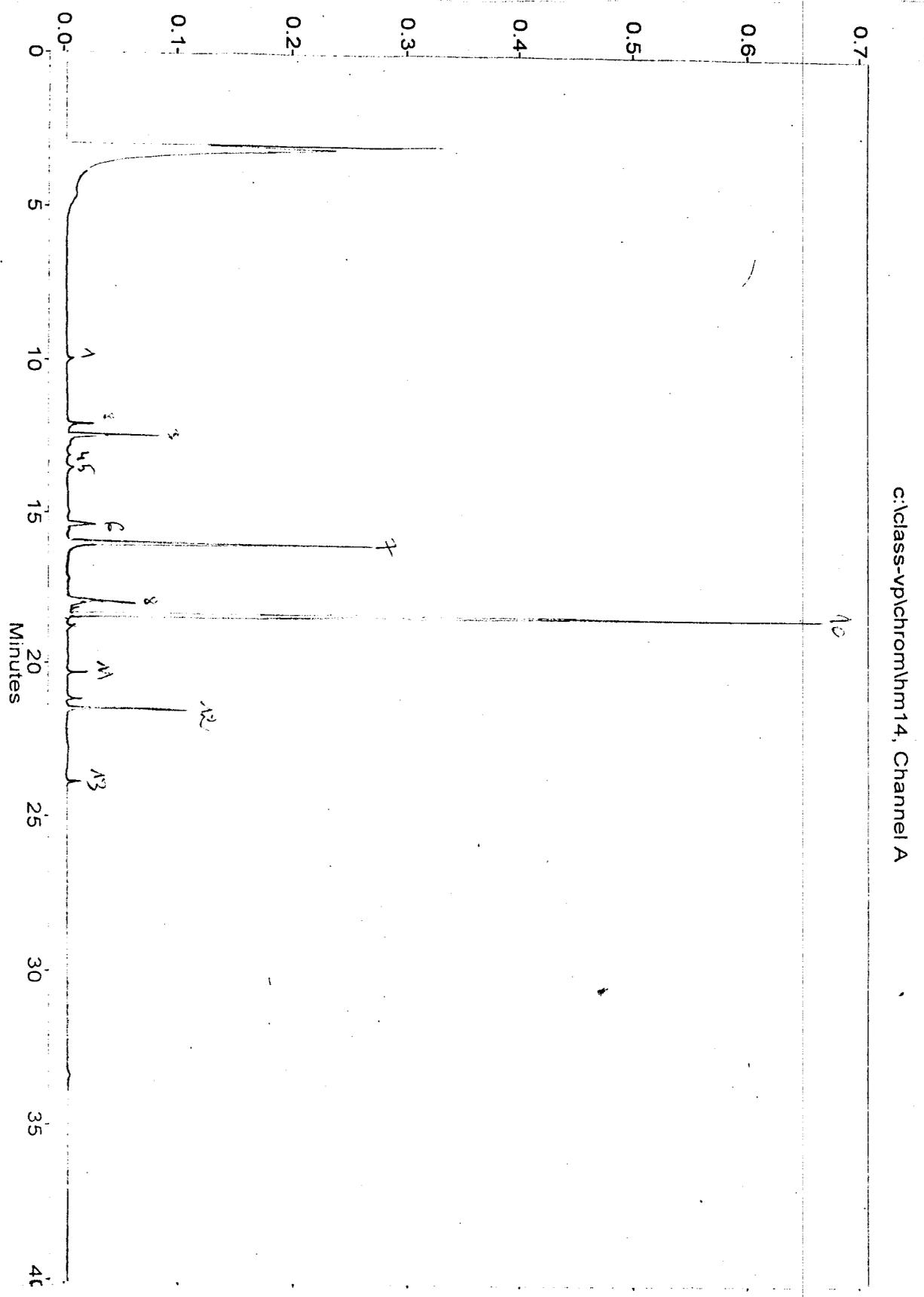


Smhm102., Channel A

Chromatogramme 3 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 de Beni Mester (BA3).



Chromatogramme 4 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Juin 2005 de Beni Mester (BJ4).



Chromatogramme 5 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Août 2005 de Beni Mester (BA5).

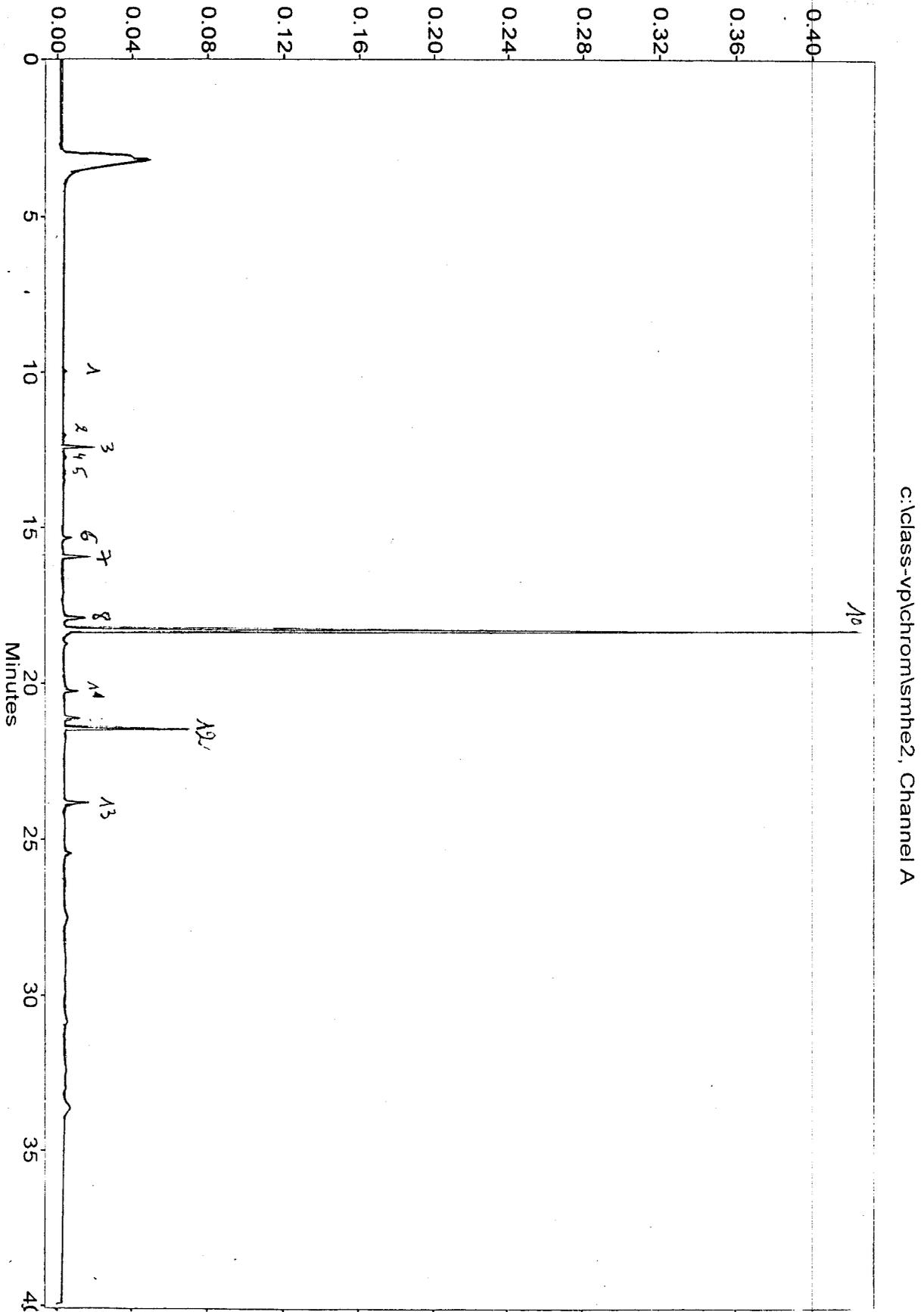
**Tableau 20 : Résultats de la CPG des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester des différentes parties de la plante, récoltée en avril 2005.**

Nom du composé	N° du pic	Grains		Feuilles		Tiges	
		T <sub>R</sub> (mn)	% aire	T <sub>R</sub> (mn)	% aire	T <sub>R</sub> (mn)	% aire
<b>Limonène</b>	<b>1</b>	9.94	0.10	9.94	0.66	9.94	1.01
<b>*2-Octanone</b>	<b>2</b>	12.01	0.02	11.99	1.50	12.02	0.91
<b>2-Nonanone</b>	<b>3</b>	12.41	2.02	12.45	<b>12.55</b>	12.53	<b>18.38</b>
<b>2-Nonanol</b>	<b>4</b>	12.73	0.11	12.73	0.14	12.77	0.13
-	<b>5</b>	13.51	0.12	13.49	0.40	13.53	2.12
<b>2-Décanone</b>	<b>6</b>	15.36	0.64	15.36	2.04	15.38	1.50
<b>n-Décanol</b>	<b>7</b>	15.94	1.96	16.03	<b>26.53</b>	16.01	<b>8.50</b>
-	<b>8</b>	17.91	2.02	17.96	1.60	17.78	0.35
<b>*Linalool</b>	<b>9</b>	18.07	0.06	18.12	0.03	18.02	1.97
<b>2-Undécanone</b>	<b>10</b>	18.34	<b>69.26</b>	18.42	<b>40.92</b>	18.49	<b>38.86</b>
<b>2-Undécanol</b>	<b>11</b>	20.25	0.89	20.25	0.91	20.27	1.35
<b>2-Dodécanone</b>	<b>12</b>	21.47	<b>9.16</b>	21.48	<b>4.72</b>	21.52	<b>3.62</b>
<b>2-Tridécanone</b>	<b>13</b>	23.82	1.95	23.82	0.51	23.84	0.92

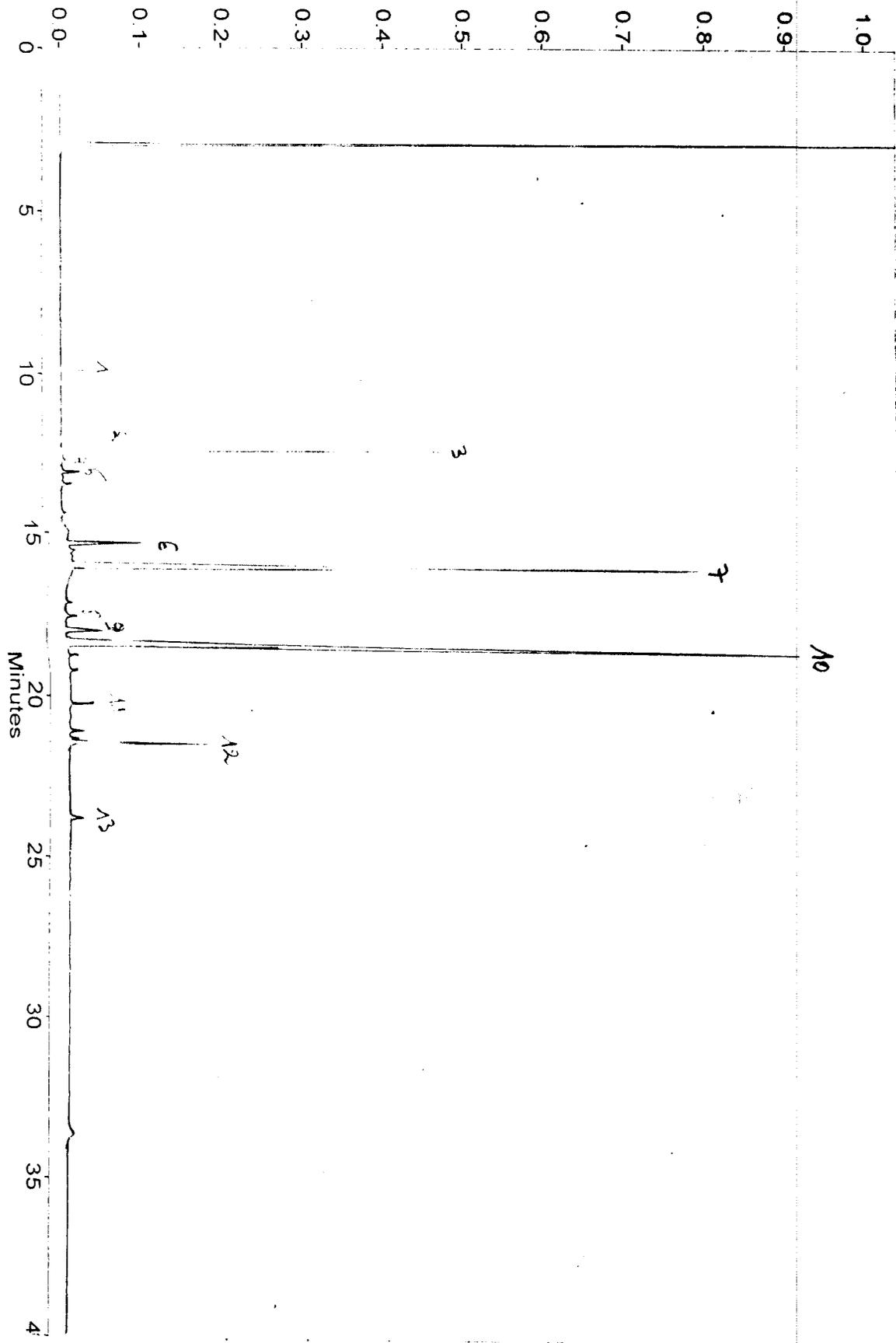
\* Composés détectés mais non identifiés, seulement supposés à partir de la bibliographie [14, 15, 16, 17].

De la même façon que pour la détermination de chemotype, nous avons suivi l'évolution des neuf constituants des huiles essentielles pour les trois différentes parties de la plante : grains, feuilles et tiges. D'après les résultats obtenus (voir les chromatogrammes 6 à 8), il apparaît que les grains sont plus riches en 2-undécanone (69.26%) que les feuilles (40.92%) et que les tiges (38.86%). Nous constatons néanmoins l'existence d'autres constituants majoritaires dans les feuilles et les tiges tels que le 2-nonanone (12.55%, 18.38%) et le n-décanol (26.53%, 8.50%).

Nous remarquons pour les trois différentes parties de la plante, l'existence d'autre composé majoritaires tels que : le 2-dodécanone (grains (9.16%), feuilles (4.72) et tiges (3.62%)). Cependant, la différence entre ces huiles essentielles réside dans le pourcentage des constituants et non pas dans la nature de ces derniers.

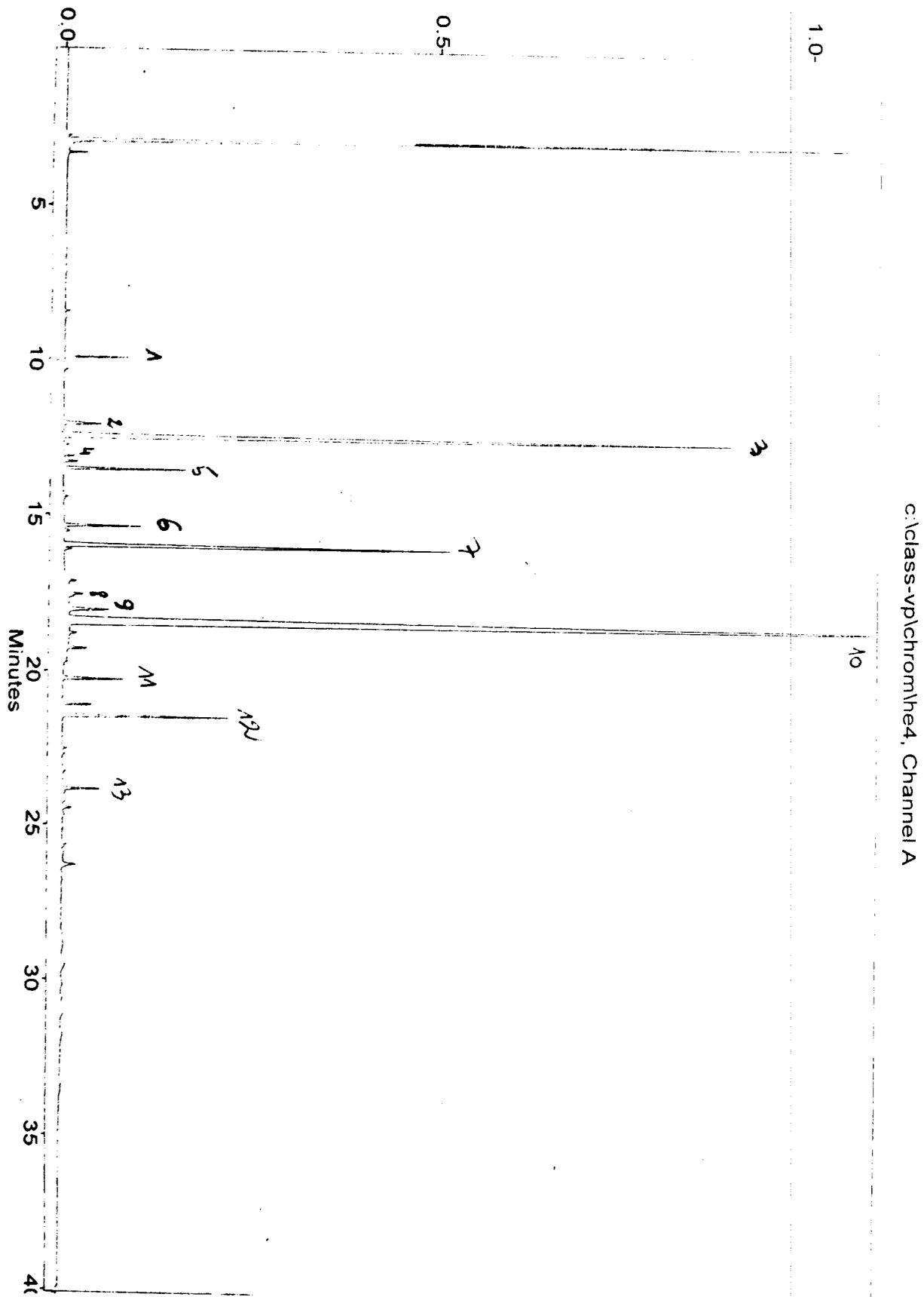


Chromatogramme 6 : huile essentielle des grains de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 de Beni Mester.



c:\class S-vp\chrom\smhe3, Channel A

Chromatogramme 7 : huile essentielle des feuilles de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 de Beni Mester.



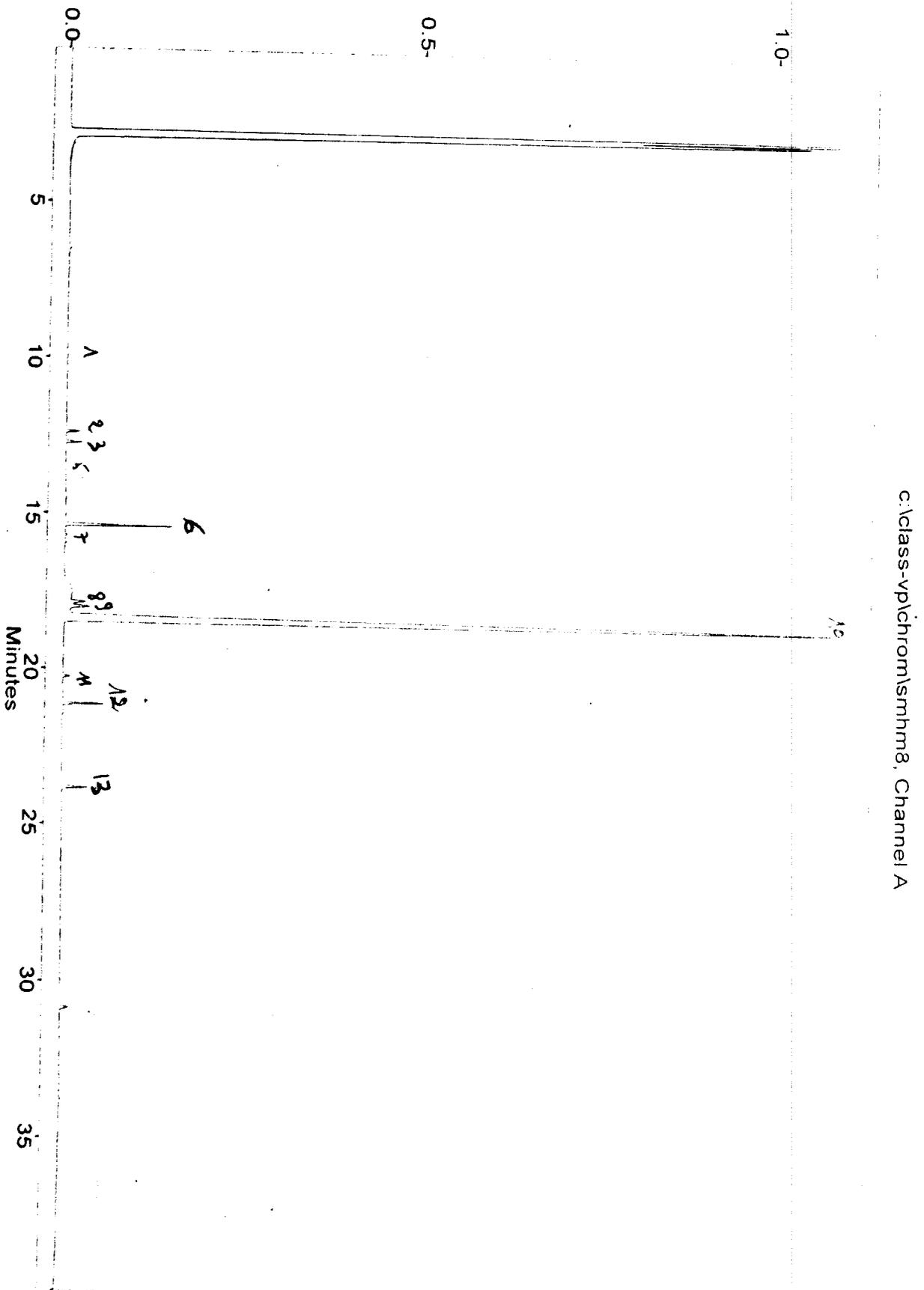
Chromatogramme 8 : huile essentielle des tiges de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 de Beni Mester.

**Tableau 21 : Résultats de la CPG des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. des différentes stations récoltées en avril 2005.**

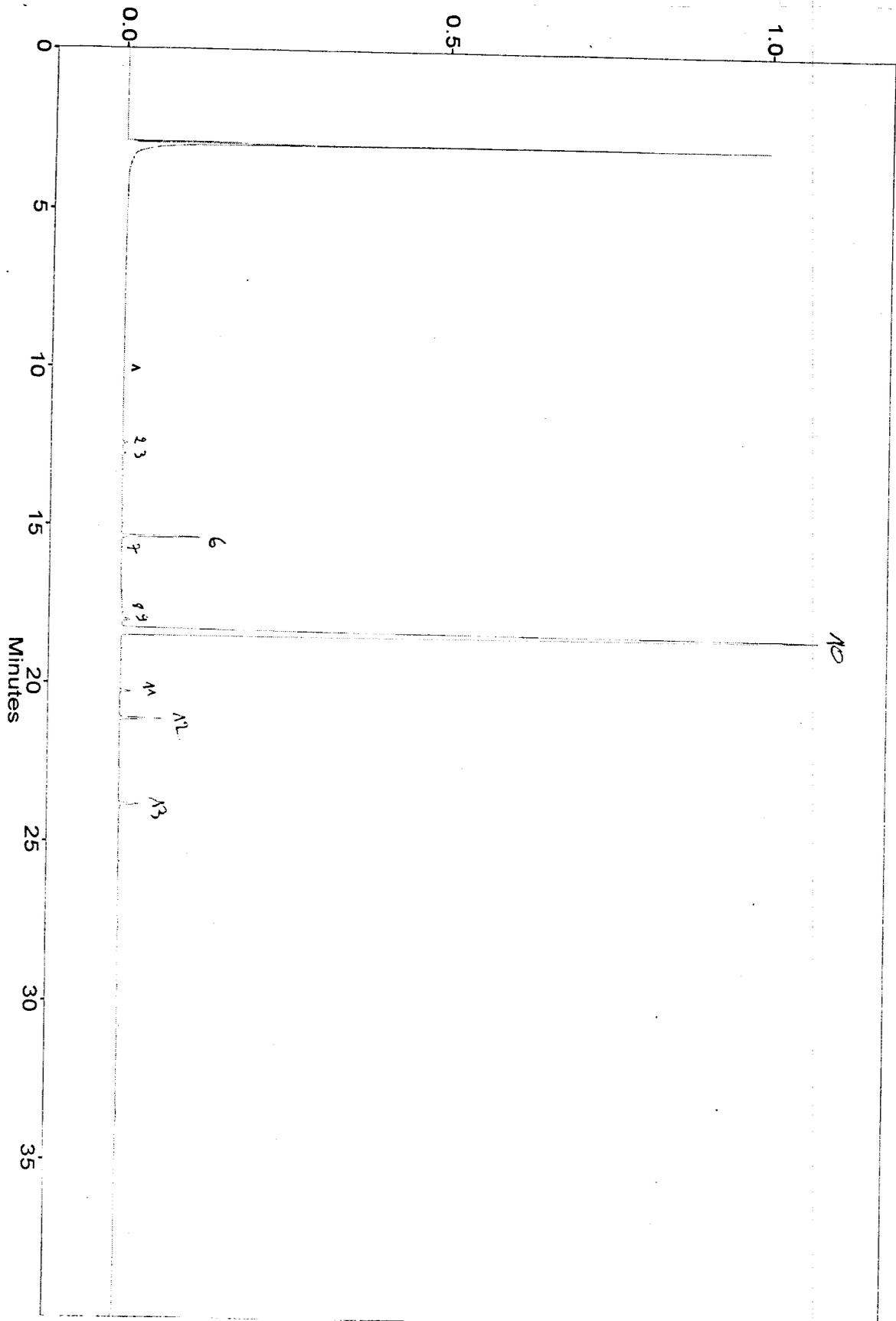
Nom du composé	N° du pic	Laourith		Ghazaouet		Terni		Ouzidane		Sebdou	
		T <sub>R</sub> (mn)	%								
Limonène	1	9.94	2.35	9.90	0.08	9.93	0.10	9.94	0.06	9.94	0.05
*2-Octanone	2	12.03	0.70	11.99	0.04	11.99	0.13	12.02	0.04	12.03	0.03
2-Nonanone	3	12.45	18.08	12.41	0.55	12.44	3.48	12.41	0.26	12.42	0.36
2-Nonanol	4	12.75	0.39	12.74	0.63	12.75	0.31	12.74	0.16	12.75	0.13
-	5	13.51	1.77	13.51	0.10	13.51	0.20	13.51	0.06	13.51	0.06
2-Décانونe	6	15.37	1.40	15.38	4.31	15.39	4.01	15.38	3.68	15.37	2.16
n-Décanol	7	15.97	11.19	15.95	0.12	15.97	4.15	15.94	0.05	15.97	0.04
-	8	17.91	3.60	17.87	1.47	17.90	0.02	17.76	0.31	17.92	3.37
*Linalool	9	18.04	1.41	18.02	2.14	18.06	1.59	18.00	0.93	18.06	7.25
2-Undécانونe	10	18.32	20.81	18.49	81.78	18.50	74.77	18.48	82.98	18.35	55.00
2-Undécanol	11	20.26	0.72	21.13	1.81	20.27	0.64	20.26	0.54	20.26	0.74
2-Dodécانونe	12	21.47	2.83	21.45	1.81	21.42	1.51	21.43	2.11	21.45	1.4
2-Tridécانونe	13	23.83	0.44	23.84	1.31	23.83	0.75	23.83	1.31	23.84	1.73

\* Composés détectés mais non identifiés et seulement supposés à partir de la bibliographie [14, 15, 16, 17].

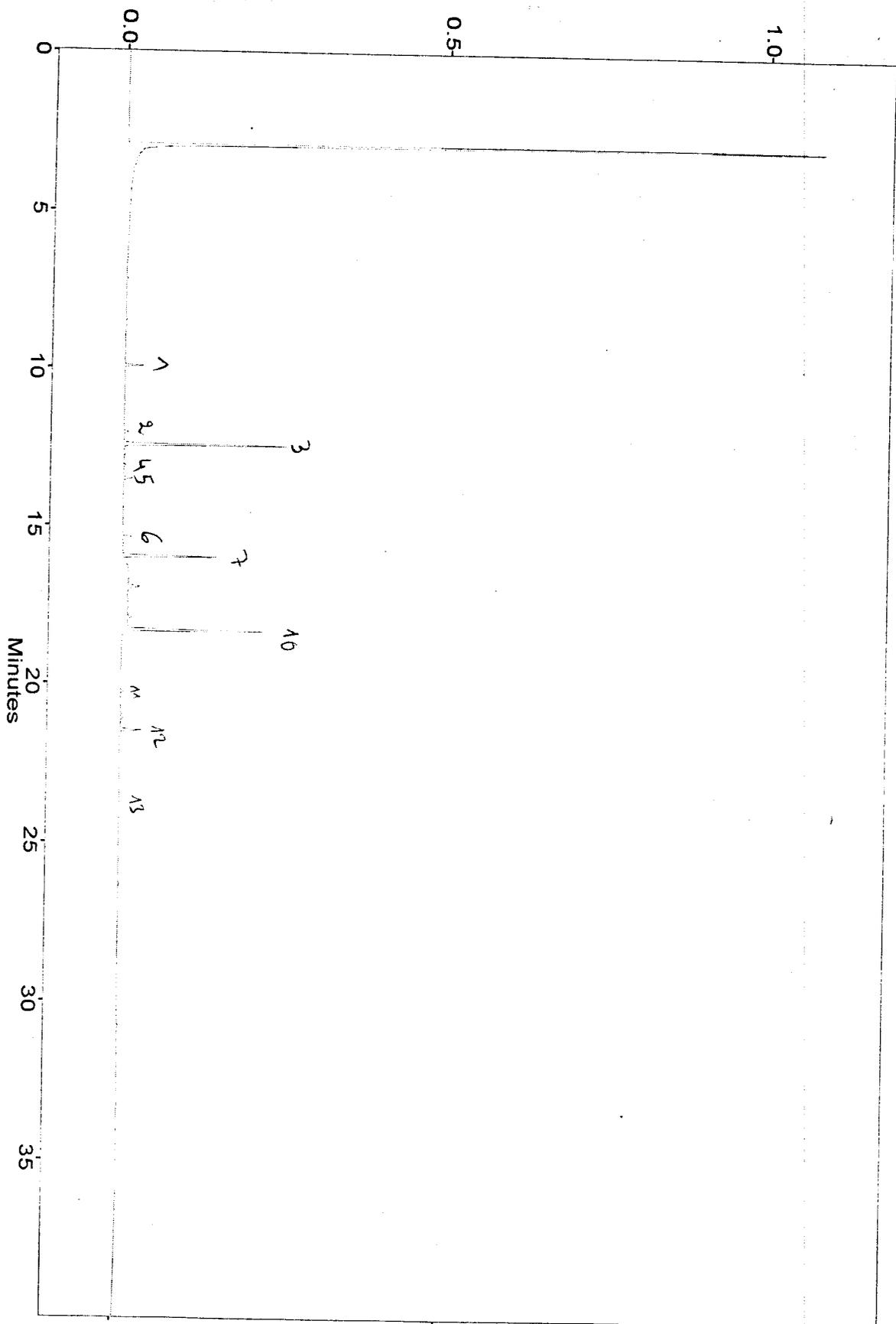
D'après le tableau 21 (voir les chromatogrammes 8 à 13), l'analyse des huiles essentielles de la plante *Ruta chalepensis* L., nous a montré l'extrême variabilité de la composition de l'huile essentielle avec le lieu de récolte. Il est intéressant de remarquer que le 2-undécانونe est un constituant majoritaire pour toutes les huiles essentielles des différentes sites, son pourcentage relatif varie de 20.81% (Laourith) à 82.98% (Ouzidane). Nous remarquons pour quelques régions, l'existence d'autres constituants majoritaires tels que : le 2-nonanone ( Beni Mester (22.97 %) et Laourith (18.08 %)) et le n-décanol ( Beni Mester (11.01 %) et Laourith (11.19 %)). D'autre par, il est important de remarquer les fortes teneurs enregistrées pour Linalool (7.25%) durant la cinquième récolte. Si on se réfère à la notion classique de chemotype, nous pourrions définir notre plante à majorité 2-undécانونe pour toutes les zones, à l'exception de Beni Mester et Laourith, qui peuvent classer de façon classique comme chemotype intermédiaire en 2-undécانونe, 2-nonanone et n-décanol.



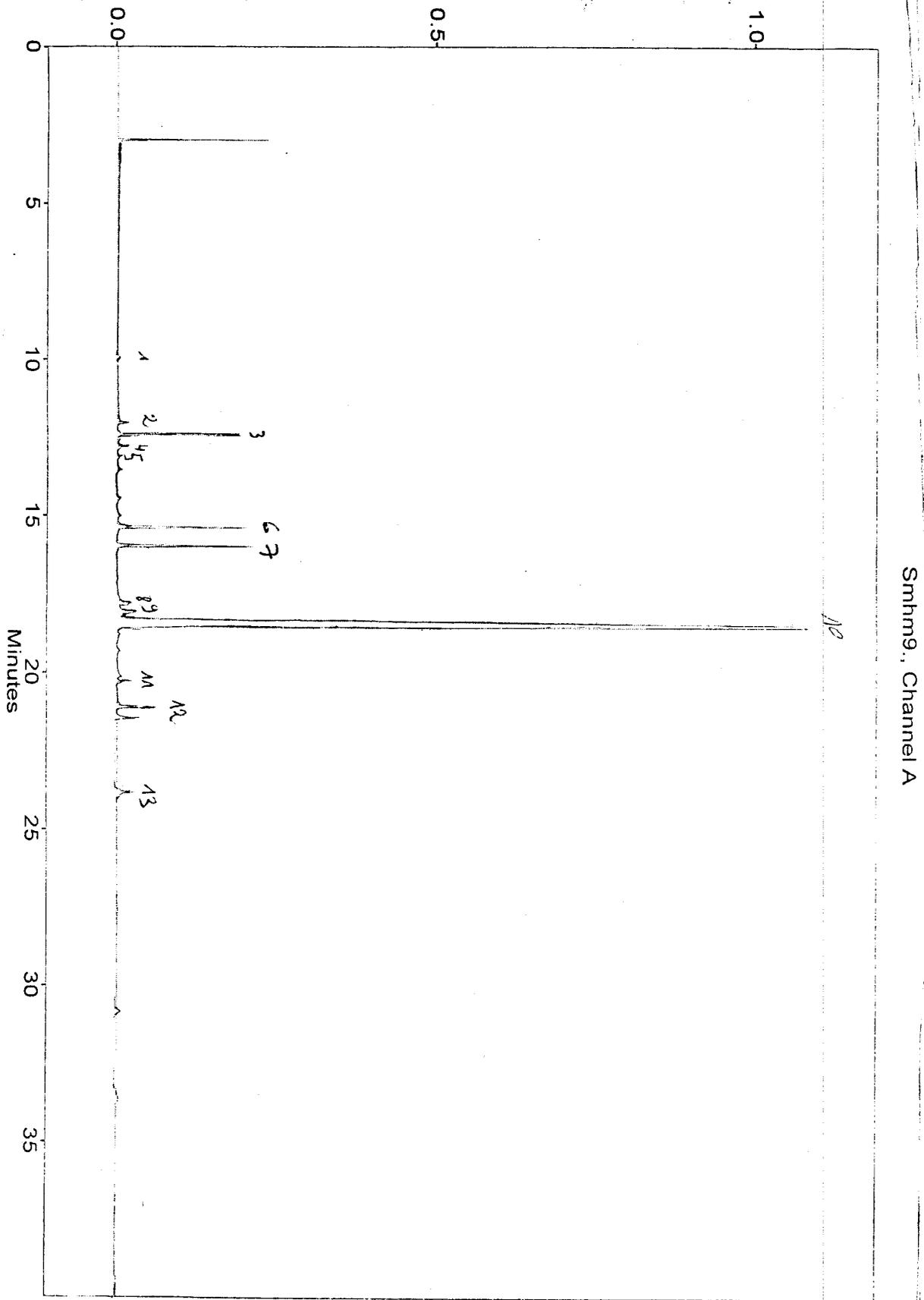
**Chromatogramme 9** : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 de Ghazaouet.



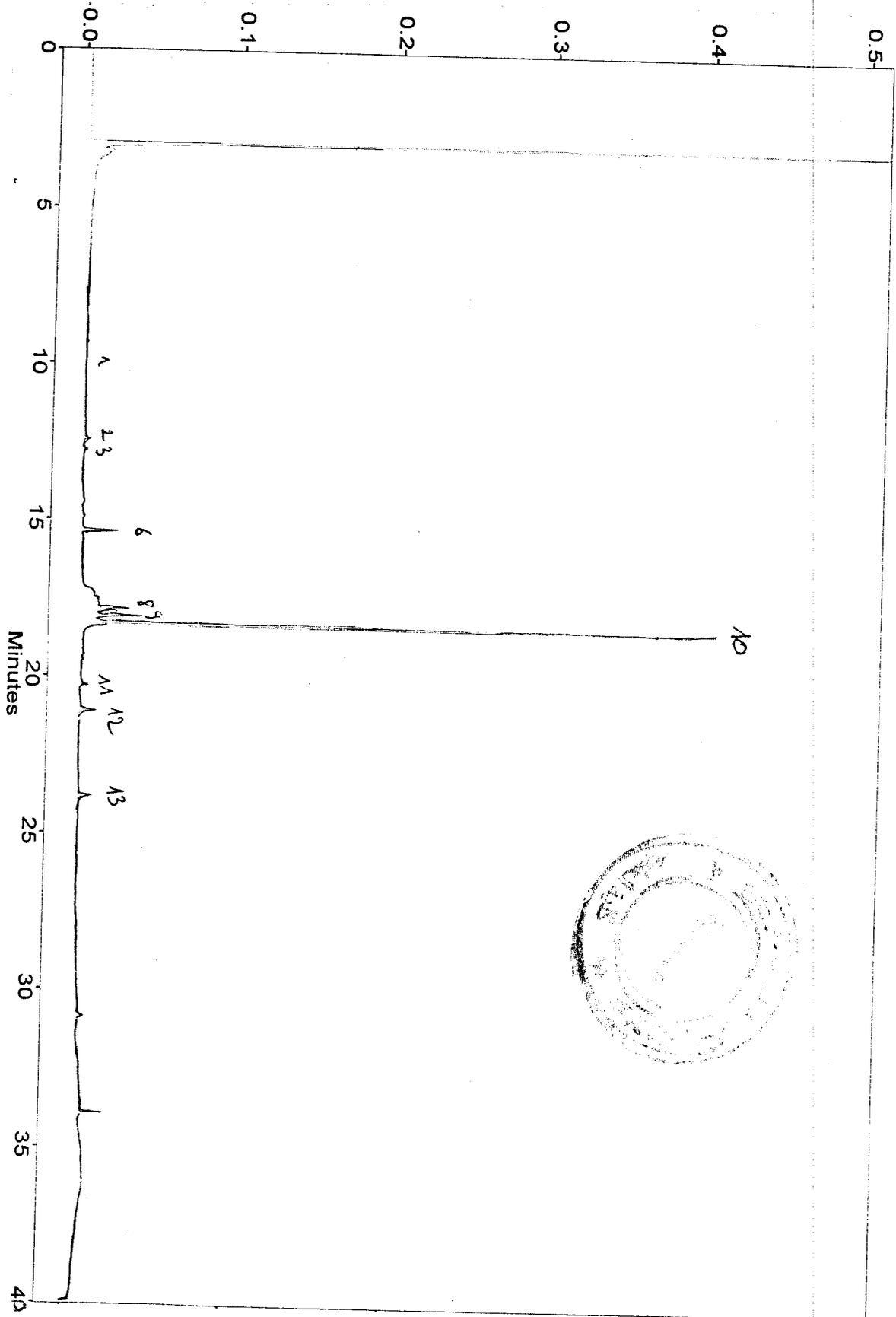
Chromatogramme 10 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 d'Ouzidane.



Chromatogramme 11 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 de Laourith.



Chromatogramme 12 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 de Terni.



Chromatogramme 13 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 de Sebdu.

**VI.3. Résultats de la CPG/SM :**

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. par GPC/MS, a été réalisé uniquement pour l'échantillon de Beni Mester récoltée en Octobre, il est bien conservé pendant un mois à l'abri d'air ambiant et de lumière ainsi sont regroupés dans le tableau 22.

**Tableau 22 : Résultats des analyses par GPC/MS de l'H.E. de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester récoltée en Octobre 2004.**

N° Pic	Composés	Formule brute	M g/mol	TR (mn)	% aire	Principaux fragment
1	Limonène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	3.734	1.39	39 ; 67 ; 93 ; 121 ; 136
2	2-Nonanone	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142	4.385	10.14	43 ; 58 ; 71 ; 85 ; 99 ; 113 ; 127 ; 143
3	2-Nonanol	C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> O	186	4.535	3.59	45 ; 69 ; 83 ; 97 ; 111 ; 128 ; 143
4	2-Décanone	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	156	5.707	1.27	43 ; 58 ; 71 ; 85 ; 113 ; 127 ; 141 ; 156
5	2-Undécanone	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O	170	6.200	37.01	58 ; 71 ; 85 ; 110 ; 127 ; 155 ; 171
6	2-Méthyl-1-décanol	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O	172	7.077	22.31	43 ; 71 ; 85 ; 111 ; 125 ; 142
7	2-Undécanol	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O	172	7.175	4.44	45 ; 69 ; 83 ; 97 ; 111 ; 124 ; 157
8	Dodécan-2-ène	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	162	7.221	1.83	51 ; 79 ; 105 ; 119 ; 133 ; 147
9	3-Octadécène	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub>	252	7.525	1.01	43 ; 69 ; 83 ; 97 ; 111 ; 139
10	2-Dodécanone	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O	184	7.982	1.52	43 ; 58 ; 71 ; 96 ; 137 ; 151 ;
11	2-Dodécanol	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O	186	8.365	0.76	43 ; 58 ; 71 ; 85 ; 113 ; 127 ;
12	2-Nonadécène	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub>	266	8.794	8.87	43 ; 69 ; 83 ; 97 ; 111 ; 125 ;
13	2-Tridécanone	C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> O	198	9.637	1.27	43 ; 69 ; 83 ; 97 ; 111 ; 139 ;
14	2-Méthyl-1-dodécanol	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O	200	12.518	0.96	43 ; 77 ; 103 ; 131 ; 161 ;
15	2-Tridécanol	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O	200	13.326	3.17	51 ; 77 ; 105 ; 135 ; 161 ;
16	2-Méthyl-1-Tridécanol	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O	214	16.832	0.51	51 ; 77 ; 102 ; 115 ; 128 ; 155

Les résultats des analyses par GPC/MS de l'H.E. de *Ruta chalepensis* L., nous a révèlent l'existence de 16 composés chimiques et dont les pics représentatifs sont illustrés dans le chromatogramme 14. Par ailleurs, en se basant sur les fragmentations de divers composés chimiques données par la librairie (base de données) propre à l'appareil, l'analyse qualitative et quantitative par GPC/MS a permis de mettre en évidence 16 composés chimiques dont neuf ayant déjà été identifiés lors de l'analyse par GPC de l'H.E. de la Rue de Beni Mester récolté en Octobre. Ainsi, nous remarquons que le 2-undécane, n-décane et 2-nonane restent toujours les constituants majoritaires de cette huile.

Enfin, en comparant nos constituants identifiés avec ceux de la littérature (voir tableau 23), nous remarquons que les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de provenance l'Argentine, l'Iran, la Turquie et l'Italie possèdent le 2-undécane et le 2-nonane comme constituants majoritaires [17, 15, 16, 18]. Alors que dans l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* de la Grèce [14], le 2-méthyl-octylacétate (44.0%) et le  $\beta$ -phényl-andrine (10.7%) sont les constituants majoritaires.

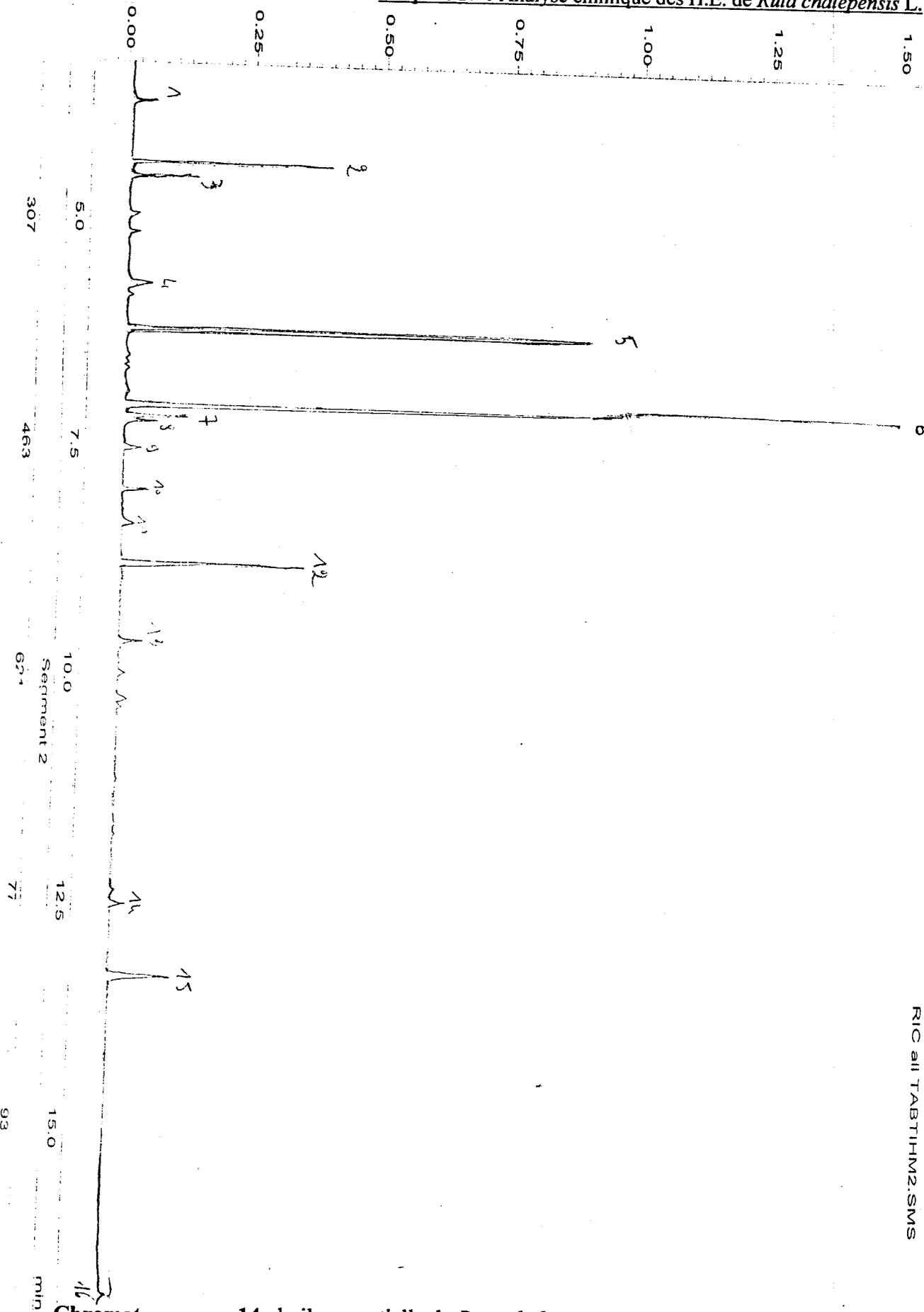
**Tableau 23 : les constituants identifiés par différentes pays.**

<b>Constituants identifiés</b>	<b>Argentine (%) [17]</b>	<b>Iran (%) [15]</b>	<b>Turquie (%) [16]</b>	<b>Grec (%) [14]</b>	<b>Italie (%) [18]</b>
<b>Limonène</b>	0.2	-	0.22	t	6.8
<b>2-octanone</b>	0.6	0.1	-	-	0.59
<b>2-nonanone</b>	17.2	24.1	16.24	1.4	49.91
<b>2-nonanol</b>	-	-	0.48	7.2	-
<b>2-décanone</b>	2.7	1.6	1.56	-	2.94
<b>2-décanol</b>	1.1	1.3	-	-	0.6
<b>2-undécanone</b>	38.1	52.5	66.49	t	30.02
<b>nonyl acétate</b>	-	9.1	-	3.1	-
<b>2-dodécanone</b>	0.9	0.5	0.76	-	-
<b>2-undécanyl acétate</b>	2.8	2.6	-	-	-
<b>2-tridécanone</b>	1.3	0.7	2.31	-	0.51
<b>2-heptanyl acétate</b>	0.1	-	-	-	-
<b>2-octanyl acétate</b>	1.1	-	-	-	-
<b>2-nonanyl acétate</b>	20.9	-	-	-	-
<b>2-décanyl acétate</b>	5.6	-	-	-	-
<b>2-dodécanyl acétate</b>	0.5	-	-	-	-
<b>2-nonyl acétate</b>	-	-	2.43	-	-
<b>2-undecanol</b>	-	-	0.94	t	0.05
<b>α-pinène</b>	-	-	0.04	2.5	0.03
<b>β-pinène</b>	-	-	0.04	6.4	0.20
<b>mycrene</b>	-	-	-	1.4	-
<b>β-phényllandrine</b>	-	-	-	10.7	-
<b>2-méthylactyl acétate</b>	-	-	-	44.0	-
<b>décanol</b>	-	-	-	0.4	-
<b>γ-terpinene</b>	-	-	0.02	0.8	-
<b>2-méthylnonyl acétate</b>	-	-	-	1.2	-
<b>2-méthyldecyl acétate</b>	-	-	-	4.2	-

# Chromatogram Plot

File: c:\saturnws\data\tabtihm2.ms  
Sample: TABTIHM2  
Scan Range: 1 - 3209 Time Range: 0.00 - 50.10 min.  
MCounts

Operator: PG  
Date: 03/12/2004 11:04  
RIC all TABTIHM2.SMS



Chromatogramme 14 : huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Octobre 2004 de Beni Mester (BO1).

## **VI. Conclusion :**

Cette étude a pour but de contribuer à la connaissance des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L., espèce spontanée très abondante en Algérie en général et à l'ouest du pays en particulier et dont les principes volatils posent de sérieux problèmes de normalisation pour leur commercialisation à cause de l'hétérogénéité de leur composition.

Notre étude confirme l'extraordinaire polymorphisme chimique pour la plante. En effet, la recherche de chemotype spécifique à la région ouest algérien, s'est avérée peu concluante et confirme l'extrême variabilité de la composition chimique de l'huile essentielle *Ruta chalepensis* L. en fonction de la situation géographique, climatique, altitude et aussi la période de cueillette. Nous avons, néanmoins montré par CPG et CPG/SM, que l'huile essentielle est riche en cétones et que les constituants majoritaires pour l'ensemble de nos échantillons sont le 2-undécanone, le 2-nonanone.

L'analyse par CPG des constituant volatils des différentes parties de la plante montre que les grains possèdent un seul constituant majoritaire : le 2-undécanone (69.26%) et que les feuilles et les tiges sont riches en 2-undécanone, 2-nonanone et n-décanol. Cependant, la différence entre ces huiles essentielles réside dans le pourcentage des constituants et non pas dans la nature de ces derniers.

Les études comparatives sur les huiles essentielles fraîchement extraites ont montré que : le rendement, les paramètre de contrôle ; les propriétés organoliptiques et les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimique varient en fonction d'un grand nombre de paramètres d'origine différente :

- ✓ Partie de la plante distillée ;
- ✓ Les conditions climatiques et les conditions de culture ;
- ✓ Le cycle végétatif ;
- ✓ Le temps de stockage.

L'analyse montre une complexité dans la composition chimique (plusieurs centaines de constituants pour une seule huile essentielle), ce qui entraîne des propriétés thérapeutiques importantes et variées, nécessitant certaines précautions d'emploi. Les huiles essentielles sont "des mélanges complexes de substances diverses ayant chacune leurs propriétés particulières".

### **Références bibliographiques**

- [1] Robert MARCHAL et Edith ANTONOT. Chromatographie. Lycée Louis Vincent - METZ . "Analyse d'un parfum par chromatographie d'adsorption" BUP. N° 684, p865-869. (1998).
- [2] Carree P., précis de technologie et de chimie industrielle. Ed. Bailliere J.B. et Fils, T3. (1953).
- [3] Randerath K., Chromatographie sur Couche Mince. Ed Gauthier villards Paris. (1971).
- [4] Sticker V. and Fluck H., Die zusammensetzung von genuinen, extrahierten und destillierten atherischen olen einiger Mentha eaten. Pharm. Acta. Helvetiae. N° 43, p411-446, (1968).
- [5] Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchaut, J., Vergnol, A. et Wittier, P., Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse, Ed. Masson, Paris. (1995).
- [6] Casoli, A., Mirti, P. and Palla, G., « Characterization of medieval proteinaceous painting media using gaz chromatography and gaz chromatography-mass spectrometry-Fresenius », J. Anal. Chim. 352 (3-4), 372-379p. ( 1995).
- [7] Lamarti A., Badoc A. et Carde J.P., Étude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de Fenouil amer (*Foeniculum vulgare*Mill.); caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) des constituants. Bull. Soc. Pharm. 133, 73-89p. Paris, (1994).
- [8] Silverstein Bassler Marrill, Spectrometric Identification of organic compounds, 4<sup>th</sup> Ed., John Willey & Sons, NewYork. (1981).
- [9] E. De Hoffmann, Charrette J. et Stroobant V., Spectrométrie de masse, 2<sup>ème</sup> Ed., Dunod, Paris, p.363. (1999).
- [10] F. W. McLafferty, Interpretation of mass spectra, 3rd Ed., University Science Books, Mill Valey, USA CA., (1980).
- [11] Longevialle P., Principe de la Spectrométrie de masse des substances organiques, Ed. Masson, Paris, (1981).
- [12] Wolff J- P., Manual d'analyse des corps gras. Azoulay. Editeur, Paris, (1968).
- [13] R. P. Adams, Identification of essential oil components by Gas chromatography Mass spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, USA (1995).
- [14] O. Tzakou and M. Couladis, Essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Greece. J. Essent. Oil Res., 13, 258 - 259 (2001).

- [15] **Abdolhossein Rustaiyan, Morteza Khossravi and Faramarz Sultani-Lotfabadi**, Constituents of the Essential oil of *Ruta chalepensis* From Iran. J. Essent, Oil Res. 14, 378-379 (septembre, october 2002).
- [16] **K. H. C. Baser, T. Özek and S. H. Beis**. Constituents of the Essential oil of *Ruta Chalepensis* L. From Turkey. J. Essent, Oil Res., 8, 413-414, (July/August 1996).
- [17] **G. Fester, E. Martinuzzi, Retamar y Rigcardi**. Estudios Sobre Esencias Volatiles Argentinas. Esencias de Rutaceas. Instituto de Quimica orgánica. Facultad de Bioquimica. Vol. 1, 2<sup>nd</sup>. Ed. p.554. Argentina. (1972).
- [18] **A.Verzera, L.Mondello and S. Ragusa**. L'olio essenziale delle Foglie di piante tipiche della Flora mediterranea. Essenze Derivati agrumari, 70, 207-210. (2000).

# **Chapitre V :**

## **Activité biologique de *Ruta chalepensis* L.**

## **I. Activité biologique de *Ruta chalepensis* L. :**

### **I.1 Introduction :**

Les huiles essentielles ont des propriétés multiples. Elles peuvent calmer ou stimuler et sont généralement fortement antiseptiques, assainissantes, désinfectantes et désodorisantes. Les huiles sont donc un réservoir potentiel de soins naturels et une chance pour la médecine. L'utilisation des huiles essentielles fait partie d'un certain art de vivre et participe à l'entretien des fonctions vitales de l'organisme [1, 2].

Une meilleure connaissance, des plantes actives sur les maladies humaines, peut donc aboutir à la sélection, parmi les nombreuses espèces dites médicinales et employées par les populations, d'un groupe de plantes effectivement actives et non toxiques qui peuvent être utilisées par les populations. Par ailleurs, apporter des preuves scientifiques à l'activité de certaines plantes, à l'égard de certaines maladies de l'homme, seraient très utile dans l'accroissement de la valeur économique de ces ressources naturelles et le développement d'une stratégie de conservation de ces plantes. Les objectifs fixés dans l'étude de la composition chimique et de l'activité biologique de certaines plantes médicinales sont [3, 4]:

- Mettre à la disposition des populations rurales de la région des informations sur la valeur et l'utilité des plantes médicinales de traiter certaines maladies fréquentes, telles que les maladies infectieuses. Un matériel éducatif sur le mode d'utilisation de ces plantes sera mis à leur disposition.
- Promouvoir la valeur économique des espèces d'intérêt médicinal et aromatique par la culture et la commercialisation à l'échelle locale, régionale et internationale.
- Promouvoir la conservation de la biodiversité par une exploitation rationnelle des PMA.

Pour pouvoir garantir la qualité pharmaceutique d'une essence végétale, elle doit répondre notamment au contrôle d'activité. Pour vérifier ce critère d'activité on fait recours au dosage des principes actifs quand ils sont connus. Pour les plantes dont la composition chimique n'est pas connue, ce qui est le cas pour plusieurs espèce médicinales de la région, et pour avoir une idée sur l'activité de la plante, on doit chercher à identifier certains principes actifs. Ces considérations nous ont amené à envisager des possibilités d'utilisation d'huiles essentielles pour traiter, à prix modique, des infections diverses faisant intervenir des agents fongiques et bactériens [5].

Les H.E. agissent sous différentes formes, suivant l'affection à traiter ou les soins à donner. Lorsque vous mélangez des huiles essentielles, vous allez les faire entrer en synergie. L'expérience a démontré que le pouvoir thérapeutique de plusieurs huiles est supérieur à une

seule. Le fait d'associer 2 ou 3 huiles de propriétés voisines va créer un mélange synergique plus puissant mais également différent [2]. Dans ce chapitre, nous avons tenté de profiter de ce savoir-faire pour évaluer l'activité antimicrobienne des différents extraits et huiles essentielles issus de *Ruta chalepensis* L.

## **II. Définitions :**

### **II.1. Activité Antimicrobienne**

Les substances antimicrobiennes préviennent ou combattent l'infection microbienne. Les antimicrobiennes sont des substances capables de tuer les micro-organismes ou d'en bloquer la croissance [6, 2].

### **II.2. Activité Antibactérienne**

Les substances dotées d'une activité antibactérienne préviennent ou combattent les bactéries et l'infection qui en résulte. De nombreuses huiles essentielles ont une action antibactérienne, toutefois les plus puissantes sont celles qui contiennent des phénols [6, 2].

### **II.3. Activité Antifongique**

Les substances antifongiques détruisent les champignons. En pharmacologie, elles permettent de lutter contre les infections par les champignons. Les huiles essentielles ont un grand pouvoir antifongique aérien et cutané [6, 2].

## **III. Méthodes de détermination de l'activité antimicrobienne :**

Deux techniques sont actuellement utilisées pour reconnaître l'activité antibiotique d'une substance chimique. En premier lieu, la technique de dilution en milieu liquide permet de rechercher, par les dilutions successives du produit à expérimenter, la concentration minimale inhibitrice (C.M.I.) qui suffit à inhiber la croissance de diverses espèces microbiennes, dans des conditions expérimentales bien précises, normalisées sous l'autorité d'institutions internationales comme l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Selon les critères habituels, les C.M.I. sont exprimées en microgrammes d'antibiotique par millilitre. Un germe est considéré comme sensible lorsque la C.M.I. est de l'ordre de 0.01 à 1 mg/ml.

Un milieu liquide renseigne sur le caractère bactériostatique ou bactéricide d'un antibiotique. En effet, inhibée par la C.M.I. d'antibiotiques puis maintenue à l'étuve, une culture reste stérile dans le cas d'un effet bactéricide. Mais, en présence d'une concentration

bactériostatique, la culture repart au bout d'un certain temps, par suite des mécanismes de défense mis en œuvre par les germes temporairement inhibés.

L'autre technique de titrage de l'activité antibiotique in vitro, est la méthode de diffusion en gélose ou méthode de disques. A la surface d'un milieu gélosé contenu dans des boîtes pétri et ensemencé par le germe à étudier, des rondelles (disques), de papier filtre, stérile imprégnées des antibiotiques à tester, à des concentrations différentes d'un disque à l'autre, sont appliquées. Les antibiotiques diffusent dans la gélose à partir des disques de telle sorte qu'autour de chacun d'eux s'établit un gradient de concentration décroissant avec la distance par rapport au disque. Après 24 heures d'étuve, les disques apparaissent entourés d'une zone d'inhibition dont le diamètre permet de calculer la C.M.I. [7,8].

### **III. Conditions opératoires :**

Plusieurs travaux réalisés au laboratoire de microbiologie du Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Tlemcen, étudient la résistance des antibiotiques et des antifongiques de synthèse vis-à-vis des différents microorganismes hospitalières.

Dans ce chapitre, nous avons tenté de profiter de ce savoir-faire pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles, de tiges, de racines et de fruits de *Ruta chalepensis* L., (voir chapitre III) et de deux huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de Beni Mester (BA3) et d'Ouzidane (OA8). Cependant, cette activité est ensuite comparée avec celle de l'antibiotique et des antifongiques couramment employés. Il s'agit de la Gentamicine (Bactéries), l'Amphotéricine B (Levures) et l'Econazole (Moisissures).

Les résultats obtenus sont comparés à ceux des antibiotiques et des antifongiques testés sur les mêmes souches.

**N.B.** : Le mode opératoire concernant les méthodes des tests biologiques, sont décrits dans la partie expérimentale. Tous les essais, aussi bien fongiques que bactériens, ont été répétés trois fois.

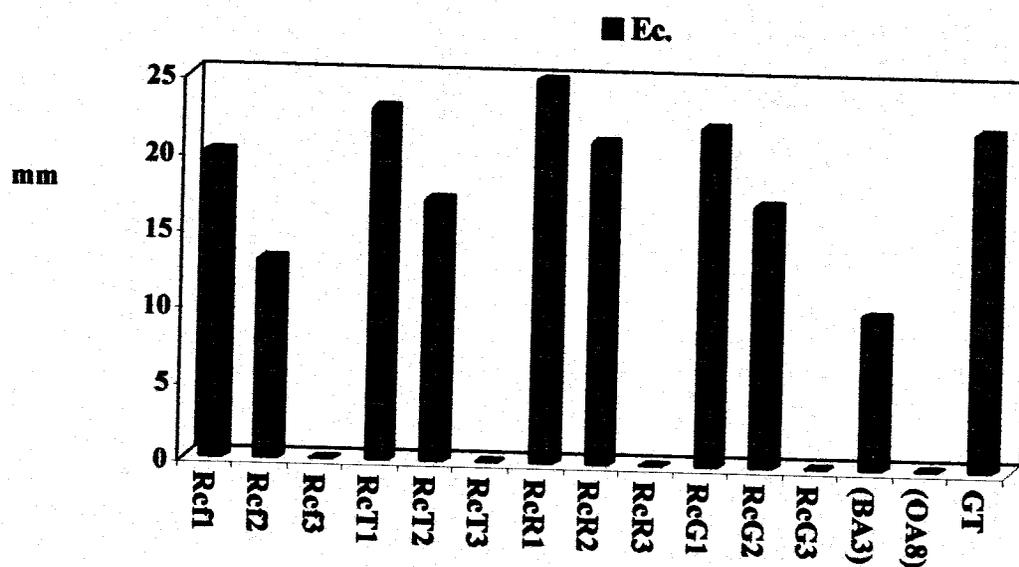
### **IV. Pouvoirs antibactérien et antifongique des extraits et des huiles essentielles issues de *Ruta chalepensis* L. : (la méthode des disques)**

#### **IV.1. Effet de l'ATB, des extraits et des huiles essentielles :**

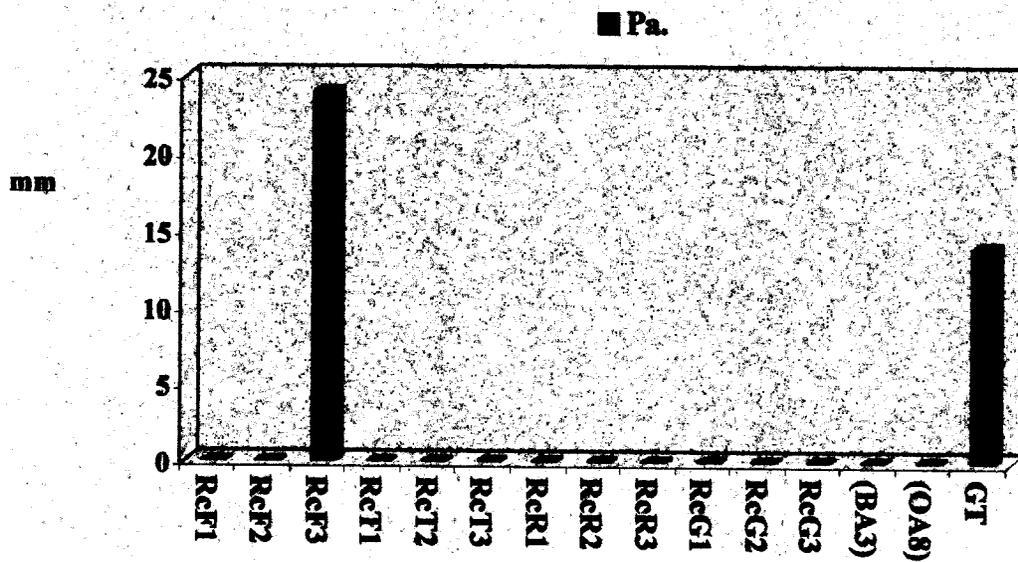
Les résultats de la sensibilité des bactéries vis-à-vis l'ATB, des extraits et de huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. sont donnés respectivement dans le tableau 24 et représentés sous forme d'histogrammes (4 à 7).

**Tableau 24 : Antibiogramme : diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes souches dans le cas de *Ruta chalepensis* L. (la méthode de Vincent).**

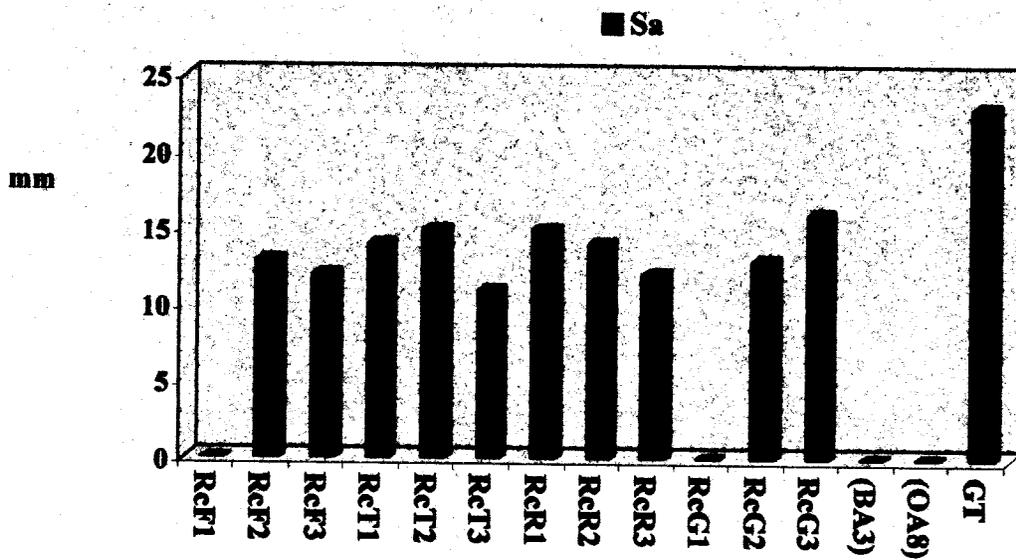
Extraits	Ec.	Pa.	Sa.	Lm.
Rcf1	20	0	0	0
Rcf2	13	0	13	12
Rcf3	0	24	12	0
Rct1	23	0	14	20
Rct2	17	0	15	17
Rct3	0	0	11	0
Rcr1	25	0	15	20
Rcr2	21	0	14	23
Rcr3	0	0	12	0
Rcg1	22	0	0	16
Rcg2	17	0	13	20
Rcg3	0	0	16	0
(BA3)	10	0	0	0
(OA8)	0	0	0	0
GT	22	14	23	20



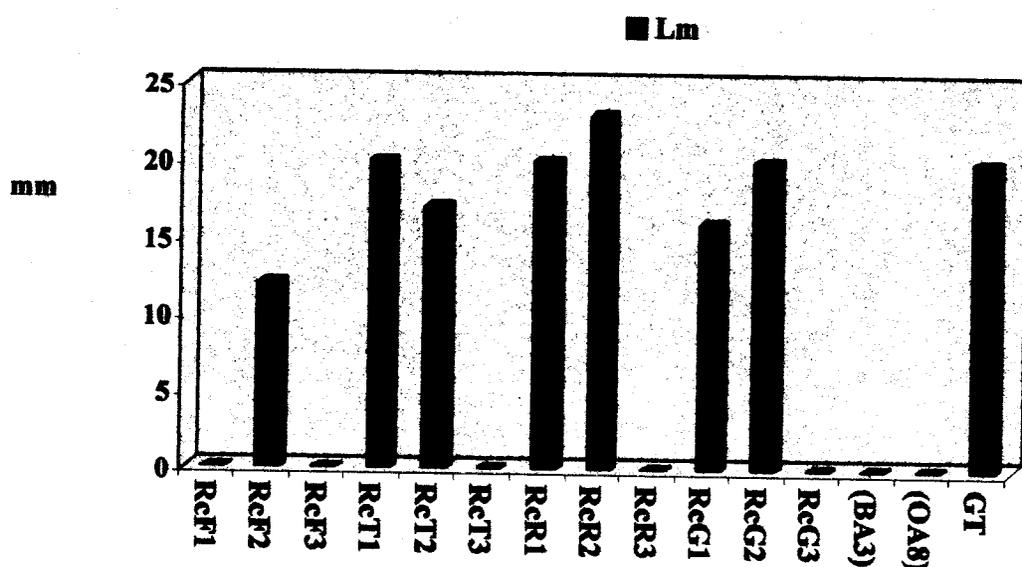
**Histogramme 4 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des bactéries (Ec.) en fonction des extraits, des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. et de l'ATB.**



**Histogramme 5 :** Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des bactéries (Pa.) en fonction des extraits, des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. et de l'ATB.



**Histogramme 6 :** Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des bactéries (Sa.) en fonction des extraits, des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. et de l'ATB.



**Histogramme 7 :** Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des bactéries (Lm.) en fonction des extraits, des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. et de l'ATB.

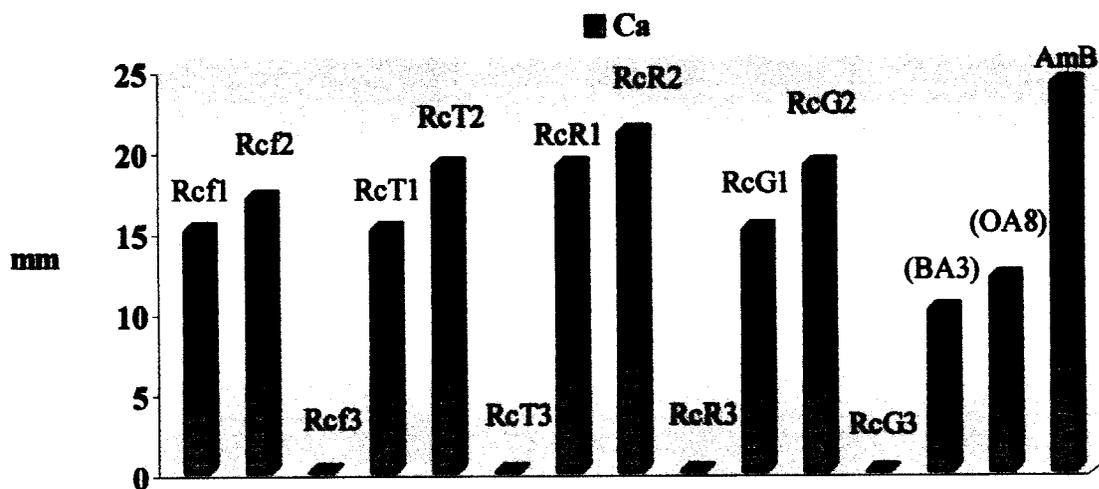
D'après les résultats ainsi obtenus, nous pouvons constater, que les diamètres d'inhibition de la Gentamicine sont supérieurs à *Staphylococcus aureus* (Sa) comparés aux différents extraits et de deux huiles essentielles de *Ruta chalepensis*. Cependant, les diamètres d'inhibition de la Gentamicine sont inférieurs à l'ensemble des autres bactéries comparés aux différents extraits et de deux huiles essentielles de *Ruta chalepensis*. D'autre part, *Escherichia coli* (Ec) sensible aux extraits RCF2, RCT2 et RCG2, alors qu'elle est fortement inhibée par les extraits RCF1, RCT1, RCR1, RCR2 et RCG1 avec respectivement des diamètres d'inhibition 20, 23, 25, 21 et 22mm. Ainsi, il ressort que *Pseudomonas aeruginosa* se révèle très résistante à la plupart des ATB utilisés, alors qu'elle est fortement inhibée par l'extrait RCF3 avec un diamètre d'inhibition 24 mm. *Listeria monocytogens* (Lm) est fortement inhibée par RCT1, RCR1, RCR2 et RCG2, alors qu'elle est très résistante aux extraits RCF1, RCF3, RCT3, RCR3 et RCG3. par ailleurs, les huiles essentielles ne possèdent pas une activité antibactérienne.

#### IV.2. Effet des ATF, des extraits et des huiles essentielles :

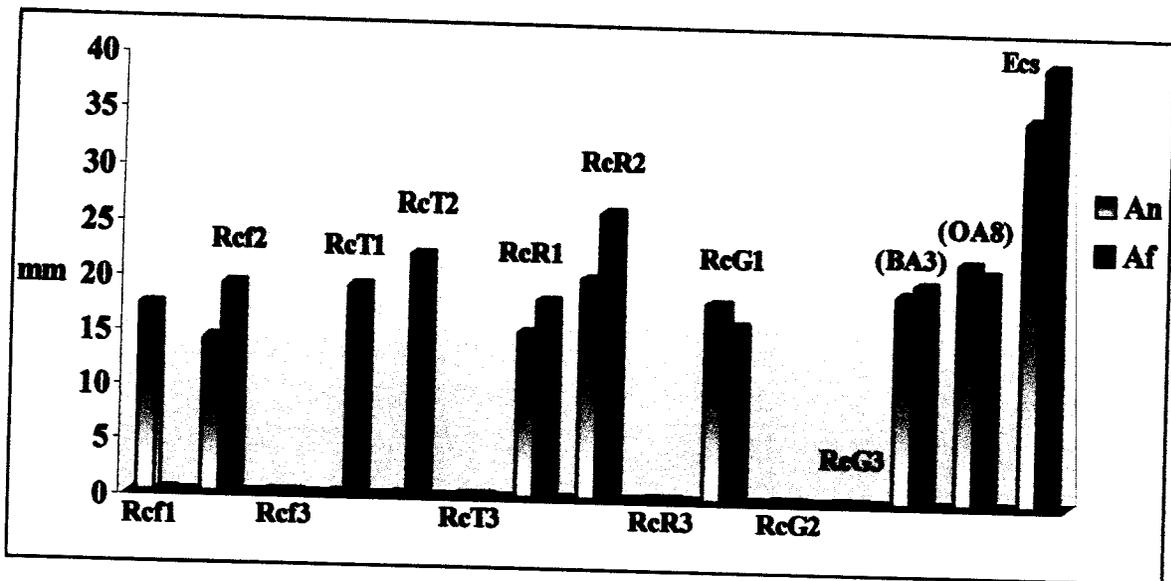
Les résultats de la sensibilité des moisissures et des levures vis-à-vis des ATF, des extraits et des deux huiles essentielles issues de *Ruta chalepensis* L. par la méthode des diamètres des zone d'inhibition sont reportés respectivement dans le tableau 25 et représentés sous forme d'histogrammes (8 à 12).

**Tableau 25 : Antifongigramme : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition des différentes souches.**

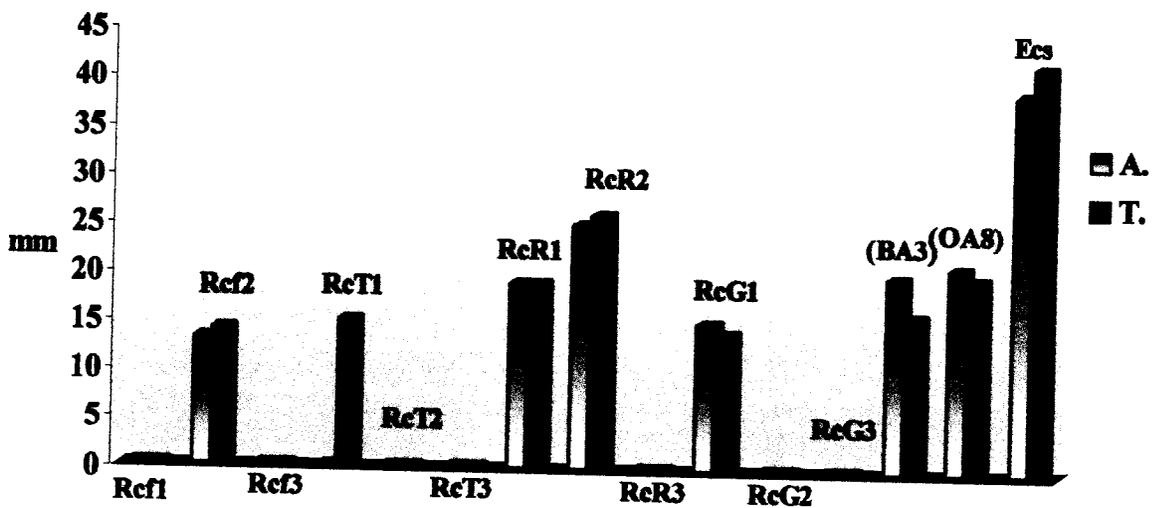
Extraits	Ca.	An.	Af.	A.	T.
RCF1	15	17	0	0	0
RCF2	17	14	19	13	14
RCF3	0	0	0	0	0
RCT1	15	0	19	0	15
RCT2	19	0	22	0	0
RCT3	0	0	0	0	0
RCR1	19	15	18	19	19
RCR2	21	20	26	25	26
RCR3	0	0	0	0	0
RCG1	15	18	16	15	14
RCG2	19	0	0	0	0
RCG3	0	0	0	0	0
(BA3)	10	19	20	20	16
(OA8)	12	22	21	21	20
AmB	24				
Ecs		35	40	39	42



**Histogramme 8 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches (Ca.) en fonction des extraits, des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. et des ATB.**



Histogramme 9 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches (An., Af.) en fonction des extraits, des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. et des ATB.



Histogramme 10 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches (A., T.) en fonction des extraits de *Ruta chalepensis* L. et des ATB.

Si l'on considère l'ensemble des résultats, il ressort que certains extraits sont inactifs sur certaines souches testées. Par contre d'autres extraits possèdent une activité antifongique intéressante : *Candida albicans* (Ca) est inhibée fortement par RCR2 (diamètre d'inhibition = 21 mm). Certains extraits inhibent considérablement la croissance des moisissures (diamètre d'inhibition de 20 à 26 mm).

De même, les huiles essentielles possèdent une activité antifongique intéressante (diamètre d'inhibition de 16 à 21 mm).

**V. Pouvoirs antibactérien et antifongique des extraits et des huiles essentielles issues de *Ruta chalepensis* L : la détermination de la C.M.I. par la méthode de contact direct :**

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) des différents extraits et des deux huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. obtenues par la méthode de contact direct en milieu gélosé sur les bactéries, levure et les moisissures sont reportés dans le tableau 26 et 27. Dans tous les cas, les C.M.I. ont été exprimées en  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ .

**Tableau 26 :** Résultats de l'effet des différents extraits sur les bactéries par la méthode de contact direct en ( $\mu\text{g/ml}$ ).

EXTRAITS	Ec.	Pa.	Sa	Lm
Rcf1	i	i	i	150
Rcf2	15	14	19	13
Rcf3	i	i	i	i
RcT1	i	i	19	i
RcT2	i	i	22	i
RcT3	i	i	i	i
RcR1	17	15	18	19
RcR2	23	20	26	25
RcR3	i	i	i	i
RcG1	14	18	16	15
RcG2	i	i	i	i
RcG3	i	i	i	i
(BA3)	1%	i	i	1%
(OA8)	4%	i	1%	1%

i : inactif jusqu'à la concentration 600 ( $\mu\text{g/ml}$ ).

**Tableau 27 : Résultats des différents extraits sur le développement des spores par la méthode de contact direct en ( $\mu\text{g/ml}$ ).**

Extraits	Ca.	An	Af	A	T
RCF1	600	150	+	150	+
RCF2	+	150	150	150	150
RCF3	+	+	+	+	+
RCT1	600	150	300	150	150
RCT2	+	150	150	150	150
RCT3	+	+	+	+	+
RCR1	+	150	300	150	150
RCR2	+	150	150	150	150
RCR3	+	600	600	+	600
RCG1	+	150	150	150	150
RCG2	+	+	+	+	+
RCG3	+	+	+	+	+
(BA3)	4%	>100 $\mu\text{l/ml}$	100 $\mu\text{l/ml}$	20 $\mu\text{l/ml}$	100 $\mu\text{l/ml}$
(OA8)	4%	>100 $\mu\text{l/ml}$	>100 $\mu\text{l/ml}$	21 $\mu\text{l/ml}$	100 $\mu\text{l/ml}$

+ : croissance

Les résultats obtenus montrent que les microorganismes les plus sensibles sont les bactéries et plus particulièrement *Listeria monocytogens* (Lm.) qui possède une C.M.I. de 13  $\mu\text{g/ml}$ .

En aromathérapie, nous avons :

CMI < 50  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ : excellent pouvoir inhibiteur.

50  $\mu\text{l.ml}^{-1}$  < CMI < 250  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ : pouvoir inhibiteur intéressant.

250  $\mu\text{l.ml}^{-1}$  < CMI < 500  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ : faible pouvoir inhibiteur.

CMI > 500  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ : pouvoir inhibiteur médiocre ou nulle.

D'après ceci, nous remarquons que les bactéries et la levure résistent aux huiles essentielles, alors que ces dernières possèdent un pouvoir inhibiteur intéressant vis-à-vis *Aspergillus niger* (An), *Aspergillus flavus* (Af) et *Trichoderma sp* (T). *Alternaria sp* (A) est fortement inhibée par les échantillons des huiles essentielles.

**VII. Conclusion :**

D'une façon générale, certains extraits issus des différentes parties de *Ruta chalepensis* L. possèdent une bonne activité antimicrobienne : comparable ou certaine fois meilleur que celle donnée par l'antibiotique et les antifongiques utilisés.

Quant aux huiles essentielles, elles possèdent un pouvoir inhibiteur faible ou même nul vis-à-vis les bactéries et la levure. Par contre, la majorité des moisissures utilisées sont fortement inhibées par ces deux échantillons d'huiles essentielles.

### **Références Bibliographiques**

- [1] **A. O. BACHLAF, F. K. A. AL-Belh and B. A. H. EL-Tawil.** Constituents of local plants part 15 : Study volatile oil of Saudi *Ruta chalepensis* L., *Juniperus procera* Hochst. EX ENDL. And *Euphorbia Helioscopia* L. *Herba Hangaria*. Tom 22 N° 1, Jeddah, Saudi arabia. (1983).
- [2] [http://www.planetenonviolence.org/Bienfaits\\_des\\_plantes\\_aromatiques\\_et\\_huiles\\_essentielles\\_Aromatherapie,2005-03-01\\_a100.html](http://www.planetenonviolence.org/Bienfaits_des_plantes_aromatiques_et_huiles_essentielles_Aromatherapie,2005-03-01_a100.html)
- [3] **Smale, B.C., R.A. Wilson et H.L. Keil.** A survey of green plants for antimicrobial substances. *Phytopathology*, 54:748. (1964).
- [4] **Chebli Bouchra, Achouri Mohamed and Idrissi Hassani Mina.** Antifungal activity of Essential oil from several medicinal plants against four postharvest citrus pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 42, 251-256. (2003).
- [5] **KOBA K., SANDA K., RAYNAUD C., NENONENE Y. A. et MILLET J.,** Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp. africains vis à vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie, *Méd. Vét.*, 148, 202-206p, (2004).
- [6] **Courvalin P., Drugeon H., Flandrois J-P. and Goldstein, F.,** Bactéricidie. Aspects théoriques et thérapeutiques, Maloine, Paris, 110p. (1990).
- [7] **Léminor L ; Veron M ;** « Bactériologie médicale », 2<sup>ème</sup> Ed, Flammarion (1989).
- [8] **Duval J, Soussy C. J. ;** « Antibiothérapie », 4<sup>ème</sup> Ed , Masson , Paris (1990).

# **Chapitre VI :**

***Ruta chalepensis* L., plante  
hyperaccumulatrice des  
métaux lourds.**

## **I. Métaux lourds dans les Plantes :**

### **I.1. Introduction :**

D'après le tableau périodique, on a 94 éléments naturels. D'un point de vue chimique, 71 éléments sont des métaux ; parmi eux, selon la définition, une soixantaine sont considérés comme métaux lourds. Les métaux lourds sont donc des composants indispensables de notre terre et de tout ce qui s'y est développé. Ils sont présents partout et dans tout. Mais les concentrations peuvent varier considérablement. Dans l'environnement où nous vivons, on a établi qu'une cinquantaine de métaux lourds sont essentiels à l'un ou l'autre organisme ; neuf sont indispensables à l'homme [1].

Dans la nature, certains métaux lourds se présentent sous forme brute ou libre, mais généralement, ils sont plutôt connus comme minéraux, le plus souvent dans des liaisons insolubles avec l'oxygène, les silicates, carbonates, sulfures et autres phosphates. Chimiquement, toutes les matières se dissolvent, fût-ce en quantités extrêmement réduites. Seuls les éléments ou les liaisons dissous peuvent avoir une activité biologique [2].

Le développement et le maintien de la vie sur terre dépendent donc de la présence de nutriments solubles. Au cours de leur évolution, les plantes et les micro-organismes ont développé des mécanismes plus ou moins sélectifs pour rendre les substances nutritives dites insolubles y compris les métaux lourds plus solubles et disponibles. Ces mécanismes, cependant, manquent souvent de sélectivité. Autrement dit, les métaux indésirables sont assimilés en même temps. Dans cette partie du travail, nous visons la caractérisation de six métaux lourds sont : Pb, Cd, Zn, Fe, Cu, Co [3].

### **I.2. Plantes accumulatrices :**

Beaucoup de plantes des zones humides ont la capacité d'éliminer les substances toxiques provenant des pesticides, des décharges industrielles et des activités minières. L'utilisation de plantes pour l'accumulation de produits toxiques dans les sols, plus particulièrement les métaux lourds, est passée depuis une quinzaine d'année de la phase conceptuelle à la phase commerciale [4].

On a découvert que certaines plantes des milieux humides concentrent les métaux lourds dans leurs tissus cent mille fois plus que l'eau environnante connue sous le nom de phytoremédiation et peuvent donc décontaminer certaines sortes d'effluents. *Eichhornia crassipes* (la jacinthe d'eau), certaines espèces de *Typha* et de *Phragmites* ont été utilisées pour traiter les effluents des régions minières qui contiennent de fortes concentrations de métaux lourds tels que le cadmium, le zinc, le mercure, le nickel, le cuivre, le plomb et le

vanadium. Mais tous les métaux et toutes les plantes ne réagissent pas de la même façon. Certaines sont peu ou pas tolérantes et meurent au contact des métaux lourds. D'autres ont des réactions de défense, et freinent l'absorption en sécrétant des acides. D'autres enfin, sont tolérantes aux métaux, et même les accumulent et les concentrent. Ces plantes sont dit "accumulatrices ou hyperaccumulatrices", qui stockent de 10 à 50 fois plus de polluants dans leurs tiges et leurs feuilles [5, 6].

### **I.3. Toxicité des métaux lourds :**

Les métaux lourds sont des polluants nocifs pour l'environnement, entre autre parce qu'ils provoquent une augmentation des mutations génétiques, d'où leur potentiel cancérigène. Les conséquences toxiques de ces polluants nocifs sont vérifiées au moyen de cellules vivantes comme les bactéries ou au moyen d'expérimentations animales [7].

Le cadmium, un métal hautement toxique présent dans le sol et la pierre, est une cause possible de cancer du poumon et de la prostate et de troubles rénaux. Les aliments et la cigarette sont les principales sources possibles d'exposition au cadmium [8].

Les polluants perturbent la fonction surrénalienne du poisson comme ils s'y attendaient, les chercheurs ont constaté que l'exposition aiguë des xéno biotiques tel le cadmium causait une réaction de stress normale, car on sait que l'exposition aux métaux lourds cause du stress chez le poisson. La croissance des arbres ainsi que leur stabilité génétique et l'absorption de métaux lourds seront examinés sur plusieurs années [9].

L'essai sera terminé avant que les arbres fleurissent, afin d'éviter une dissémination involontaire. Sous terre, les arbres ont absorbé plus de 15% du cadmium présent dans le sol pollué – des résultats similaires en plein champ seraient d'un grand succès. Un projet d'assainissement des sols à l'aide de peupliers génétiquement modifiés est en cours actuellement aux Etats-Unis. Ces arbres contiennent le transgène mer qui les aide à extraire du sol des composés de mercure hautement toxiques [8, 10].

Le tableau 28 montre, en général, le rôle et les seuils de carence et de toxicité de certains métaux lourds dans les plantes.

**Tableau 28 :** Teneur maximale en ppm des métaux lourds dans les plantes [11].

Eléments	Plantes fourragères		Plantes générales	
	Normale	Phytotoxicité	Seuil de carence	Seuil de toxicité
Zn	15	500-1500	50	10-100
Cu	3-20	25-40	15	100-400
Co	0,01-0,3	25-100	3-5	20-200
Cd	0.1-1	5-700	0-2	15-50
Ni	0.1-5	50-100	-	1
Pb	2-5	8	-	8
Fe	30 - 300	-	50	10 - 100

#### I.4. Sol :

Les éléments minéraux sont nécessaires à la vie du sol. Les métaux lourds deviennent plus vite insolubles dans les sols riches en argile, d'un PH élevé, à forte teneur en phosphates, carbonates ou sulfures, ainsi que dans les humus. Autrement dit, les plantes qui poussent sur ces sols affichent rarement une importante concentration en métaux lourds [12]. Les métaux lourds arrivent dans le sol selon :

- Par le vent qui transporte le plomb contenu dans les fumées industrielles et les gaz d'échappement des voitures.
- Par le traitement des cultures avec des produits à base de cuivre (fongicides) ou les apports d'engrais, de lisiers, de boues ou de composts qui peuvent contenir du cadmium, du zinc, du plomb, du mercure ou du chrome.
- Par la roche-mère où les métaux lourds sont naturellement présents.

Dans les sols, les éléments traces métalliques (ETM) se répartissent entre la phase solide et la phase liquide qui constituent ces sols. Le plus souvent, la quantité existant dans la solution du sol ne représente qu'un infime pourcentage de la totalité du polluant (concentrations de l'ordre de  $10^{-4}$ M à  $10^{-1}$ M). Les métaux se concentrent donc dans la fraction solide du sol, où ils se répartissent dans les différentes fractions organiques et minérales. La concentration des métaux lourds varie d'un sol à un autre [13] :

- ◆ **Les argiles :** On trouve une fraction importante des ETM du sol dans la phase argileuse : ils sont inclus dans les réseaux silicatés sous une forme très peu disponible, ou encore adsorbés à la périphérie des argiles.

- ◆ **Les carbonates de calcium** : Dans les sols calcaires, les carbonates de calcium sont les constituants majeurs qui interviennent dans la fixation des éléments-traces, soit par adsorption, par précipitation d'hydroxydes ou de carbonates, ou encore par insertion dans le réseau de  $\text{CaCO}_3$ .
- ◆ **Les oxydes** : Dans la majorité des sols, les oxydes de fer et de manganèse représentent la phase de rétention privilégiée de beaucoup de métaux.
- ◆ **La matière organique** : Elle participe efficacement à la rétention des ETM qui peuvent être retenus sous forme échangeable (donc assez facilement mobilisable) ou à l'état de complexes dans lesquels ils sont plus énergiquement fixés.
- ◆ **Des précipités** : Les micro-polluants métalliques peuvent précipiter dans les sols suivant les conditions qui y règnent, pour former des composés chimiques peu ou pas solubles, tels que des sulfures, des phosphates, des hydroxydes ou des sels organiques.

Enfin, la nature des matériaux auxquels sont associés les ETM dans les boues résiduelles joue un rôle considérable sur leur devenir dans le sol. En effet, les métaux peuvent demeurer inclus dans les matériaux constitutifs de la boue et donc rester fortement liés à cette dernière longtemps après son épandage sur les sols agricoles, réduisant ainsi les possibilités de transfert entre les compartiments du sol, entre le sol et les organismes vivants, et entre le sol et la nappe phréatique.

La fraction de métaux lourds assimilable par la plante, est la fraction disponible du métal, qui représente une certaine probabilité d'être absorbée par la plante. Ces quantités sont difficilement accessibles à la phase liquide du sol, où elles se présentent à des concentrations extrêmement faibles et sous formes variées. La disponibilité de ces éléments dans le sol dépend de leur facteur de comportement.

Les éléments traces se trouvent liés aux complexes absorbants avec une force de liaison qui dépend de la charge de l'ion, d'un autre côté les composés organiques sont de très bons chélateurs et ligands. La dégradation de la matière organique du sol agit sur la disponibilité de ces éléments pour la plante. Ils sont libérés lors de la minéralisation qui est associée au phénomène d'oxydoréduction qui intervient sur la solubilité de l'élément. Les formes réduites de l'élément sont généralement plus solubles que les formes oxydées [7, 14].

## **II. Analyse des métaux lourds :**

### **II.1. Introduction :**

Le dosage d'un élément par spectroscopie d'absorption atomique (SAA) ne peut se faire que si on arrive à le dissoudre dans un solvant organique ou aqueux. Pour cette raison, il est nécessaire de trouver des agents chimiques ou physiques qui puissent le faire passer dans la phase liquide en totalité.

*Ruta chalepensis* L. est une plante médicinale très utilisée, pour cela, nous avons pensé à déterminer les teneurs en métaux lourds des différents organes de la plante et voir si l'utilisation de cette plante ne présente pas un risque de toxicité sur le consommateur.

### **II.2. Dosage des métaux lourds par spectroscopie d'absorption atomique (SAA) :**

#### **II.2. 1. Définition :**

Le dosage par absorption atomique (SAA) est une méthode spectroscopique qui permet de déterminer directement la quantité d'une espèce atomique seule ou mélangée avec d'autres espèces dans un solvant [15].

#### **II.2. 2. Principe :**

Elle est basée sur le fait qu'un atome libre gazeux dans son état fondamental (le plus stable) peut absorber de l'énergie sous forme de lumière de longueur d'onde spécifique pour se mettre dans un état excité. La quantité de lumière (énergie) absorbée à cette longueur d'onde augmentera à mesure que le nombre d'atomes de l'élément choisi augmente dans la zone parcourue par le faisceau lumineux. (Loi de Beer - Lambert) [16].

#### **▪ Limites de la loi de Beer – Lambert :**

La linéarité de la loi du Beer – Lambert est limitée par les facteurs chimiques et instrumentaux. Les causes de la non linéarité incluent : Les déviations dans les coefficients de l'absorptivité à hautes concentrations (>0.01M) qui est due aux interactions électrostatiques entre molécules.

$$A = \epsilon lc$$

**A :** Absorbance.

**$\epsilon$  :** Coefficient d'absorption spécifique.

**l :** Trajet optique.

**c :** Concentration.

$$A = \log I_0/I$$

Où

I : Intensité de la radiation après absorption.

I<sub>0</sub> : Intensité de la radiation incidente.

### II.2. 3. Appareillage :

Les principaux éléments d'un dosage par absorption atomique (SAA) sont : Flamme, détecteur de lumière, Monochromateur et amplificateur, source de lumière, nébuliseur, bouton de réglage de la vitesse d'aspiration, atomisation et détecteur de lumière, (voire figure 44) [17].

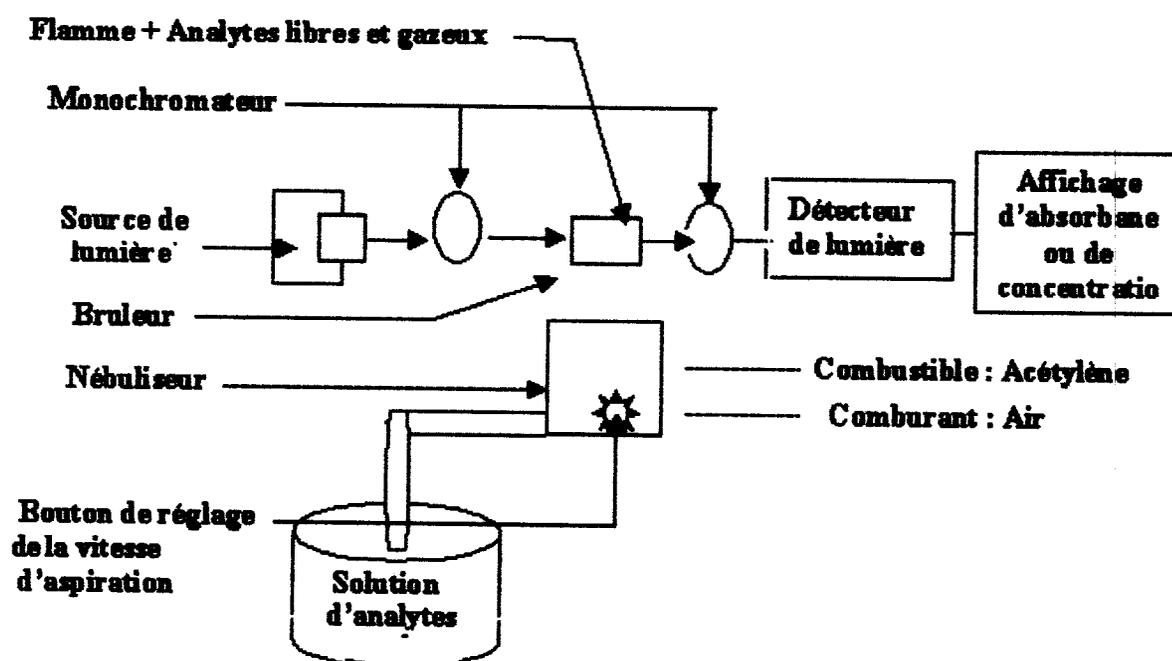


Figure 44 : Schéma général d'un appareil d'absorption atomique à flamme.

#### ❖ Nébuliseur :

La solution d'analyse est alors aspirée dans le capillaire et à la sortie, elle est pulvérisée en un aérosol constitué de fines gouttelettes. Cet aérosol pénètre alors dans la chambre de nébulisation dont le rôle est de faire éclater les gouttelettes et d'éliminer les plus grosses. Ce brouillard homogène pénètre alors dans le brûleur [18, 19].

❖ **Détecteur de lumière :**

Le trajet optique se termine sur la fenêtre d'entrée d'un détecteur. En l'absence de l'élément recherché sur le parcours optique, le détecteur reçoit toute l'intensité  $I_0$  émise par la source dans l'intervalle de longueur d'ondes sélectionnée par la fente d'entrée du système dispersif. Quand l'élément est présent l'intensité reçue  $I$  est moindre, si la source émet un continuum de lumière, le rapport  $I_0/I$  sera toujours proche de 1 car les raies d'absorption sont très fines [20, 21].

❖ **Monochromateur et amplificateur :**

Le monochromateur sélectionne un intervalle très étroit de la longueur d'onde émise, modifiée par la traversée au niveau du brûleur. La réception constituée par un photomultiplicateur associé à un amplificateur linéaire à logarithmique, fournit la valeur de l'absorption [22].

Les principales caractéristiques du dosage et de l'atomisation des échantillons étudiés figurent dans le tableau 29 et celles de l'appareil dans le tableau 30.

**Tableau 29 :** Conditions d'atomisation pour les éléments traces dosés.

Eléments	Raie principale (nm)	Sensibilité (mg/l)	Max absolu (mg/l)
<b>Cd</b>	228.8	0.028	2
<b>Co</b>	240.7	0.12	3.5
<b>Cu</b>	222.6	1.1	50
<b>Fe</b>	271.9	0.34	10
<b>Ni</b>	341.5	0.40	10
<b>Pb</b>	283.3	0.45	20
<b>Zn</b>	213.9	0.018	1

**Tableau 30 :** Les caractéristiques du spectromètre d'absorption atomique à flamme.

Référence de l'appareil	Lampe	Flamme
Analyst 300 Perkin Elmer	Cathodique HCl	Acétylène / air

❖ **Flamme - Atomisation :**

C'est la dissociation en atomes du composé chimique introduit [23]. La production d'atomes libres à l'état gazeux se fait, suivant la nature des atomes, soit par une flamme air/acétylène (2300°C) ou oxyde d'azote (N<sub>2</sub>O)/acétylène (2900°C), à l'aide d'un brûleur[24].

❖ **Source de lumière :**

L'énergie nécessaire pour exciter les atomes de l'élément à doser est sous forme de lumière émise souvent par des lampes à cathodes creuse tel la lampe HCl. La source lumineuse la plus utilisée est une lampe à cathode creuse (HCl) [23, 24].

**II. 3. Conditions opératoires :**

La plante a été récoltée en juin 2005 d'Ouzidane, les différents organes de *Ruta chalepensis* L. (fruits, feuilles, tiges et racines), ont été séchées, séparés et broyés. Ces derniers ont été calcinés à 700°C pendant 2 heures. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention de cendres friables de couleur blanche et que le poids devienne constant. Pour extraire presque la totalité des métaux, nous avons utilisé comme extractants trois acides forts : l'acide chlorhydrique (HCl 35%), l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub> 65%) et l'eau régale (HNO<sub>3</sub>/HCl(1:3)).

Les solutions finales obtenues ont été conservées dans des tubes en verre, l'analyse des solutions a été effectuée avec un spectromètre d'absorption atomique à flamme, Perkin-Elmer A Analyst 300 au sein du Laboratoire de catalyse et synthèse en chimie organique (Université ABB de Tlemcen).

Pour effectuer ces analyses, des solutions étalons ont été préparées.

**II.4. Résultats et interprétations :**

**II.4.1. Teneur de la matière minérale :**

Nous avons déterminé la teneur des éléments minéraux (%) dans les différents organes de la plante étudiée, par la formule suivante :

$$\% = \frac{M_c}{M_s} \times 100$$

**M<sub>c</sub>** : matière sèche après calcination.

**M<sub>s</sub>** : matière sèche avant calcination.

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 31 représenté ci-dessous :

**Tableau 31 :** Rendements de la calcination des différents organes de *Ruta chalepensis* L.

Organes	Fruits	Feuilles	Tiges	Racines
Rendement (%)	11,03	9,92	6,14	3,15

Ces résultats montrent que la concentration de la matière minérale est plus importante dans les fruits, les feuilles et les tiges, cependant, elle est beaucoup moins importante dans les racines.

#### II.4.2. Extraction et dosage des métaux lourds des différents organes de *Ruta chalepensis* L:

Les solutions ainsi préparées par attaque des trois acides (HCl, HNO<sub>3</sub> et l'eau régale) des différents organes de *Ruta chalepensis* L., sont soumises à l'analyse des métaux lourds (Pb, Cd, Zn, Fe, Cu et Co), par spectromètre d'absorption atomique (SAA). Les résultats (en ppm) sont donnés dans les tableaux 32, 33 et 34.

**Tableau 32 :** Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de *Ruta chalepensis* L. (extraction avec HCl)

Eléments \ Organes	Fruits (G)	Feuilles (F)	Tiges (T)	Racines (R)
Co	1.45	458,73	0.76	340,37
Cd	0,61	0,82	0,88	0,62
Cu	40,80	243,44	48,10	178,06
Fe	335,02	3268,32	73.13	2469,63
Pb	12,99	14,82	12,24	12,68
Zn	6,29	6,64	2,30	1,62



**Tableau 33 :** Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de *Ruta chalepensis* L. (extraction avec HNO<sub>3</sub>).

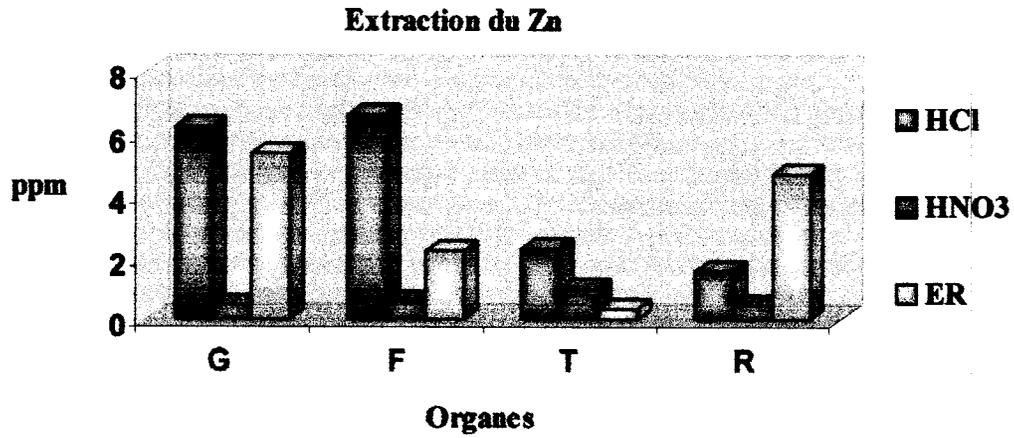
<b>Organes</b> <b>Eléments</b>	<b>Fruits (G)</b>	<b>Feuilles (F)</b>	<b>Tiges (T)</b>	<b>Racines (R)</b>
<b>Co</b>	0	0	0	0
<b>Cd</b>	0	0	0	0
<b>Cu</b>	0	0	0	0
<b>Fe</b>	133,38	183,53	31,73	63,30
<b>Pb</b>	13,07	17,92	13,01	17,61
<b>Zn</b>	0,46	0,60	0,98	0,46

**Tableau 34 :** Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de *Ruta chalepensis* L. (extraction avec l'eau régale).

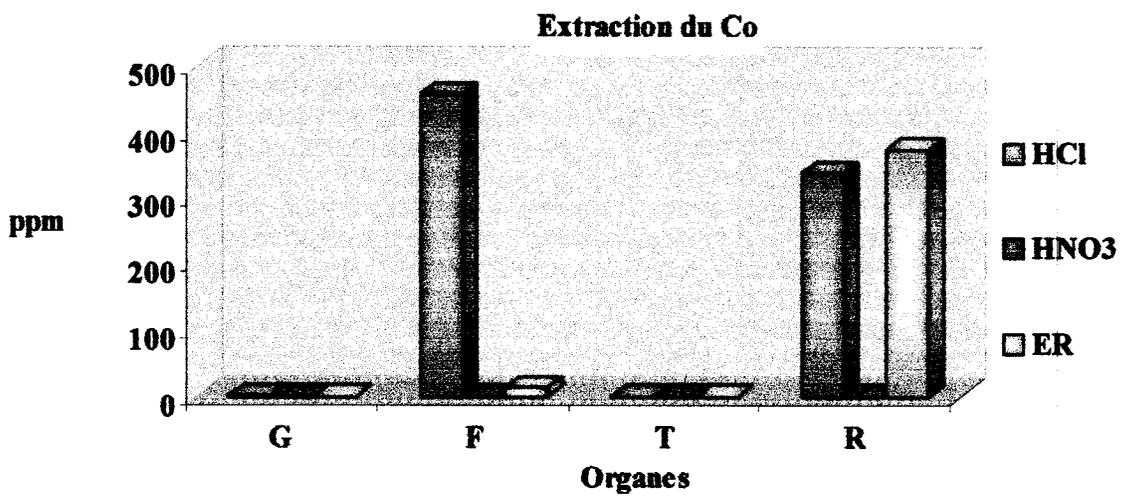
<b>Organes</b> <b>Eléments</b>	<b>Fruits (G)</b>	<b>Feuilles (F)</b>	<b>Tiges (T)</b>	<b>Racines (R)</b>
<b>Co</b>	0	13,50	0	374,57
<b>Cd</b>	0	0	0	0,01
<b>Cu</b>	0	0	0	204,20
<b>Fe</b>	44,38	86,63	78,50	2538,37
<b>Pb</b>	10,29	18,65	9,14	12,19
<b>Zn</b>	5,42	2,23	0,36	4,78

Les résultats d'extractions de chaque métal par les trois solutions acide sont représentés sous forme d'histogrammes de 13 à 18.

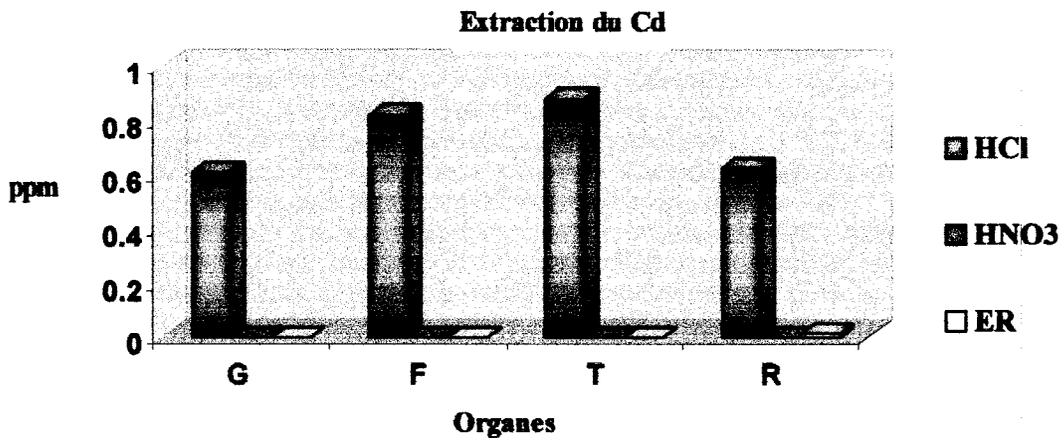
**Histogramme 13 : Concentration de Zn (extraction par HCl, HNO<sub>3</sub> et l'eau régale (ER)).**



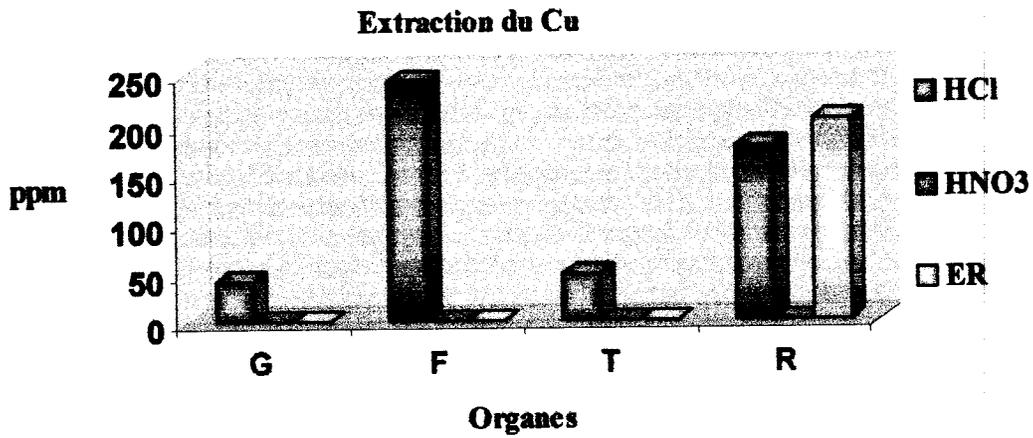
**Histogramme 14 : Concentration de Co (extraction par HCl, HNO<sub>3</sub> et l'eau régale (ER)).**



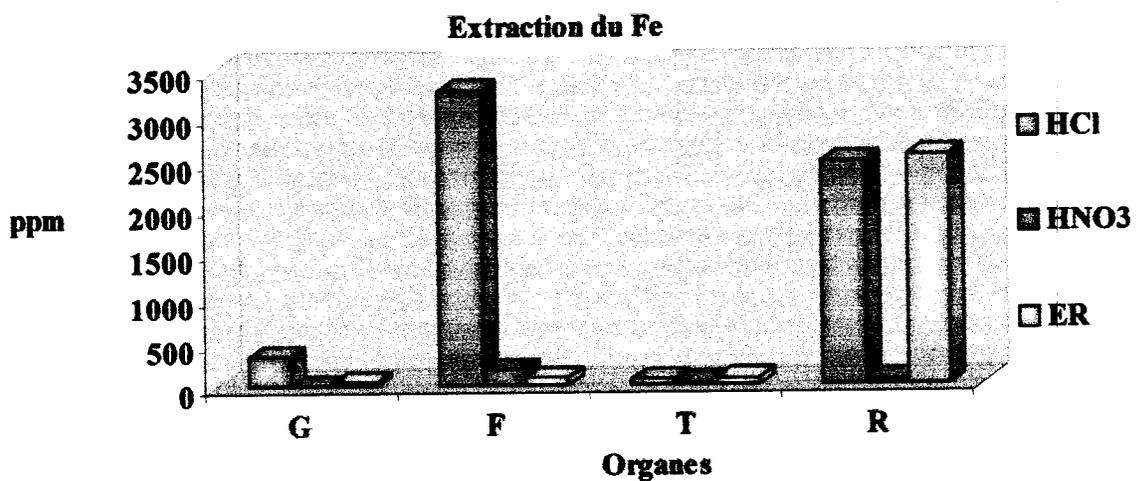
**Histogramme 15 : Concentration de Cd (extraction par HCl, HNO<sub>3</sub> et l'eau régale (ER)).**



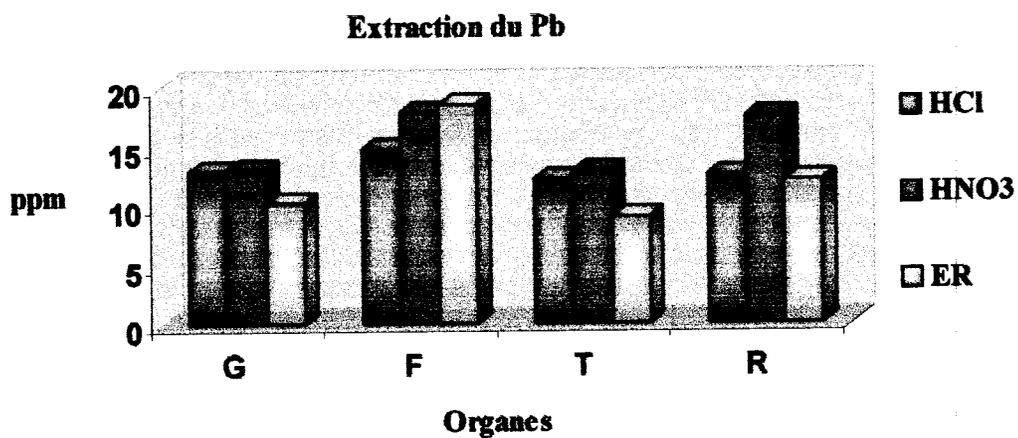
**Histogramme 16 : Concentration de Cu (extraction par HCl, HNO<sub>3</sub> et l'eau régale (ER)).**



**Histogramme 17 : Concentration de Fe (extraction par HCl, HNO<sub>3</sub> et l'eau régale (ER)).**



**Histogramme 18 : Concentration de Pb (extraction par HCl, HNO<sub>3</sub> et l'eau régale (ER)).**



➤ **Discussion :**

Après traitement et extraction des différents organes de la plante étudiée respectivement avec HCl, HNO<sub>3</sub> et l'eau régale, les teneurs en métaux lourds obtenues montrent que la nature de l'acide employé et le type d'organe soumis à notre investigation jouent un rôle important dans la facilité d'extraction d'un métal donné. En effet, les métaux Co, Cd et Cu sont mieux extraits par l'acide chlorhydrique concentré dans respectivement les feuilles et les racines. De plus le fer et le plomb sont extraits par tous les acides. Les feuilles et les racines sont très riches en fer et en plomb. D'autre part, HCl extrait mieux le zinc à partir des feuilles, des fruits, des tiges et les racines.

Ces résultats ne permettent pas d'évaluer la teneur totale d'un élément. Ceci est du au fait que les extractants utilisés ne sont pas probablement capables d'extraire de l'organe étudié la totalité du métal ce qui rend difficile l'estimation de la phytodisponibilité des métaux lourds dans notre plante. Pour pouvoir obtenir une teneur véritablement totale, il est impératif de dissoudre toutes les formes assimilables de l'élément.

Toutefois, d'après ces résultats, on peut remarquer que la concentration des métaux lourds varie d'un organe à un autre de la plante. Les métaux lourds Co, Cu, Fe et Pb se répartissent dans toute la plante mais se concentrent plus dans les feuilles et les racines. De plus, le Cd se retrouve dans toute la plante alors que le Zn se concentre plus principalement dans les feuilles et les fruits. En effet, les teneurs en Co, Pb et Fe dépassent très largement le seuil de phytotoxicité. En même temps, les teneurs en Cu dépassent très largement la valeur minimale de la phytotoxicité.

**II.5. Conclusion :**

Les adaptations morphologiques et les régulations physiologiques des plantes notamment celle de *Ruta chalepensis* L. indispensables pour tolérer les modifications en milieu extérieur. Ces adaptations tendent à amplifier l'absorption racinaire des ces plantes en sol, et permettent ainsi de tolérer et d'accumuler des métaux jusqu'à des taux éventuellement toxiques.

Généralement la concentration du métal dans les plantes n'est pas proportionnelle à la concentration du métal dans le sol. Elle lui est même supérieure. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs hypothèses sont considérées parmi les quelles la tolérance en métaux, la résistance à la sécheresse, la compétition avec les plantes voisines et le mécanisme de défense contre les herbivores et les pathogènes.

Chapitre VI : *Ruta chalepensis* L., plante hyperaccumulatrice des métaux lourds.

En effet, la plante étudiée une importante concentration en Fe, Co, Pb et Cu dépassent très largement le seuil de phytotoxicité. Donc il est clair que *Ruta chalepensis* L. est une plante hyperaccumulatrice des métaux lourds, surtout en Fe, Co, Pb et Cu.

## **Références Bibliographiques**

- [1] **Marc Verloo**, Les métaux lourds dans les denrées alimentaires: origine et évolution des teneurs Symposium, "Les oligo-éléments dans l'alimentation en Belgique -Données récentes". Vol 3. 78-80p, Paris. (2003).
- [2] **Ducaroir, J. and Lamy, L.**, Evidence of trace metal association with soil organic matter using particle size fractionation after physical dispersion treatment. *Analyst*, 741-745p. (1995).
- [3] **Ireland, M.P.**, Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworms. J.E. Satchell (Ed), *Earthworm ecology from Darwin to vermiculture.*, 247-265p.(1983).
- [4] **Alleman, B. and Cand Leeson, A.**, In situ and on-site bioremediation. Fourth International In situ and on-site bioremediation symposium, New Orleans, Battelle Press. Vol. 3, April 28-May 1, 301-366pp. (1997).
- [5] **Wattanabe, M.E.**, Phytoremediation on the brink of commercialisation, *Environmental science and technology*. Vol. 31, n°4, 182A-186App. (1997).
- [6] **Morel, J. L., Bitton, G., Schwartz, C. and Shiavon, M.**, Ecotoxicology : responses, biomarkers and risk assesment. Rapport pour l'OCDE. (1997).
- [7] <http://www.pi.csiro.au/Media/MediaReleases/MR%2028-05-01.htm>
- [8] **Giller, K.E., Witter, E. and Mc Grath S.P.**, Toxicity of heavy metals to micro-organisms and microbial processes in agricultural soils. A review. *Soil biol. Biochem.*, 1389-1414p. (1998).
- [9] **C. L. Rugh et al.**, "UGA researchers use transgenic trees to help clean up toxic waste site", University of Georgia communiqué de presse, 138-154p. (1998).
- [10] <http://www.feldversuch.ethz.ch>
- [11] **Cunningham, J.D., Keeney, D.R., J.A. Ryan**, Phytotoxicity in and metal uptake from soil treated with metal-amended sewage sludge. *J. Environ. Qual.*, 4 : 455-460p. (1975).
- [12] **Callot, G., Chamayon, H., Maertens, C. et Salsac, L.**, Les interactions sol- racine. I.N.R.A., Paris. (1982).
- [13] **Jabiol, B., Brethes, A., Ponge, J.F., Toutain, F. et Brun, J.J.**, L'humus sous toutes ses formes. Engref, Nancy, 63p. (1995).
- [14] **Duchanfour, P. et Blum, W.E.M.**, Abrégé de pédologie : sol, végétation, environnement. Masson, 297p. (1997).

- [15] **Matteini, M., Lalli, C. and Tosini, I.**, Examination of the soluble components of patinas by means of ion chromatography and atomic absorption. In : ODP restauro : rivista dell'Opificio delle pietre dure e laboratorio di restauro di firenze. 3, 40-46pp. (1991).
- [16] **Selwyn , L.S. ;Costain , C.G.**, Evaluation of silver –cleaning product , Journal of the international institute for Conservation –Canadian group. 16, 3-16 pp. (1991).
- [17] **Pollard, A-M ;Hatcher, H.**, The chemical analysis of oriental ceramic body compositions :part I wares from north china, Archaeometry. 36, n<sup>o</sup>1, 41-62 pp. (1994).
- [18] **Ffornaciari, G.**, Paleodiel research on proto-Eneolithic skeletal remains of pianovento (palma di montechiaro, Agrigento, Sicily) by atomic absorption spectrometry, rivista di antropologia, 68, 129-140pp. (1990).
- [19] **Bello, M. and Martin, A.**, Microchemical characterization of building stone from seville cathedral, Spain, Archaeometry, 34, n<sup>o</sup>1, 21-29pp. (1992).
- [20] **Tang, L.C.**, Determiation of iron and copper content in 18th and 19th century books by flameless atomic absorption spectrometry. JAIC, 17, 2, 19-32pp. (1978).
- [21] **Rouessac, F. et Rouessac, A.**, Analyse chimique :Méthodes et techniques instrumentales modernes. 5<sup>ème</sup> Ed, Dunod, Paris, 231p. (2000).
- [22] **De pape, P., Brijse, I.**, Lacomposition des céramiques d'el Kadada (Soudan central) au passage du méroïtique au postméroïtique, Archéologie du nil Moyen. 2, 149-174 pp. (1987).
- [23] **Schmidt, S.**, The formation of sodium formate on glass surfaces : examination of historical objects. Berliner Beiträge zur archäometrie, 11, 137-183 pp. (1992).
- [24] **Daniel, F., Flieder, F., Juchauld, F. and Yver, C.**, Study of the homogeneity of mass deacidification treatments using atomic absorption spectrometry, preventive conservation) Congress, ottawa, 12-16 septembre. (1994).

# **Conclusion générale**

## LUSION GENI

Dans le cadre de la valorisation des plantes aromatiques qui se trouve dans la wilaya de Tlemcen qui situent à l'Ouest d'Algérien, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une Rutacée : *Ruta chalepensis* L. (Fidjel). C'est un arbuste vivace, spontané et cultiver, se trouve dans la région de la méditerranée, elle dégage une odeur forte et très désagréable. C'est une plante médicinale encore utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, antiépileptique, emménagogue abortif et pour le traitement de pathologies cutanées.

Les résultats obtenus au cours de ce travail complètent et confortent une démarche scientifique de plus en plus fréquente : l'établissement de relations entre l'utilisation empirique de plantes par les populations, et la connaissance scientifique, et plus particulièrement chimique, de ces plantes.

Ce travail se place également dans une problématique de recherche pluridisciplinaire, associant des techniques caractéristiques de la chimie organique, de la chimie minérale, de la chimie analytique mais aussi de la biologie. Nous avons du aborder cette dernière de manière générale, en privilégiant toutefois la composante chimique qui constitue l'ossature de l'étude.

En réponse aux objectifs fixés, nous nous prononcerons en termes de résultats obtenus, de limites et de prospectives.

Des résultats qui nous semblent les plus significatifs, on retiendra premièrement la présence de plusieurs familles de composés chimiques, dans les différentes parties de la plante telles que les huiles volatiles, les flavonoïdes, les stérols et stéroïdes, les saponosides, les coumarines et les alcaloïdes.

L'analyse et l'identification des constituants des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. en se basant sur la Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/MS), sur la Chromatographie en phase gazeuse (GPC), sur Chromatographie sur Couche Mince (CCM) et sur littérature révélée d'une grande richesse chimique. Il s'agit d'une plante aromatique riche en huiles essentielles dont le composé majeur est le 2-undécanone. Nous avons pu observer une importante variabilité de la teneur, les propriétés physicochimiques et la composition de ces huiles essentielles en fonction de la période de récolte, le site de récolte et la partie de la plante utilisée. Cet avant dernière observation pose le problème de variabilité écologique, ou de chémotype de cette espèce. *Ruta chalepensis* L. est une espèce riche en cétones dont le 2-undécanone et autres molécules (2-nonanone, 2-décanone ...), elle renferme aussi des alcools tels que le n-décanol, le 2-undécanol et un seul composé hydrocarbure monoterpénique de limonène.

L'étude de l'activité biologique des extraits et des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. sur quelques bactéries et quelques champignons, a montré que certains de ces extraits possèdent une bonne activité vis-à-vis de quelques microbes. Les résultats ont montré aussi une activité notable des huiles essentielles contre les moisissures.

L'analyse montre une complexité dans la composition chimique (plusieurs centaines de constituants pour une seule huile essentielle), ce qui entraîne des propriétés thérapeutiques importantes et variées, nécessitant certaines précautions d'emploi. Les huiles essentielles sont "des mélanges complexes de substances diverses ayant chacune leurs propriétés particulières".

Au cours de cette étude, un autre axe de recherche plus récent a été développé. C'est celui de la phytoremediation. Cette étude a montré *Ruta chalepensis* L. est une plante hyperaccumulatrice aux métaux lourds notamment le fer, le cobalt, le plomb et le cuivre.

Ce résultat intéressant représente une nouveauté et est rapporté pour la première fois dans cette espèce. Il en découle des analyses réalisées par absorption atomique que la plante étudiée accumule des métaux lourds parfois à des quantités dépassant de loin le seuil de toxicité. Cette constatation pose un problème majeur relatif à la contamination dans la chaîne alimentaire.

Devant ces qualités de plante tolérante et hyperaccumulatrice des métaux lourds, nous préconisons la culture de *Ruta chalepensis* L. dans les sols contaminés dans le but de les dépolluer.

En définitif, ce travail, s'il fixe des résultats certains, ouvre des perspectives et des pistes de recherches, tant au niveau de la connaissance scientifique, qu'à celui d'une possibilité de valorisation de la matière végétale de nos régions.

# **Partie expérimentale.**



### **I. Introduction :**

La mise en évidence des différentes familles de composés chimiques, s'effectue par des tests phytochimiques réalisés sur des différentes parties de *Ruta chalepensis* L. (feuilles, tiges, racines et grains), ou sur un extrait de la plante. Ces tests sont basés sur :

- des réactions de coloration et de précipitation,
- des examens en lumière ultraviolette,
- des essais de solubilité, notamment dans différents solvants à polarité croissante (l'éther diéthylique, l'éthanol et l'eau distillée).

#### **❖ Mode opératoire :**

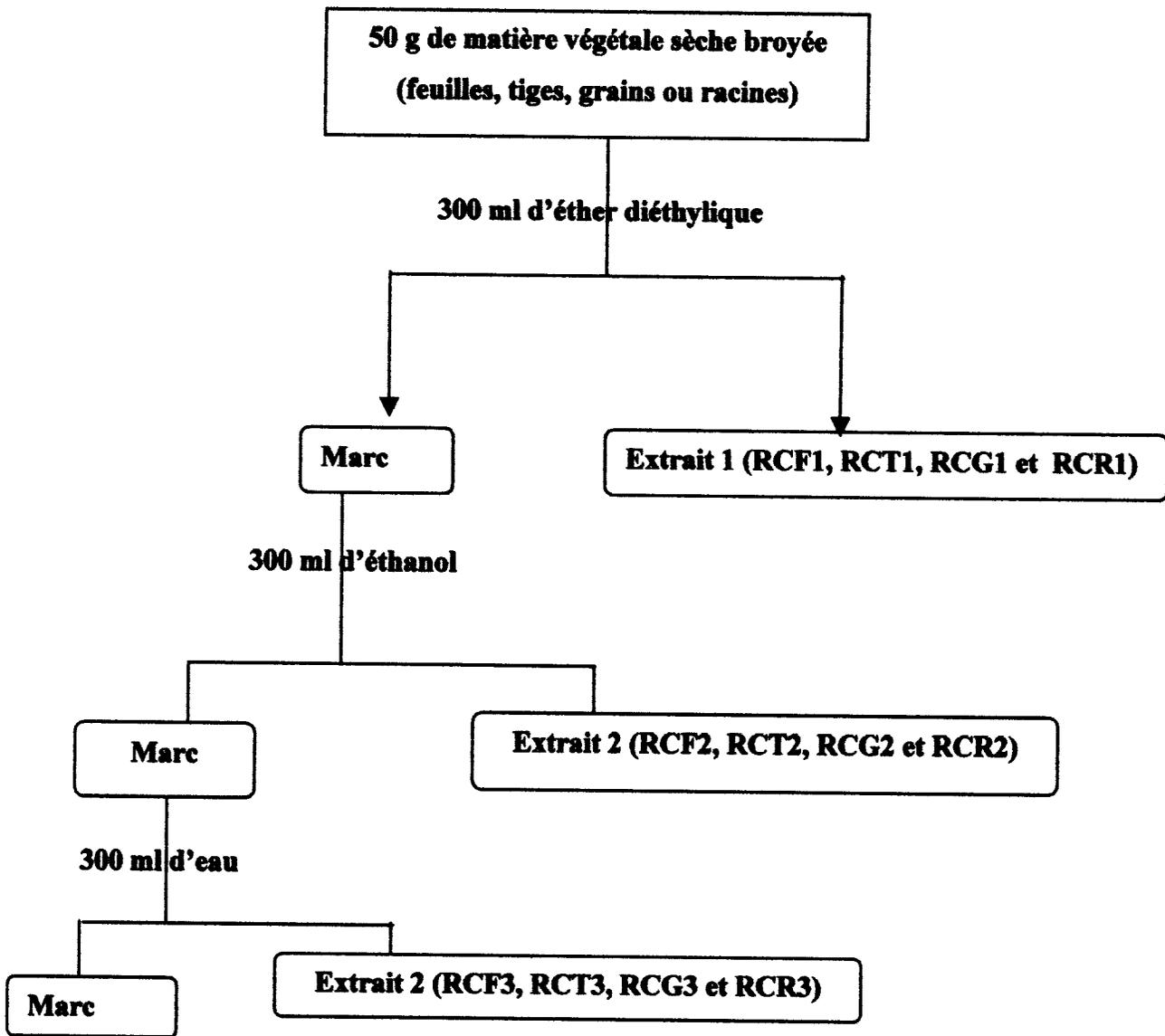
Le matériel végétal est débarrassé des bris. Pour s'assurer de la bonne conservation de notre plante, un lavage de l'eau distillée suivi d'un séchage à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours ont été réalisés. Elle est ensuite conservée dans des flacons à l'abri de la lumière. Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toutes activités enzymatiques responsables de leurs dénaturations.

La méthode d'extraction utilisée est la percolation (voir figure 45), elle consiste à utiliser un appareil spécial : extracteur de Soxhlet.

A l'aide d'une balance analytique, on pèse 50 g pour chaque organe, on place dans une cartouche en papier filtre, elle doit être fermée pour empêcher l'organe de la plante d'être emportée par les trois solvants à polarité croissante (éther diéthylique, éthanol et l'eau), le tout est mis au fond du siphon.

Dans un ballon, on introduit 300 ml pour les différents solvants et des fragments de pierre ponce.

La durée moyenne de l'extraction est de 6 heures. On réalise la même expérience pour les autres organes de la plante, à la fin de l'opération, la cartouche est retirée et le solvant est évaporé. Nous avons obtenu 12 extraits.



**Figure 45 :** Schéma général de l'extraction par soxhlet des différentes parties de *Ruta chalepensis* L.

Une partie des extraits est utilisée pour les examens phytochimiques, l'autre partie est utilisée pour les tests antimicrobiens.

### **I.1. Examens phytochimiques :**

#### **1. Produit végétal épuisé avec l'éther diéthylique(RCF1, RCT1, RCG1, RCR1) :**

Les extraits sont soumis aux tests suivants :

**A. Terpènes- huiles volatiles :**

Evaporer 20 ml de la solution éthérique. Le résidu ainsi obtenu est dissout dans l'éthanol. La solution éthanolique obtenue est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme.

**B. Acides gras :**

Acidifier la solution aqueuse alcaline, puis l'extraire avec l'éther diéthylique. La solution éthérique est ensuite concentrée à sec, un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

**C. Stérols et stéroïdes :**

Deux essais ont été effectués :

- Evaporer 10 ml d'extrait éthérique, traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre puis filtrer. Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique et ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter puis laisser reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 mn à 21°C).
- Evaporer l'extrait éthérique correspondant à 10 ml puis dissoudre le résidu obtenu dans 0,5 ml d'anhydre acétique et 0,5 ml chloroforme. Traiter le filtrat avec le réactif de **Liebermann Burchardt**. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration verte - violette ou verte - bleue.

**D. Alcaloïdes bases :**

Evaporer 10 ml de solution éthérique, dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml de HCl (2%), ajouter à la solution aqueuse alcaline 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer. La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

**E. Flavonoïdes :**

Traiter 3 ml d'extrait éthérique avec 1 ml de HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de quelques minutes.

**F. Coumarines :**

Deux essais ont été réalisés :

- Evaporer 5 ml de la solution extractive éthérique. Dissoudre le résidu dans 1 à 2 ml d'eau chaude. Diviser le volume en deux parties. Prendre le demi-volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et les examiner sous la lumière UV. Une fluorescence intense indique la présence de 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 placer dans un bain-marie pendant quelques minutes. L'examen sous UV, donne une fluorescence intense.

**G. Emodols :**

Evaporer 3 ml de l'extrait éthérique, dissoudre le résidu dans 1 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , ensuite traiter la solution avec la réaction de **Bontrager**, un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orange rouge au violet pourpre.

**2. Produit végétal épuisé avec l'éthanol (RcF2, RcT2, RcG2, RcR2) :**

Les extraits sont soumis aux tests suivants :

**A. Alcaloïdes sels :**

Deux essais ont été réalisés :

- Evaporer 20 ml de la solution éthanolique. Ajouter 5 ml d'HCl (10%) au résidu et chauffer dans un bain-marie. Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes de solution de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%) jusqu'à pH 9. Extraire la solution avec l'éther diéthylique, ensuite concentrer à sec. Dissoudre le résidu dans du HCl (2%). Caractériser les alcaloïdes avec les réactifs de **Mayer** et **Wagner**.
- Evaporer 20 ml de la solution éthanolique à sec. Ajouter 5 ml de HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain- marie. Filtrer le mélange puis diviser le filtrat en deux partie égales. Traiter la première avec quelques gouttes du réactif de **Mayer** et la seconde avec le réactif de **Wagner**.

**Observation :** Présence de turbidité ou précipitation.

(+) est enregistré si le réactif produit une légère opacité,

(++) est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation,

(+++ ) est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd.

**B. Flavonoïdes :**

Traiter 5 ml d'extrait alcoolique avec quelques gouttes de HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de 3 minutes.

**C. Tanins :**

A 1 ml de solution alcoolique, ajouter 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de  $\text{FeCl}_3$  diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire, verte ou bleu-verte et un précipité. Selon que les tanins sont cathéchiques, galliques ou éllagiques.

**D. Composés réducteurs :**

Deux essais ont été réalisés :

- Traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de **Fehling** puis chauffer, un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.
- Traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec le réactif **Keller kiliani**. Un test positif est révélé par la formation d'un anneau brun-rouge, et la solution acétique se colore lentement en bleu-vert.

Pour les Anthracénosides, Coumarines et Anthocyanosides nous avons procédé de la manière suivante :

En premier lieu, prendre 25 ml de l'extrait éthanolique en présence de 15 ml de HCl (10%), porter à reflux pendant 30 mn. Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 ml d'éther. Traiter les deux phases séparément.

**E. Anthracénosides :**

Traiter 8 ml de la solution extractive étherique par le réactif de **Borntrager**. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangé - rouge au violet - pourpre.

**F. Coumarines :**

Deux essais ont été réalisés :

- Evaporer 5 ml de la solution extractive étherique. Dissoudre le résidu dans 1 à 2 ml d'eau chaude. Diviser le volume en deux parties. Prendre le demi-volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et les examiner sous la lumière UV. Une fluorescence intense indique la présence du 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 placer dans un bain-marie pendant quelques minutes. L'examen sous UV, donne une fluorescence intense.

**G. Anthocyanosides :**

Doser la solution aqueuse acide avec une solution de NaOH. S'il y a un virage de couleur en fonction du pH, la présence des anthocyanosides est confirmée.

- $\text{pH} < 3$ , la solution prend une coloration rouge.
- $4 < \text{pH} < 6$ , la solution prend une coloration bleue.

#### **H. Stérols et stéroïdes :**

Deux essais ont été effectués :

- Evaporer 10 ml d'extrait alcoolique, traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre puis filtrer. Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique et ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter puis laisser reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 mn à 21°C).
- Evaporer l'extrait alcoolique correspondant à 10 ml puis dissoudre le résidu obtenu dans 0,5 ml d'anhydre acétique et 0,5 ml de chloroforme. Traiter le filtrat avec le réactif de **Liebermann Burchardt**. Si une solution bleu-verte apparaît, elle indique la présence des hétérosides.

#### **3. Produit végétal épuisé avec de l'eau chaud (RcF3, RcT3, RcG3, RcR3) :**

Les extraits sont soumis aux tests suivants :

##### **A. Amidon :**

Traiter 5 ml de l'extrait avec le réactif d'amidon. L'apparition d'une coloration bleu violacée indique la présence d'amidon.

##### **B. Composés réducteurs :**

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse 5 à 8 gouttes de liqueur de **Fehling**. Chauffer la solution. Un précipité rouge brique marque la présence des hydrates de carbones.

##### **C. Saponosides :**

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse un peu d'eau et ensuite agiter d'une manière forte. Une écume persistante confirme la présence des saponosides. Abandonner le mélange pendant 20 mn et classer la teneur en saponosides :

- ✓ Pas de mousse ⇒ test négatif.
- ✓ Mousse moins de 1 cm ⇒ test faiblement positif.
- ✓ Mousse de 1-2 cm ⇒ test positif.
- ✓ Mousse plus de 2 cm ⇒ test très positif.

##### **D. Tanins :**

Traiter 1 ml de la solution aqueuse avec 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution diluée de  $\text{FeCl}_3$ . L'apparition d'une coloration verte-foncé ou bleu-verte indique la présence des tanins.

**E. Alcaloïdes sels :**

Mettre 15 ml de l'extrait aqueux dans un ballon bicol. Ajouter  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%) jusqu'à  $\text{pH}=9$ . Extraire  $3 \times 10$  ml de chloroforme. Laver la solution chloroformique avec  $3 \times 2$  ml de  $\text{HCl}$  (10%). La solution aqueuse de lavage est divisée en trois parties égales. Tester les échantillons avec les réactifs de **Mayer** et de **Wagner**. Le troisième tube est considéré comme témoin.

**F. Anthraquinones :**

Bouillir 1 g d'échantillon de la plante pendant quelques minutes en présence de 10 ml de  $\text{KOH}$  0,5 N auxquelles est ajouté 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dilué à (5%). Refroidir le mélange, filtrer puis acidifier le filtrat avec l'acide acétique. Extraire la solution acide obtenue avec 10 ml de benzène. Agiter l'extrait benzénique en présence de 5 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Une réaction positive est révélée par la formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline.

**II. Réactifs de caractérisation :**

**1) Alcaloïdes**

▪ **Réactif de Mayer :**

Dissoudre 1,358 g de  $\text{HgCl}_2$  dans 60 ml d'eau. Dissoudre 5 g de  $\text{KI}$  dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un trouble puis un précipité blanc.

▪ **Réactif de Wagner :**

Dissoudre 2 g de  $\text{KI}$  et 1,27 g de  $\text{I}_2$  dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

**2) Stérol et stéroïdes :**

▪ **Réaction de Liebermann Burchardt :**

Mélanger 5 ml de solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposer 30 mn à  $21^\circ\text{C}$ . Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace vivant au vert. D'autre part, cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiques et tritérpéniques respectivement les colorations verte-bleue et verte-violette.

### 3) Anthracénosides, Anthraquinones et Emodols

#### ▪ Réaction de Borntrager :

En milieu alcalin aqueux ces composés donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituant de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacée.

### 4) Composés réducteurs :

#### ▪ Liqueur de Fehling :

La liqueur de Fehling est un mélange de deux solutions :

- **Fehling A** : dissoudre 0,5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans 50 ml d'eau distillée.
- **Fehling B** : dissoudre 6,5 g de NaOH et 17,3 g tartrate de sodium dans 35 ml d'eau distillée puis compléter le volume à 50 ml.

Les composés réducteurs donnent avec ce réactif un précipité rouge brique.

#### ▪ Réaction de Keller - Killiani :

L'addition de 5 ml d'acide sulfurique concentré contenant des traces de sels ferriques à 5 ml d'une solution d'hétérosides dans d'acide acétique concentré contenant également des sels ferriques, conduit à la formation d'un anneau brun-rouge. La solution acétique se colore lentement en bleu-vert.

### 4) Amidon :

#### ▪ Le réactif d'amidon :

Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium. Chauffer pendant 5 mn. Diluer jusqu'à 500 ml.

Chauffer 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition. Ajouter le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-violacé.

### III. Extraction des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. :

En se basant sur les résultats des examens phytochimiques, nous pouvons dire que la *Ruta chalepensis* L. est riche en huile essentielle, suite à ceci, nous procéderons à l'extraction de cette dernière par hydrodistillation.

#### **IV. Propriétés physico-chimiques des H.E.**

##### **IV.1. Caractéristiques physiques :**

###### **IV.1.1. Densité relative :**

###### **❖ Mode opératoire :**

A l'aide d'une balance analytique on pèse un pycnomètre en verre d'une capacité de 1 ml, propre, vide et sec. Après peser le pycnomètre avec 1 ml de l'eau distillée à 20°C. D'autre part, vider le pycnomètre, puis sécher et refroidir aux environs de la température de milieu à 20°C.

Enfin, effectuer les mêmes opérations en remplaçant l'eau distillée par 1 ml l'huile essentielle à 20°C.

###### **IV.1.2. Indice de réfraction :**

###### **❖ Mode opératoire :**

A l'aide d'un réfractomètre de type : **Abbe Réfractometer 1T/4T, Atago**, on a fait l'étalonnage pour deux solvants, de manière à donner, à la température de 20°C les indices suivants :

- 1,3330 pour l'eau distillée.
- 1,3611 pour l'éthanol.

Introduire quelques gouttes d'huile essentielle dans l'appareil et la lecture de l'indice de réfraction, se fait comme suit :

On règle le réfractomètre de manière à obtenir une moitié supérieure claire et une autre moitié inférieure sombre et ce au niveau du cadre.

###### **IV.1.3. Miscibilité à éthanol :**

###### **❖ Mode opératoire :**

On remplit la micro burette de 5 ml par une solution d'éthanolique 70%. Dans le tube à essais, introduire 1 ml d'huile essentielle. Puis on ajoute la solution éthanolique 70%, par fraction de 0,1 ml jusqu'à miscibilité complète, en agitant énergiquement après chaque addition.

Enfin, lorsque le mélange est parfaitement limpide, noter le volume de l'éthanol.

#### **IV.1.4. Pouvoir rotatoire :**

##### **❖ Mode opératoire :**

A l'aide d'un polarimètre de type : **SCHMDT HAENSCH 22955**. On place la cellule vide dans ce polarimètre, et on détermine le zéro de l'instrument. Lorsque l'H.E. à étudier en solution, puis remplit la cellule du solvant éthanol 95% avant de la mettre en place, en prenant soin d'éviter qu'il y ait de l'air dans le champ de vision. Lorsque la cellule pleine du solvant a atteint la température de la pièce.

On fait tourner l'analyseur dans un sens quelconque jusqu'à obtention d'une obscurité uniforme (plus sensible à l'œil que celle correspondant à l'éclairement uniforme). Puis on note la valeur indiquée par l'échelle.

On dépasse légèrement ce point en tournant dans le même sens puis on y revient en tournant dans le sens contraire. On répète l'opération jusqu'à ce que les résultats soient cohérents.

On calcule alors la moyenne des plusieurs couples de valeurs, ensuite on remplit la cellule avec l'H.E. à étudier. Lorsque la cellule en équilibre thermique avec la pièce, on détermine comme précédemment la position correspondant au minimum de transition lumineuse. Cependant, la différence entre les deux valeurs donne le pouvoir rotatoire  $\alpha$  du liquide continu dans la cellule.

Enfin, on mesure la distance parcourue par la lumière dans le milieu optiquement actif, et on note la température.

#### **IV.1.5. Point de congélation :**

##### **❖ Mode opératoire :**

Dans le tube à essais, introduire 5 ml de l'H.E. à analyser, puis placer le thermomètre et laisser refroidir dans un bain de glace.

Noter la température observer quand le premier cristaux apparaître. poursuivre la mesure jusqu'à ce que deux résultats consécutifs ne diffèrent pas plus de 0,2°C.

#### **IV.2. Caractéristiques chimiques :**

##### **IV.2.1. Indice d'acide (I.A) :**

##### **❖ Mode opératoire :**

On remplit la micro burette de 5 ml par une solution de potasse éthanolique 0,01N (95%). Dans un erlenmeyer de 25 ml on verse successivement :

➤ m g de huile essentielle.

- 5 ml d'éthanol 95%
- 5 gouttes de phénolphtaléine.

Doser par la solution titrée de solution de potasse éthanolique (EtOK), dans la micro burette jusqu'à l'obtention d'une coloration rose.

#### **IV.2.2. Indice de saponification (I.S) :**

##### **❖ Mode opératoire :**

Dans deux ballon de 100 ml, on place respectivement.

##### **Ballon N° I :**

Dans un ballon, on introduit 1g d'huile essentielle, préalablement pesée, ajouter 25 ml de la solution de potasse éthanolique 0,5M et des fragments de pierre ponce.

Adapter le réfrigérant et placer le ballon dans un chauffe ballon. Le chauffage dure près d'une heure à partir de l'ébullition.

Laisser refroidir, démonter le réfrigérant et ajouter 20 ml d'eau distillée plus 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine.

Finalement, on titre la solution obtenue par la solution d'acide chlorhydrique (0.5M) jusqu'à la disparition de la couleur rose.

##### **Ballon N° II :** (ballon témoin)

On réalise la même expérience mais sans présence d'huile essentielle, ce qui consiste à un essai a blanc.

## I. Chromatographie sur couche mince (CCM):

Dans cette partie de travail, on préparera trois plaques de verre. de CCM de différents huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L.

### ❖ Mode opératoire :

Nous avons introduit l'éluant toluène-acétate d'éthyle (95/5) dans la cuve chromatographique, à environ 0,5 cm du fond de la cuve. Nous avons fermé le récipient (la cuve doit être saturée de vapeur de solvant). Pour que la saturation et l'éluion soient plus rapides, on peut placer une bande de papier filtre contre les parois de la cuve chromatographique. D'autre par, l'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette environ 0,5  $\mu$ l, en un point situé à 1.5 cm de l'extrémité inférieure ; le diamètre de la tâche doit être d'environ 2 mm pour la disposition de plusieurs échantillons. Nous avons séché à l'aide d'un séchoir.

Nous avons placé la plaque dans la cuve en position verticale, puis refermé le récipient qui ne doit plus être déplacé (voir figure 40). Lorsque le front du solvant se trouve à environ 1 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, nous l'avons retirée et séchée à l'aide d'un séchoir.

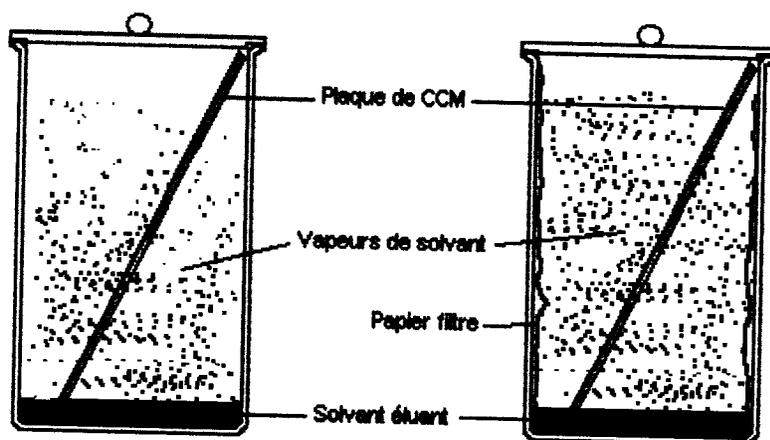


Figure 46 : Cuve de CCM

La révélation de la plaque ainsi développée, est faite en utilisant la lampe UV ( $\lambda = 254$  et 366 nm) et un révélateur chimique qui est la vanilline sulfurique à 1% (après pulvérisation du réactif, la plaque est placée dans l'étuve à 105°C pendant quelques minutes. Pour faire apparaître les taches). Les taches révélées sont cerclées au crayon de façon à pouvoir calculer leurs facteurs de rétention.

### ❖ Préparation du révélateur (la vanilline sulfurique 1 %) :

Nous avons dissout 1 g de vanilline dans 100 ml d'éthanol à 95% puis, nous avons ajouté en contrôlant la température par un bain de glace 2 ml d'acide sulfurique concentré.

### **I. Etude du pouvoir antimicrobien de *Ruta chalepensis* L. :**

Plusieurs travaux réalisés au département de biologie de l'Université de Tlemcen, étudient la résistance des antibiotiques de synthèse vis-à-vis des bactéries hospitalières. Dans ce chapitre, nous avons tenté de profiter de ce savoir-faire pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles, de tiges, de racines et de fruits de *Ruta chalepensis* L. (RCF1, RCF2, RCF3, RCT1, RCT2, RCT3, RCR1, RCR2, RCR3, RCG1, RCG2 et RCG3), et de deux huiles essentielles issues de la partie aérienne de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2005 de Beni Mester et Ouzidane (BA3, OA8). Cette activité est ensuite comparée avec celle de l'antibiotique et des antifongiques couramment employés. Plusieurs tests sont effectués sur différents microorganismes (bactéries, levures et moisissures).

#### **\* Les souches microbiennes testées :**

9 souches microbiennes ont été testées in vitro (4 bactéries, une levure et 4 champignons). Elles ont été isolées à partir de prélèvements d'origine hospitalière approvisionnant un laboratoire pharmaceutique.

#### **❖ Bactéries :**

**GRAM (-) :** *Escherichia coli* (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa)

**GRAM (+) :** *Staphylococcus aureus* (Sa), *Listeria monocytogens* (Lm).

❖ **Levures :** *Candida albicans* 444 (Ca).

❖ **Moisissures :** *Aspergillus flavus* (Af), *Aspergillus Niger* (An), *Alternaria* sp. (A.), *trichoderma* sp. (T.).

#### **I.1. Effet Antimicrobien des antibiotiques (ATB) et des antifongiques (ATF) :**

On a testé la sensibilité des souches retenues vis-à-vis des ATB de référence utilisés en thérapie. Il s'agit de la Gentamicine (Bactéries), l'Amphotéricine B (Levures) et l'Econazole (Moisissures).

**Tableau 35 :** Les antibiotiques (ATB) utilisés.

Groupe microbien	ATB	Sigle	Charge du disque
Bactéries	Gentamicine	GT	100 UI
Levures	Amphotéricine B	AmB	100 µg
Moisissures	Econazole	ECs	50 µg

Les antibiotiques (ATB) ont été choisis en fonction de ceux utilisés au laboratoire de microbiologie à l'hôpital de Tlemcen, et aussi en fonction de leur disponibilité citée dans le tableau 35 représenté ci-dessus.

## **I.2. Méthodes utilisées :**

- Pour les **Bactéries** la méthode utilisée est celle de la diffusion des ATB sur gélose ou méthode des disques, conçue par Chabbert (1973). Après la préparation des inoculums, et l'ensemencement de la gélose Muller-Hinton (MH) par inondation l'excès du liquide est aspiré et la surface de la gélose est laissée sécher 15 à 20 minutes à  $37\pm 1^\circ\text{C}$ . A l'aide d'un distributeur de disques, on place sur la surface de la gélose les différents disques d'ATB choisis. Les boîtes sont laissées durant 20 mn à la température ambiante pour permettre une bonne diffusion de l'ATB. Elles sont ensuite incubées à  $37\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 18 à 24 heures. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque, puis comparée à une échelle étalonnée fournie par l'institut Pasteur.

- Pour les **Levures et Moisissures**, on a utilisé la méthode décrite par Baspeyras, Créteil (1987). C'est la même technique de l'antibiogramme citée précédemment. Les ATF sont déposés sous forme de disques à la surface du milieu de culture. Ensuite, les boîtes sont incubées à  $30\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48 heures pour les levures et à  $25\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 10 à 12 heures pour les moisissures.

## **II. Etude du pouvoir antimicrobien des extraits et des huiles essentielles :**

### **II.1. Techniques d'étude du pouvoir antimicrobien :**

Les techniques utilisées sont celles de la diffusion sur gélose ou méthode des disques (En milieux solides).

Cette méthode se base sur la diffusion de l'extrait testé dans la gélose. Elle consiste à déposer à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé par la suspension de germes choisis, des disques de papier filtre imprégnés des extraits à tester.

#### **➤ Méthode utilisée :**

Après l'ensemencement du milieu gélosé par l'inoculum préalablement calibré, nous avons déposé à la surface des disques de papier filtre (de 6 mm de diamètre) imprégnés des extraits à raison de  $10\ \mu\text{l}$  pour les différents extraits. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm.

### **II.2. Détermination des intervalles des CMI par la méthode de contact direct :**

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'œil nu (Courvalin et Coll en 1985).

Cette technique est décrite par Beylier-Maurel (1976), elle consiste à disperser l'extrait à des concentrations variables dans le milieu gélosé avant sa solidification.

➤ **Méthode :**

**Préparation de la solution mère (SM) :**

A 9 ml d'eau distillée stérile, on ajoute aseptiquement 1ml de notre extrait de façon à ce que le solvant (miscible à l'eau), ne dépasse pas les 5% car, après des essais, on a pu prouver qu'à ce pourcentage le solvant n'agit pas sur la croissance des germes. On agite énergiquement pendant quelques minutes pour disperser l'extrait dans l'eau distillée.

Pour les huiles essentielles, **Remmal et Coll en 1993**, ont montré qu'une solution d'agar à 0.2 % permet d'obtenir une dispersion stable des huiles essentielles en milieu aqueux, comparable à celle obtenue avec le tween 80 (0.25%) et l'éthanol (0.2%), pratiquement aussi homogène que lors d'une solubilisation par l'éthanol absolu.

Alors, on prépare une solution d'agar à 0.2% stérilisée à 120 °C pendant 15 mn. A 9 ml de cette solution, on ajoute aseptiquement 1 ml d'huile essentielle, on agite énergiquement pour disperser l'huile essentielle dans la solution.

On obtient ainsi la solution mère (SM) à partir de laquelle on procédera à des dilutions successives allant de  $10^{-2}$  jusqu'à  $10^{-3}$ .

Dans des tubes contenant chacun 13.5 ml de milieu gélosé et encore en état de fusion, on ajoute aseptiquement 1.5 ml de la « SM » ou des diverses dilutions de façon à obtenir les concentrations finales suivantes en extrait :  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ . Les boîtes témoins sont préparées de la même manière que la méthode précédente. Après passage au vortex, on coule les suspensions dans des boîtes de pétri et on laisse refroidir.

Des souches jeunes sont ensuiteensemencées (en stries pour les bactéries et les levures et en spots pour les moisissures) et incubées (les températures et les temps d'incubation sont déjà cités), après on note le développement ou l'inhibition de chaque germe à diverses concentrations de l'extrait.

**Remarque :**

Les milieux de culture utilisés pour les différentes méthodes sont :

- Muller Hinton pour les bactéries.
- Sabouraud Dextrose Agar + chloramphénicol pour les levures.
- Sabouraud Dextrose Agar pour les moisissures.

**II.3. Préparation des inoculums :**

Pour les Bactéries : les souches conservées dans la gélose nutritive (GN) inclinée à 4°C sont revivifiées dans du bouillon nutritif et incubées à  $37\pm 1^\circ\text{C}$  pendant 18 à 24 h. 0.1ml

de cette culture est ajoutée à 10 ml de BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Pronadisa Hispanalab, S.A.).

Pour les Levures : les souches conservées dans la gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol à 4°C sont revivifiées dans du bouillon nutritif et incubées à  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 24 à 48 heures. 0,1ml de cette culture est ajouté à 10ml d'eau physiologique stérile.

Pour les Moisissures : l'inoculum se présente sous forme d'une suspension de spores dans de l'eau physiologique stérile à 0,1% de Tween 80 (Tataoui-Elaraki et Coll en 1992). Au cours des tests, l'inoculum employé est de l'ordre de  $10^6$  à  $10^7$   $\mu\text{Fc/ml}$ , dans le cas des bactéries et des levures et est de l'ordre de  $10^8$  à  $10^9$  spores/ml pour les moisissures.

#### **II.4. Tests antibactériens**

Les huiles essentielles ont été diluées dans une quantité minimale d'alcool éthylique à 95%, 1/10 v/v, à laquelle on ajoute une solution aqueuse à 1 % v/v de Tween 80®, en vue d'obtenir un mélange homogène. Celui-ci est incorporé dans la gélose en cours de refroidissement afin d'obtenir des dilutions de 50 à 500  $\mu\text{g/ml}$ . Le multiensemenseur de Steers permet des inoculations automatiques des boîtes de gélose nutritive de Columbia 3 Agar avec des suspensions de 105 germes/ml. Les durées et températures d'incubation ont été de 24 h à 37°C.

## **I. Extraction des métaux lourds :**

### **❖ Mode opératoire :**

Les différents organes de la plante (fruits, feuilles, tiges et racines), ont été séchés, séparés et broyés par un micro broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre.

A l'aide d'une balance analytique, on pèse 25 g de matière végétale, cette dernière est mise dans des capsules en porcelaine, placées dans un four tubulaire.

Les différents organes de la plante ont été calcinés à 700°C pendant 2 heures. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention de cendres friables de couleur blanche et que le poids devienne constant. A la sortie du four, les capsules en porcelaine sont placées dans un dessiccateur à 23°C.

Après refroidissement, on pèse les cendres pour chaque organe et on divise chaque masse de ce dernier en trois parties qui ont été utilisées pour extraire la totalité des métaux lourds par trois solutions acides (l'acide chlorhydrique concentré, l'acide nitrique, l'eau régale).

### **I.1. Mise en solution des métaux lourds l'acide chlorhydrique (HCl) :**

Une masse de 0.5 g de cendre a été introduite dans un erlenmeyer, à laquelle on ajoute 5ml de l'acide chlorhydrique concentré HCl (35%). Après avoir fermé l'erien, on chauffe à une température entre 40-60°C pendant 8 heures sous une agitation. Après refroidissement, une filtration est effectuée avec un rinçage à l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 25 ml.

### **I.2. Mise en solution des métaux lourds par l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) :**

Une masse de 0.5 g de cendre a été introduite dans un erlenmeyer, à laquelle on ajoute 5 ml de l'acide nitrique concentré HNO<sub>3</sub> (65%). Après avoir fermé l'erienmeyer, la réaction est abandonnée à température ambiante, pendant 16 heures sous agitation. Puis la réaction est apportée à 70°C dans un bain-marie et suivie d'une agitation pendant 8 heures. Après refroidissement, une filtration est effectuée avec un rinçage à l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 25 ml.

### **I.3. Mise en solution des métaux lourds par l'eau régale :**

Une masse de 1 g de cendre a été introduite dans un erlenmeyer où on réalise l'attaque par 10 ml d'eau régale (HNO<sub>3</sub>/HCl (1:3)). Après avoir fermé l'erienmeyer, on chauffe sur

plaque chauffante pendant 3 heures. Après refroidissement, une filtration est effectuée avec un rinçage à l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 25 ml.

## **II. Dosage des solutions :**

Nous avons soumis les solutions préparées des différentes parties de la plante étudiée aux analyses des métaux lourds (Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Zn) par spectromètre d'absorption atomique (SAA). Pour se faire, il est impératif de préparer des solutions étalons de concentrations connues.

### **II.1. Préparation des solutions étalons :**

#### **A. Cadmium (Cd) :**

Une solution étalon de 2 ppm est préparée en pesant exactement 0.54 mg de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 1 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Une troisième solution de 0.5 ppm est préparée par dilution de la précédente.

#### **B. Cobalt (Co) :**

Une solution étalon de 3.5 ppm est préparée en pesant exactement 1.41 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 2 ppm est préparée à partir de 57.1 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 1 ppm est préparée à partir de 28.5 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

#### **C. Cuivre (Cu) :**

Une solution étalon de 10 ppm est préparée en pesant exactement 2.68 mg de  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 5 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 2.5 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

**D. Fer (Fe) :**

Une solution étalon de 10 ppm est préparée en pesant exactement 7.00 mg de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 5 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 2.5 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

**E. Plomb (Pb) :**

Une solution étalon de 10 ppm est préparée en pesant exactement 1.57 mg de  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 5 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 2.5 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

**F. Zinc (Zn) :**

Une solution étalon de 3.2 ppm est préparée en pesant exactement 1.2 mg de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 0.8 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 0.2 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon de 0.8 ppm que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

**II.2. Calcul de la concentration des métaux :**

La teneur ou concentration des métaux dans la matière sèche de l'échantillon, est exprimée comme suit :

$$T(\text{ppm}) = \frac{(R \times D \times X \times V)}{100 \times M}$$

**R** : masse de cendre en grammes contenue dans 100 g de matière végétale sèche ;

**D** : facteur de dilution ( $D = 1$ ) ;

**X** : est la concentration de l'analyse en mg/ml, au niveau de la solution d'attaque;

**V** : volume en ml de la solution préparée ( $V = 25$  ml) ;

**M** : la masse en grammes de la prise d'essai (cendre).

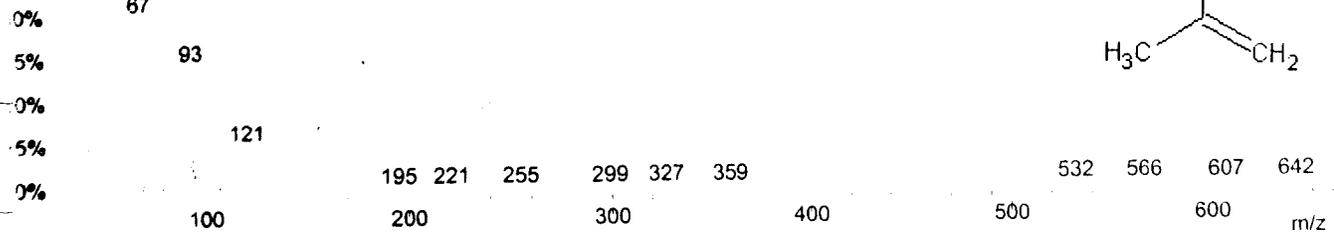
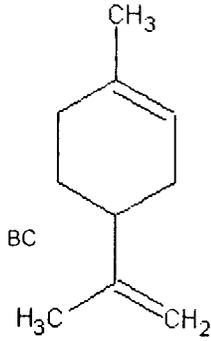
# Annexes

Best 3 Hits of Saturn Purity Search

Target Spectrum

Target  
BP 67 (4286=100%) TABTIHM2.SMS

3.734 min. Scans: 226-228 Chan: all Ion: NA RIC: 29454 BC



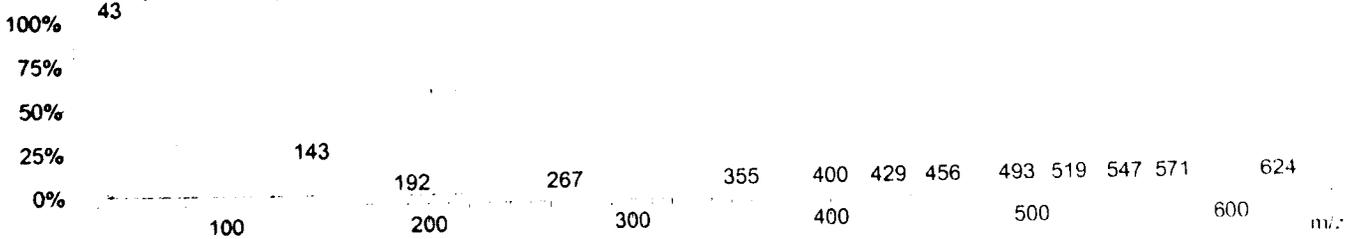
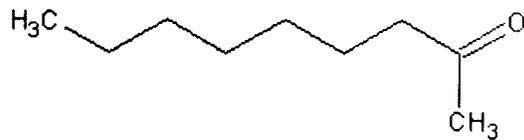
Chromatogramme 15 : Spectre de masse Limonène.

Best 3 Hits of Saturn Purity Search

Target Spectrum

Target  
BP 43 (32339=100%) TABTIHM2.SMS

4.385 min. Scans: 267-269 Chan: all Ion: NA RIC: 143405 BC



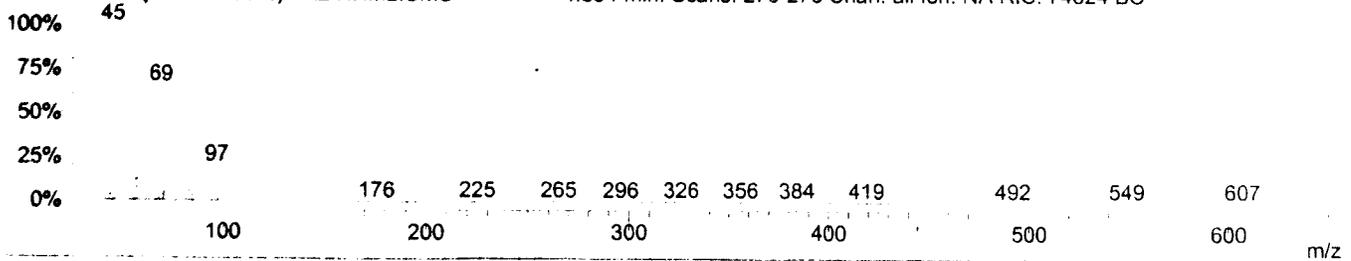
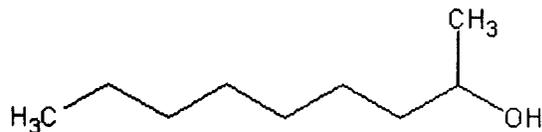
Chromatogramme 16 : Spectre de masse 2-nonanol.

Best 3 Hits of Saturn Purity Search

Target Spectrum

Target  
BP 45 (14518=100%) TABTIHM2.SMS

4.534 min. Scans: 276-278 Chan: all Ion: NA RIC: 74624 BC



Chromatogramme 17 : Spectre de masse 2-nonanol.

