



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mohamed Seddik Ben Yahia-Jijel

Faculté des Sciences Exactes et Informatique

**Département de chimie**

Spécialité : chimie organique

**Mémoire**

En vue de l'obtention du diplôme de Master en chimie

Thème :

Extraction des métabolites  
secondaires d'une plante de la  
Famille Rutaceae

Réalisé et Soutenu par : Boudaba Djihen & Benabbes Nouha

Soutenu le 03/07/2022 devant le jury :

**Président :** M<sup>me</sup> BOUDEBAZ Khadidja

MCB. Univ. De Jijel

**Examinatrice :** M<sup>me</sup> TABTI Noeul

MAA. Univ. De Jijel

**Encadreur :** Mr BOUJERDA Abdelhamid

MAA. Univ. De Jijel

Année Universitaire : 2021/2022

## *Remerciement*

Avant tout, nous remercions "Allah" le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et de nous avoir permis d'exploiter les moyens disponibles afin d'accomplir ce modeste travail. Nous tenons à remercier sincèrement notre encadreur Mr BOUDJERDA Abdelhamid de nous avoir suivies et dirigées tout au long de la réalisation de ce mémoire. Nous la remercions aussi pour la confiance qu'elle a placée en nous, pour sa disponibilité permanente, pour sa patience et ses conseils. Nous souhaitons également remercier les membres du jury, Mm **BOUDABAZ Khadidja**, à l'université Mohammad Seddik Benyahia (Jijel) qui nous a fait l'honneur d'accepter d'être président de jury. A Mm **TABTI Nawel** pour l'importance qu'il a accordée à notre travail en acceptant d'être membre de ce jury et pour le temps qu'il a consacré à l'examen de ce mémoire. Nos remerciements à l'ensemble de nos collègues de notre promo chimie organique du laboratoire. Nos remerciements les plus chaleureux vont à toute personne ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apporté leurs soutiens et encouragements durant la réalisation de ce travail.



## *Dédicace*

---

Avec l'aide de Dieu le tout puissant clément et miséricordieux, j'ai pu accomplir

Ce travail que je dédie :

*A mes chers parents*, qui m'ont soutenue dans mes études, et pour leurs

Encouragements et leur amour.

Sans lesquels je ne serais jamais arrivée là où j'en suis.

*A mes frères : Nadir, Borhane, Walide*

*A ma sœurs : Rihoba*

Pour leur affection. Que dieu leur accorde le succès, le bonheur et la santé et renforce notre union

*A tous les membres de ma famille, petits et grands*

**A mon binôme « Nouha »** d'être une amie si merveilleuse, je suis vraiment chanceux de

T'avoir à mes côtés.

**A tous mes amis et collègues** sans exception est surtout *Sara et Khaoula*

**A tous les gens** que j'aime, et m'aime

*Boudaba Djihen*

## *Dédicace*

---

Avec l'aide de Dieu le tout puissant clément et miséricordieux, j'ai pu accomplir

Ce travail que je dédie :

*A mes chers parents*, qui m'ont soutenue dans mes études, et pour leurs

Encouragements et leur amour.

Sans lesquels je ne serais jamais arrivée là où j'en suis.

*A mes frères : Ayoub & Mohammed said*

*A mes sœurs : Dounyazed, khadidja et Hala*

Pour leur affection. Que dieu leur accorde le succès, le bonheur et la santé et renforce notre union

*A tous les membres de ma famille, petits et grands*

**A mon binôme « Djihene »** d'être une amie si merveilleuse, je suis vraiment chanceux de

T'avoir à mes côtés.

**A tous mes amis et collègues** sans exception est surtout *Sara et Khaoula*

**A tous les gens** que j'aime, et m'aime

*Benabbes Nouha*

**Liste des abréviations :**

**%** : Pourcentage.

**°C** : Degré Celsius.

**µg** : Microgramme.

**µl** : Microlitre.

**AAR%** : pourcentage de l'activité antioxydante relative.

**ABTS** : Acide 2, 2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)Ⓣ

**ACOEt** : Acétate d'éthyle.

**ADN** : Acide Désoxyribose Nucléique.

**ADV** : adénovirus.

**AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium.

**AMPC** : Adénosine Mono phosphate cyclique.

**BHA** : Butyle hydroxy an isole.

**BHT** : Butyle-Hydroxy –Toluène.

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.

**CCM** : Chromatographie sur couche mince.

**CG-MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.

**CH<sub>3</sub>OH** : Méthanol.

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme.

**Cm** : Centimètre.

**CO Et** : Acétate d'éthyle.

**CPG** : Chromatographie en phase gazeuse.

**CPG-SM** : Chromatographie en Phase gazeuse -Spectromètre de masse.

**DMSO** : Dimethyl sulfoxyde.

**DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl. .

**E.N.S** : Ecole Normale Supérieure.

**EAG** : Equivalent d'acide gallique.

**EBr** : Extrait brut.

**éq. A<sub>asc</sub>** : équivalent de l'acide ascorbique.

**EQ** : Equivalent de quercetin

**ERO** : Espèce Réactive dérivée de l'Oxygène.

**F.C** : Fusarium culmorum.

**Fe<sup>2+</sup>** : Fer ferreux.

**Fe<sup>3+</sup>** : Fer ferrique.

**Fig** : Figure.

**FRAP** : Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter.

**G** : Gramme.

**GC /MS** : Gas Chromatography/Mass Spectroscopy.

**Gram<sup>-</sup>** : Gramme négative.

**Gram<sup>+</sup>** : Gramme positive.

**H.E** : Huile essentielle.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène.

**HCl** : Acide Chlorhydrique.

**HEs Rm** : les huiles essentielles du Ruta montana L.

**HRBC** : la stabilisation des membranes des globules rouges

**HSV** : herpès simplex virus.

**I %** : pourcentage d'inhibition

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%.

**Ir** : Indice de rétention.

**LBSM** : Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens

**M** : mètre.

**Me OH** : Méthanol.

**mg** : Milligramme.

**Mg** : Magnésium.

**Mg EAG/ g MS** : milligramme d'équivalents de l'acide gallique par gramme de matière sèche.

**mg/ml** : milligramme/millilitre.

**ml** : Millilitre.

**mm** : millimètre.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de sodium.

**NAD(P) H** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

**NADPH oxydase** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydase.

**n-BuOH** : n-Butanol.

**nm** : nanomètre.

**NO** : Monoxyde d'azote.

**NO<sub>2</sub>** : L'oxyde d'azote.

**O<sub>2</sub>** : Oxygène.

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : Ion superoxyde.

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Radical superoxyde.

**OH** : Radical hydroxyle.

**ONOO<sup>-</sup>** : Peroxynitrite.

**PAF** : Platelet Activating Factor.

**PDA** : Potato-dextrose-agar.

**Pn** : Penicillium.

**R. montana** : Ruta montana.

**R** : Rendement.

**SM** : Spectromètre de masse.

**SOD** : Superoxyde dismutase

**SPSS** : Statistical Package for the Social Sciences.

**TFT** : Teneur des Flavonoïdes Totaux.

**TPT** : Teneur des Polyphénols Totaux.

**UV** : Ultraviolet.

**Vit C** : vitamine C.

Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1</b> : Les espèces de genre <i>Ruta</i> .....   | 3  |
| <b>Figure 2</b> : Quelques structures chimiques des alcaloïdes .....   | 9  |
| <b>Figure 3</b> : Structure de la molécule isoprène .....  | 10 |
| <b>Figure 4</b> : Quelques structures des mono terpènes acycliques .....   | 10 |
| <b>Figure 5</b> : Quelques structures chimiques des mono terpènes cycliques .....                                | 11 |
| <b>Figure 6</b> : Quelques structures chimiques des mono terpènes bicycliques .....                              | 11 |
| <b>Figure 7</b> : La structure de phytol .....   | 11 |
| <b>Figure 8</b> : La structure de Rétinol .....  | 12 |
| <b>Figure 9</b> : (+)- $\beta$ -Eudesmol .....   | 12 |
| <b>Figure 10</b> : Structure de squalène .....   | 12 |
| <b>Figure 11</b> : Lanostérol .....  | 12 |
| <b>Figure 12</b> : $\beta$ -Carotène .....   | 13 |
| <b>Figure 13</b> : Sesquiterpènes acycliques .....   | 13 |
| <b>Figure 14</b> : Sesquiterpènes monocycliques .....  | 14 |
| <b>Figure 15</b> : Sesquiterpènes bicycliques et tricycliques .....  | 14 |
| <b>Figure 16</b> : Structures des caoutchoucs naturels .....   | 14 |
| <b>Figure 17</b> : La structure des flavonoïdes .....  | 15 |
| <b>Figure 18</b> : Structure des flavanes .....  | 15 |
| <b>Figure 19</b> : Structure des flavonols .....   | 15 |
| <b>Figure 20</b> : Structure des flavones .....  | 16 |
| <b>Figure 21</b> : Structures des flavonols .....  | 16 |
| <b>Figure 22</b> : Structures d'isoflavane .....   | 16 |
| <b>Figure 23</b> : Structure d'isoflavanol .....   | 16 |
| <b>Figure 24</b> : Structure d'isoflavone .....  | 17 |
| <b>Figure 25</b> : Structure d'isoflavon .....   | 17 |
| <b>Figure 26</b> : Structure des anthocyanidines .....   | 17 |
| <b>Figure 27</b> : Structures des chalcones .....  | 18 |
| <b>Figure 28</b> : Structure des Aurones .....   | 18 |
| <b>Figure 29</b> : Réaction du radical DPPH avec d'autres radicaux ( $\dot{R} = \dot{H}$ , radical alkyle) ..... | 23 |
| <b>Figure 30</b> : Formation du radical cation ABTS $\cdot^+$ à partir de l'ABTS .....                           | 23 |
| <b>Figure 31</b> : Schéma de la réaction de test FRAP .....  | 24 |
| <b>Figure 32</b> : Espèce <i>Rutagraveolens</i> .....  | 25 |
| <b>Figure 33</b> : Macération de la plante <i>Ruta graveolens</i> .....  | 25 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 34</b> : L'appareil de Rotavapeur .....   | 26 |
| <b>Figure 35</b> : La préparation des extraits .....  | 26 |
| <b>Figure 36</b> : Extraction par solvants .....  | 27 |
| <b>Figure 37</b> : Protocole de séparation des extraits .....   | 28 |
| <b>Figure 38</b> : Montage de hydro-distillation .....  | 29 |
| <b>Figure 39</b> : Le test chromatographique des phases obtenues. ....  | 31 |
| <b>Figure 40</b> : Test de mise en évidence des polyphénols des quatre extraits. ....   | 32 |
| <b>Figure 41</b> : Protocole expérimentale de dosage des polyphénols totaux.....  | 32 |
| <b>Figure 42</b> : Test de mise en évidence des flavonoïdes des quatre extraits. ....   | 33 |
| <b>Figure 43</b> : Protocole expérimentale de dosage des flavonoïdes totaux.....  | 33 |
| <b>Figure 44</b> : Test d'activité antioxydant par la réduction du radical DPPH <sup>•</sup> .....  | 35 |
| <b>Figure 45</b> : Teste d'activité antioxydant de cation radicalaire ABTS <sup>•+</sup> .....  | 36 |
| <b>Figure 46</b> : Teste d'activité antioxydant par la Réduction de fer .....   | 36 |
| <b>Figure 47</b> : Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse. ....  | 37 |
| <b>Figure 48</b> : Résultats de la CCM des deux phases .....  | 39 |
| <b>Figure 49</b> : Test de mise en évidence des flavonoïdes des quatre extraits . <b>Erreur ! Signet non défini.</b>  |    |
| <b>Figure 50</b> . Test de mise en évidence des alcaloïdes des trois extraits. ....   | 40 |
| <br>  |    |
| <b>Figure 52</b> : Test de mise en évidence des terpenoïdes des quatre extraits.....  | 40 |
| <b>Figure 53</b> : Test de mise en évidence des quinones des quatre extraits .....  | 41 |
| <b>Figure 54</b> . Test de mise en évidence des coumarines des quatre extraits .....  | 41 |
| <b>Figure 55</b> : Résultats de la CCM des deux phases .....  | 41 |
| <b>Figure 56</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux..  | 42 |
| <b>Figure 57</b> : Teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits de la plante.....  | 43 |
| <b>Figure 58</b> : Courbe d'étalonnage de la quercitrine pour le dosage des Flavonoïdes.....  | 44 |
| <b>Figure 59</b> : Teneurs en flavonoïde dans les différents extraits de la plante. ....  | 45 |
| <br>  |    |
| <b>Figure 60</b> : Représentation graphique des pourcentages d'inhibitions du radical DPPH <sup>•</sup> en fonction des concentrations des extraits et l'acide ascorbique. .... | 46 |
| <b>Figure 61</b> : Histogramme présente l'activité antioxydant exprimée en IC50 des extraits vis-à-vis le radical DPPH <sup>•</sup> . ....                                      | 47 |
| <b>Figure 62</b> : Présentation graphique des pourcentages d'inhibitions de l'ABTS <sup>•+</sup> en fonction des concentrations.....  | 49 |
| <b>Figure 63</b> : L'activité antioxydants exprimée en IC50 des extraits vis-à-vis radical ABTS <sup>•+</sup> ..  | 50 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figure 64</b> : L'acide ascorbique pour le test FRAP. ....   | 51 |
| <b>Figure 65</b> : l'activité antioxydant des quatre phases et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP. ....                   | 52 |
| <b>Figure 66</b> : Histogramme de Pouvoir réducteur des différents extraits. ....   | 53 |
| <b>Figure 67</b> : Les pourcentages d'inhibitions de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en fonction des concentrations. ....             | 54 |
| <b>Figure 68</b> : L'activité antioxydants exprimée en IC <sub>50</sub> des extraits vis-à-vis H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .... | 55 |
| <b>Figure69</b> : Cycle de distribution de familles de la composition chimique d'H.E de <i>Ruta graveolens</i> . ....               | 64 |
| <b>Figure70</b> : Cycle de distribution des composés de la composition chimique d'H.E de <i>Ruta graveolens</i> de Mila. ....       | 65 |
| <b>Figure71</b> : Cycle de distribution des composés de la composition chimique d'H.E de <i>Ruta graveolens</i> de texanna. ....    | 65 |
| <b>Figure72</b> : L'histogramme de Rendement des huiles essentielles. ....  | 66 |

**Liste des tableaux :**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tableau (1).</b> La masse, le rendement et couleurs des extraits de la plante (partie aérienne) étudiées. ....                                | 39 |
| <b>Tableau (3) :</b> Résultat de la quantification spectrophotométrique des polyphénols totaux .....   | 43 |
| <b>Tableau (4) :</b> Résultats de la quantification spectrophotométrique des Flavonoides totaux. ...   | 44 |
| <b>Tableau (5):</b> Activité antioxydante exprimée en IC50 des extraits de l'espèce <i>La Ruta graveolens</i> . ....                             | 47 |
| <b>Tableau(6):</b> Le pouvoir antioxydant d'ABTS <sup>•+</sup> (exprimé par IC50 (en mg /ml)) de référence standard et des extraits testés. .... | 50 |
| <b>Tableau(7) :</b> Pouvoir Réducteur des différents extraits de l'espèce <i>La Ruta graveolens</i> . ....                                       | 53 |
| <b>Tableau(8) :</b> Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Ruta graveolens</i> . ....   | 56 |
| <b>Tableau (9) :</b> Représente les familles des composés identifiés de <i>Ruta graveolens</i> et leurs proportions : .....                      | 64 |

## **Table des matières**

### **Remerciement**

### **Dédicace**

### **Abréviations**

### **Liste des figures**

### **Liste des tableaux**

### **Table des matières**

|   |   |
|---|---|
| Introduction Générale.....  | 1 |
| I.1. Présentation générale du Rutacées :.....                                       | 3 |
| I.2. Espèces du genre <i>Ruta</i> : .....   | 3 |
| I.3. Présentation de l'espèce <i>Ruta graveolens</i> :.....                         | 3 |
| I.3.1. Systématique de la plante <i>Ruta graveolens</i> : .....                     | 4 |
| I.3.2. Utilisation traditionnelle de la plante <i>Ruta graveolens</i> :.....        | 4 |
| I.3.3. Utilisation populaire de la plante <i>Ruta graveolens</i> en Algérie : ..... | 4 |
| I.3.4. Composition chimique de <i>Ruta graveolens</i> : .....                       | 5 |
| II.1. Définition :.....   | 6 |
| II.2. Classifications des métabolites secondaires : .....                           | 6 |
| II.3. Huiles essentielles : .....   | 6 |
| II.3.1. Définition :.....   | 7 |
| II.3.2. Localisation des huiles essentielles dans la plante : .....                 | 7 |
| II.3.3. Domaines d'utilisation :.....   | 7 |
| II.3.4. Propriétés physique-chimiques :.....  | 8 |
| II.3.5. Composition chimique des huiles essentielles : .....                        | 8 |
| II.3.6. Toxicité des huiles essentielles :.....                                     | 8 |
| II.3.7. Conservation des huiles essentielles :.....                                 | 8 |
| II.4. Principales structures chimiques des métabolites secondaires :.....           | 8 |
| II.4.1. Alcaloïdes :.....   | 9 |
| II.4.1.1. Définition et structure :.....  | 9 |
| II.4.1.2. Rôle des alcaloïdes : .....   | 9 |

---

|  |    |
|--|----|
| II.4.1.3. Classification :   | 9  |
| II.4.2. Terpenoides :  | 10 |
| II.4.2.1. Définition et structure :  | 10 |
| II.4.2.2. Classification :   | 10 |
| II.4.4. Rôle des métabolites secondaires :   | 18 |
| II.5. Méthodes d'extraction :  | 19 |
| II.5.1. Méthodes classiques :  | 19 |
| II.5.2. Méthodes alternatives :  | 19 |
| II.6. Méthodes de séparation et purification   | 20 |
| II.6.1. Chromatographie :  | 20 |
| II.6.2. Analyse chromatographique de la composition chimique des huiles essentielles : | 20 |
| <br>   |    |
| III.1. Stress oxydant :  | 21 |
| III.2. Radicaux libres :   | 21 |
| III.3. Antioxydants :  | 21 |
| III.4. Utilisations des antioxydants :   | 22 |
| III.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :                              | 22 |
| III.5.1. Test de piégeage par le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :        | 22 |
| III.5.2. Test de piégeage par le cation radicalaire ABTS <sup>+</sup> :                | 23 |
| III.5.3. Réduction du Fer : FRAP   | 24 |
| III.5.4. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) :           | 24 |
| <br>   |    |
| IV. Matériel et Méthodes   | 25 |
| IV.1. Récolte de la matière végétale :   | 25 |
| IV.2. Extraction solide-liquide :  | 25 |
| IV.3. Préparation des extraits :   | 26 |
| IV. 3.1. Calcul du rendement des extraits :  | 27 |
| IV.4. Procédé d'extraction des huiles essentielle :                                    | 29 |
| IV.4.1. Calcul du rendement des huiles essentielles :                                  | 29 |
| IV.5. Analyse des extraits   | 29 |
| IV.5.1. Analyse qualitative  | 29 |
| IV.5.1.1. Screening phytochimique :  | 29 |
| IV.5.1.2. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM) :            | 31 |
| IV.5.2. Analyse quantitative   | 31 |
| IV.5.2.1. Dosage des polyphénols totaux :  | 31 |

|   |    |
|---|----|
| IV.5.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux :.....  | 33 |
| IV.6. Evaluation des activités biologiques :.....   | 34 |
| IV.6.1. Activité antioxydante :.....  | 34 |
| IV.6.1.1. Test de piégeage par le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH <sup>•</sup> ) :.....                       | 34 |
| IV.6.1.2. Test de piégeage par le cation radicalaire ABTS <sup>•+</sup> :.....  | 35 |
| IV.6.1.3. Réduction du Fer : FRAP.....  | 36 |
| IV.6.1.4. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) :.....  | 37 |
| IV.7. Analyse CG/MS des huiles essentielles :.....  | 37 |
| <br>  |    |
| V.1. Extraction liquide-liquide :.....  | 39 |
| V.1.1. Le rendement des trois phases :.....   | 39 |
| V.2. Analyse des extraits.....  | 40 |
| V.2.1. Analyse qualitative.....   | 40 |
| V.2.1.1. Screening phytochimique :.....   | 40 |
| V.2.1.2 Résultats de la chromatographie sur une couche mince de l'extrait CHCl <sub>3</sub> et d'ACOEt<br>.....           | 41 |
| V.2.2. Analyse quantitative des extraits :.....   | 42 |
| V.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux :.....   | 42 |
| V.2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux :.....   | 43 |
| V.3. Les activités biologiques :.....   | 45 |
| V.3.1. Activités antioxydantes :.....   | 45 |
| V.3.1.1. Test de piégeage du radical DPPH <sup>•</sup> :.....   | 45 |
| V.3.1.2. Test de piégeage par le cation radicalaire ABTS <sup>•+</sup> :.....   | 48 |
| V.3.1.3. Réduction du Fer: FRAP.....  | 51 |
| V.3.1.4. Piégeage du peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :.....  | 54 |
| V.4. Les huiles essentielles :.....   | 55 |
| V.4.1. Evaluation des composants chimiques des huiles essentielles de l'espèce <i>Ruta graveolens</i><br>par CG-MS :..... | 55 |
| V.3.2. Composition chimique de l'huile essentielle :.....   | 64 |
| V.3.2.2. Rendement des huiles essentielles :.....   | 66 |
| Conclusion et perspective.....  | 67 |
| liste des références :.....   | 69 |

---

---

# *Introduction Générale*

---

---

## **Introduction Générale**

Pendant longtemps, les plantes médicinales ont joué un rôle décisif dans la protection de la santé humaine et de la survie humaine. Ils sont un patrimoine sacré et précieux, une réponse de choix pour apporter au corps de manière naturelle les substances nécessaires au maintien de l'équilibre de la vie [1]. Les plantes médicinales sont une ressource précieuse pour la plupart des populations rurales et urbaines en Afrique et sont le principal moyen d'auto-guérison personnelle. Malgré les progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est répandu dans certains pays africains [2].

L'Algérie, par la richesse et la diversité de sa flore, constitue un véritable répertoire phylogénétique d'environ 4000 espèces et sous-espèces des plantes vasculaires. Cependant, à ce jour, la flore médicinale en Algérie est encore méconnue, car il existe plusieurs milliers d'espèces des plantes et seulement 146 sont considérées comme médicinales [3]. Par conséquent, les recherches sur la médecine traditionnelle et la phytothérapie sont particulièrement intéressantes, car il existe très peu de travaux de recherche à ce sujet, notamment sur l'utilisation des espèces spontanées en médecine traditionnelle. L'accent est mis sur les utilisateurs, tandis que la véritable flore de la terre est ignorée [4]. *Ruta graveolens* (Rutaceae) sont devenues l'une des nombreuses substances photochimiques et pharmacologiques (activité anticancéreuse, antibactérienne, antioxydants, ostrogénique et progestative, cytotoxicité) [5].

Le but de notre travail consiste à extraire des huiles essentielle de l'espèce *Ruta graveolens* ainsi que permet la séparation de plusieurs types de produits La plupart entre eux sont des métabolites secondaires comme : di terpènes, des flavonoïdes et des polyphénols, Notre travail est réparti en deux parties :

La première partie propose une mise au point bibliographique. Elle est divisée en trois chapitres :

- ✓ Chapitre 1 : Généralités sur la plante
- ✓ Chapitre2 : Les métabolites secondaires et les méthodes d'extraction.
- ✓ Chapitre3 : Activité biologique.

Dans la seconde partie (partie expérimentale), nous avons décrit en détail la matière végétale, puis la séparation des métabolites secondaires, et en fin l'analyse de la capacité anti oxydante de *Ruta graveolens*.

Les résultats obtenus sont ensuite amplement discutés. Le manuscrite est achevée par une conclusion générale.

---

---

*Chapitre 1 :*

*Généralités sur la plante*

---

---

### I.1. Présentation générale du Rutacées :

La famille des Rutacées est une famille de plante qui comprend environ 900 espèces réparties en 150 genres distribués dans les régions tropicales et tempérées de l'hémisphère sud. Ce sont des arbres, des arbustes, parfois des vignes ligneuses ou herbe qui ont souvent des épines sur leurs troncs qui produisent la plupart des huiles essentielles libèrent des fortes odeurs agréables et souvent retrouvées [6].

### I.2. Espèces du genre *Ruta* :

Le genre *Ruta* compte quatre espèces en Algérie : *Ruta montana* (Clus) L, *Ruta chlepeensis* L, *Ruta angustifolia* (pers) P. et *Ruta latifolia* (Salib) Lindb. Les espèces sont différentes l'une des autres selon la forme des feuilles, les grappes de fruits, les bractées et les sépales. Les espèces les plus connues (*Ruta*) sont très proches par leur forme, leur composition et leurs propriétés pharmacologiques [10]. Les trois espèces les plus répandues sont la *Ruta chlepeensis* L., la *Ruta Graveolens* L. et la *Ruta montana* L. qui sont morphologiquement indiscernables et utilisées de manière interchangeable dans l'antiquité [9].



*Rutachlepeensis* L



*Rutagraveolens*



*Ruta Montana*

**Figure 1 :** Les espèces de genre *Ruta*

### I.3. Présentation de l'espèce *Ruta graveolens* :

*Ruta graveolens* vient du latin "gravis" qui signifie fort et du verbe "olere" qui signifie sentir à une odeur forte et désagréable, également connue sous le nom de Rue officinale, Rue-puante, Rue fétide, Rue des jardins, Herbe à la belle-fille, Rue des murailles et également Péganion. Cette espèce est souvent appelée Fidjel [11].

*Ruta graveolens* ou Rue fétide est une plante de la famille du Rutacée, qui exhale une forte odeur et un goût âcre et amer, dus à son huile volatile. C'est un sous-arbrisseau de 0,5 à 1 m de haut, très ramifié et ligneux à la base dure, ferme, rameuse et verdâtre. Elle porte des

feuilles découpées en segments oblongs, pétiolées, alternées et persistantes de couleur vert glauque. Les fleurs sont terminales petites de couleur jaune. Elles sont distribuées en cymes avec la fleur terminale pentamère et les autres fleurs tétramères qui apparaissent entre la période s'étalant entre mai et août. Les fruits sont des follicules à graines noires [8].

La Rue fétide est une espèce méditerranéenne, relativement connue dans toute l'Algérie septentrionale, au nord-est de l'Afrique, au sud de l'Europe et au sud-ouest de l'Asie, cette plante fréquente les lieux stériles des provinces méridionales, les endroits secs et ensoleillés, les pentes rocheuses, et les prairies sèches. Elle est aussi cultivée dans les jardins [7].

### I.3.1. Systématique de la plante *Ruta graveolens* :

La position systématique de *Ruta graveolens* est la suivante:

- Règne : Plantae.
- Sous règne : Viridiplantae (plantes vasculaires).
- Super division : Spermatophyta (plantes à graine).
- Division : Magnoliophyta (plantes à fleurs).
- Sous division : Angiosperma.
- Classe : Equisetopsida.
- Sous classe : Magnoliidae.
- Ordre : Sapindales.
- Famille : Rutaceae.
- Genre : *Ruta*.
- Espèce: *Rutagraveolens*.
- Nom vernaculaire : «اورمة» [12].

### I.3.2. Utilisation traditionnelle de la plante *Ruta graveolens* :

Différentes variétés de *Ruta graveolens* (Rue) en Afrique et sur d'autres continents entrent dans la composition de plusieurs préparations médicinales utilisées en médecine traditionnelle. Souvent les différentes parties de la plante sont utilisées comme abortifs, laxatifs, antirhumatismaux, antispasmodiques, antiparasitaires et antalgiques [13].

### I.3.3. Utilisation populaire de la plante *Ruta graveolens* en Algérie :

L'espèce *Ruta graveolens* est une espèce très utilisée en Algérie à des fins diverses :

- ❖ Aborder les troubles menstruels, les douleurs et les crampes.

- ❖ Traitement des diverses infections, notamment cutanées.
- ❖ Utilisée pour ouvrir l'appétit.
- ❖ Aborder les douleurs et l'inflammation des amygdales et de la congestion et générer de l'urine et débarrassent le corps de l'excès de liquide.
- ❖ Résister à la fièvre.
- ❖ L'extrait de la Rue en huile essentielle est utilisé en parfumerie[14].

#### **I.3.4. Composition chimique de *Ruta graveolens* :**

*Ruta graveolens* renferme de nombreux composés appartenant à différentes classes chimiques: alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes et une huile essentielle. Les chercheurs ont été identifiés dans *Rutagraveolens L.* plus de 100 composés. [15].

---

---

*Chapitre 2 :*

*Métabolites secondaires et leurs*

*méthodes d'extraction*

---

---

### II.1. Définition :

Les plantes produisent un grand nombre des composés pour lequel on ne sait pas toujours le rôle qu'ils jouent exactement pour la plante. Ces composés ne sont pas directement synthétisés lors de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures, on les appelle donc des métabolites secondaires. Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes. Ils représentent une variété très large des composés organiques sans fonctionner directement dans la croissance et le développement des plantes [16].

Les métabolites secondaires sont des composés phytochimique non directement impliqués dans les processus vitaux de bases (croissance, la division cellulaire, la respiration, la photosynthèse, reproduction). Certains des principaux rôles pour la plante sont :

### II.2. Classifications des métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires sont composés de trois principales catégories qui sont les terpènes, les composés phénoliques et les alcaloïdes (ou composés azotés) [17].

Ils peuvent être divisés aussi en deux catégories :

- **Les substances non volatiles:** Alcaloïdes, Anthocyanes, Polyphénols, Flavonoïdes, Tannins. Connus pour leurs activités pharmacologiques ou leurs propriétés pigmentaires.
- **Les substances volatiles :** Terpènes et composés aromatiques, qui constituent les huiles essentielles utilisées en parfumerie, aromathérapie [18].

### II.3. Huiles essentielles :

Beaucoup des plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires. Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles. Les huiles essentielles sont des produits naturels qui développent une revitalisation intense de l'organisme. Ces molécules de grand intérêt médical, n'auraient jamais pu être découvertes sans la médecine traditionnelle. Beaucoup des travaux sont réalisés dans ce sens, du fait de l'importance incontestable des huiles essentielles dans divers secteurs économiques, comme exemple l'industrie de parfumerie et de cosmétique, l'industrie alimentaire, l'industrie pharmaceutique et plus particulièrement la branche de l'aromathérapie qui utilise leurs propriétés bactéricides et fongicides [19].

### II.3.1. Définition :

Une huile essentielle peut être définie comme un ensemble des molécules pour un chimiste, un arôme pour un parfumeur ou encore la quintessence ou l'esprit d'une végétale pour un alchimiste. Mais dans la réalité, une huile essentielle est l'ensemble de tout cela car il s'agit d'un produit parfumé et volatil, composé des molécules secrétées par certaines plantes qui lui confèrent un parfum spécifique. Le terme volatil est expliqué par le fait que les huiles essentielles s'évaporent très rapidement [20].

### II.3.2. Localisation des huiles essentielles dans la plante :

Les huiles essentielles sont présentées dans toutes les parties vivantes des plantes et se forment dans le cytoplasme de certaines cellules végétales spécialisées. Ils peuvent être stockés dans diverses structures végétales telles que les poils sécrétoires, les cellules épidermiques, les cellules sécrétoires internes, les poches sécrétoires et les canaux sécrétoires. On peut alors dire que toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir des huiles essentielles :

- Fleurs : (orange, rose, lavande).
- Organes : (menthe, thym, sauge).
- Organes souterrains racines(vétiver)[21].

### II.3.3. Domaines d'utilisation :

- **Phytothérapie** : Les huiles essentielles sont largement utilisées pour soigner certains maux internes et externes (infection bactérienne ou virale, maladie humorale ou neurologique). En dentisterie : Les huiles essentielles ont un effet sur la désinfection de la pulpe, traitement et prévention des caries dentaires, *Listerine* a un fort effet bactéricide sur les micro-organismes salive et plaque dentaire. Les huiles essentielles de thym et de romaine ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête et les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires. Des études récentes montrent que le géraniol a également des effets sur les cellules cancéreuses du côlon activité anti-inflammatoire.
- **Parfumerie et cosmétologie** : L'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces produits cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable.
- **Industrie alimentaire** : On cherche toujours à obtenir des produits largement conservés et pour cela on fait introduire les HE de bonne qualité organoleptique grâce à leurs

activités antibactériennes. Les plantes aromatiques et leurs HE sont utilisés dans la conservation des denrées alimentaires [22].

#### **II.3.4. Propriétés physique-chimiques :**

Les huiles essentielles sont généralement liquides à température ambiante. Ils sont volatils à haute température. Odeur aromatique. Rarement coloré à l'état frais. Ils sont généralement moins denses que l'eau, sauf pour la cannelle et des lilas. Ils sont volatils et facilement entraînés par la vapeur d'eau. Ils sont peu solubles dans l'eau. Soluble dans l'alcool, l'éther et la plupart des solvants organiques[23].

#### **II.3.5. Composition chimique des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles sont formées des mélanges complexes des composants formant des solutions homogènes, Les principaux constituants des huiles essentielles appartiennent de manière quasi exclusive à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des trépénoïdes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phényle-propane [24].

#### **II.3.6. Toxicité des huiles essentielles :**

Les substances naturelles peuvent être nocives au même titre que certaines substances synthétiques qui sont des produits qui ne peuvent être utilisés sans risque. Les HE sont des molécules actives qui peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques, ainsi que des effets secondaires graves notamment des hypers sensibilisants [25].

#### **II.3.7. Conservation des huiles essentielles :**

La conservation des huiles essentielles nécessite certaines précautions indispensables car ses molécules constitutives sont instables et sujettes à des décompositions. Mieux vaut les conserver à basse température dans des flacons propres et secs en verre brun aluminium, hermétiquement recouverts pour les protéger de l'air et de la lumière [26].

#### **II.4. Principales structures chimiques des métabolites secondaires :**

Les composés naturels sont illustrés en thérapeutique et dépassent actuellement 100000 substances identifiés [27].

### II.4.1. Alcaloïdes :

#### II.4.1.1. Définition et structure :

Un alcaloïde est un composé organique hétérocyclique d'origine naturelle azoté plus ou moins basique. Les alcaloïdes sont rattachés aux quinoléines, aux quinazolines, aux furoquinoléines et aux dérivés d'acridone [28].

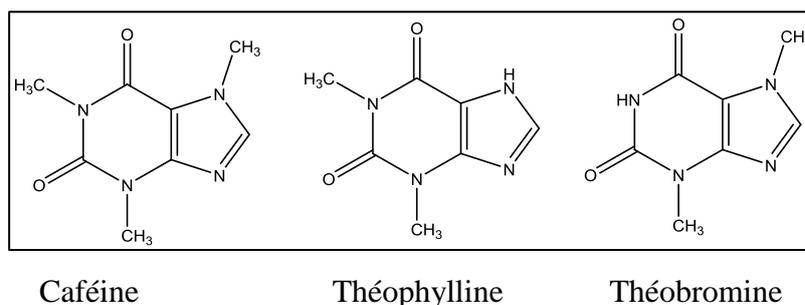


Figure 2 : Quelques structures chimiques des alcaloïdes [28].

#### II.4.1.2. Rôle des alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont utilisés comme :

- Le principal analgésique (morphine).
- Antipaludique (quinine).
- Combat l'excès d'acide urique (colchicine).
- Substances paralysantes (curare, caféine).
- Anticancéreux (vinblastine, vincristine) [29].

#### II.4.1.3. Classification :

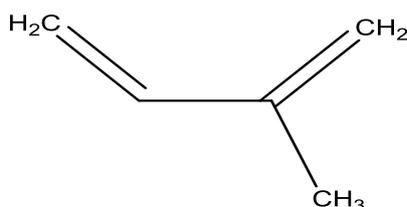
On peut les subdiviser en trois classes: Alcaloïdes vrais, proto alcaloïdes et pseudo alcaloïdes. :

- **Alcaloïdes vrais** : ils se caractérisent par une importante cytotoxicité qui expose une vaste activité physiologique, la plupart sont des bases stables. Elle comporte un ou plusieurs atomes d'azotes dans le cycle.
- **Proto alcaloïdes** : Ce sont des amines simples comme les acides aminés et d'autres alcaloïdes comme Mescaline et Ephédrine.
- **Pseudo alcaloïdes** : Regroupent les composés azotés, non dérivés des acides aminés ; l'incorporation de l'azote dans la structure se fait en phase finale ; comme la caféine [29].

## II.4.2. Terpenoïdes :

### II.4.2.1. Définition et structure :

Ils représentent le groupe le plus diversifié des métabolites secondaires, plus de 15000 composés différents sont décrits dans la littérature. Ils dérivent d'une structure de base à cinq carbones ( $C_5H_8$ ) [29].



Figures 3 : Structure de la molécule isoprène [29].

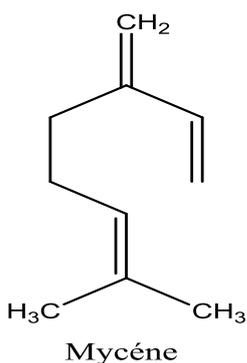
### II.4.2.2. Classification :

Les terpenoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires (avec les flavonoïdes et les alcaloïdes). Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base isoprène: mono terpènes ( $C_{10}$ ), sesquiterpènes ( $C_{15}$ ), di terpènes ( $C_{20}$ ), Tri terpènes ( $C_{30}$ ), tétraterpènes ( $C_{40}$ ) et poly terpènes ( $C_{40}$ ) [30].

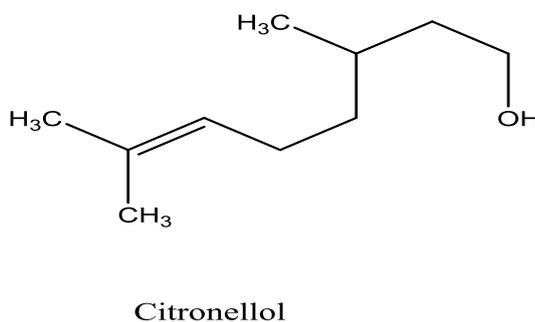
#### a) Mono terpènes :

##### ▪ Mono terpène acyclique :

Hydrocarboné



Alcoolique



Aldéhydique

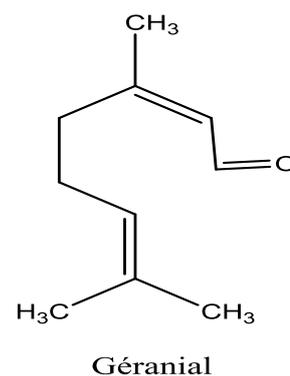
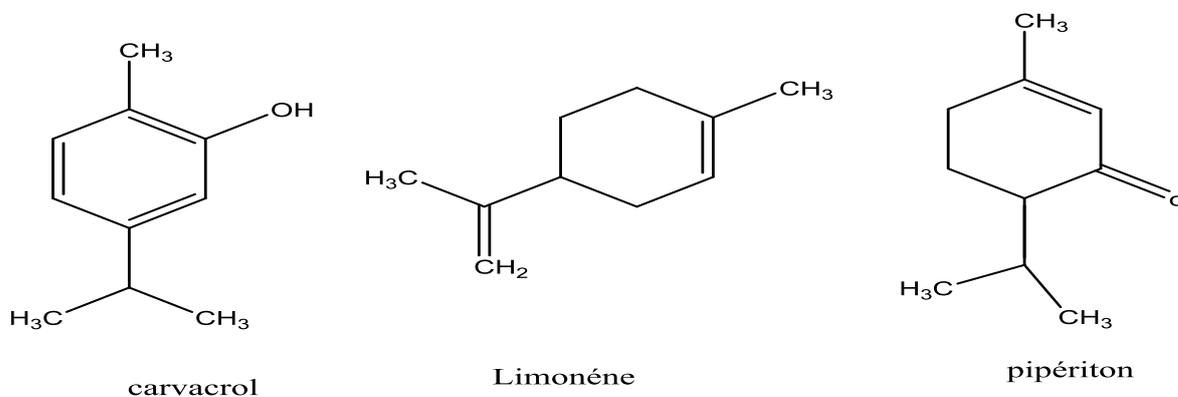


Figure 4 : Quelques structures des mono terpènes acycliques [30].

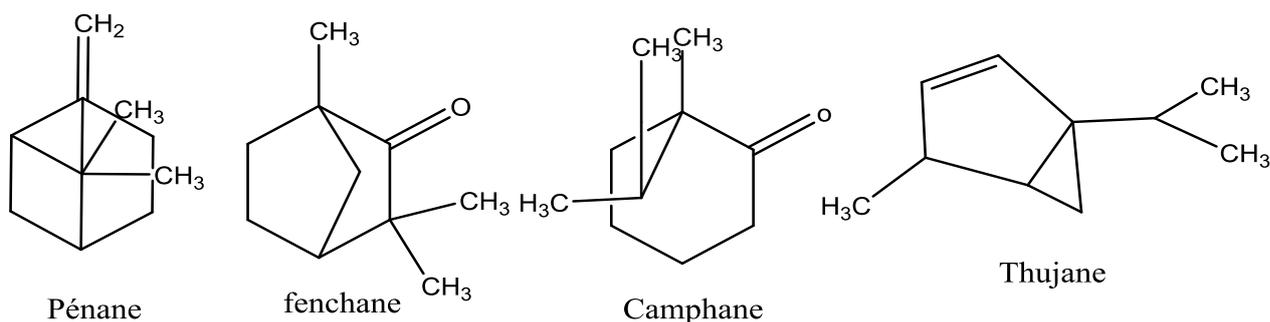
▪ **Mono terpène cyclique :**

Ce sont des composés à 10 carbones (mono terpènes = deux isoprènes), souvent volatils, aromatique et biologiquement actifs.



**Figure 5 :** Quelques structures chimiques des mono terpènes cycliques [30].

▪ **Mono terpène bicyclique :**

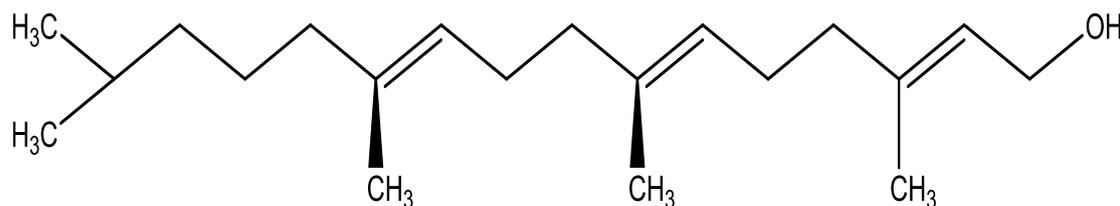


**Figure 6 :** Quelques structures chimiques des mono terpènes bicycliques [30].

b) **Di terpène :**

Ce sont des substances d'origine organique en C<sub>20</sub>. Ils sont constitués de trois unités d'isoprène. On distingue les di terpènes acyclique, monocyclique et bicyclique [31].

▪ **Di terpènes acyclique :**



**Figure 7 :** La structure de dephytole [31].

▪ Di terpènes monocycliques :

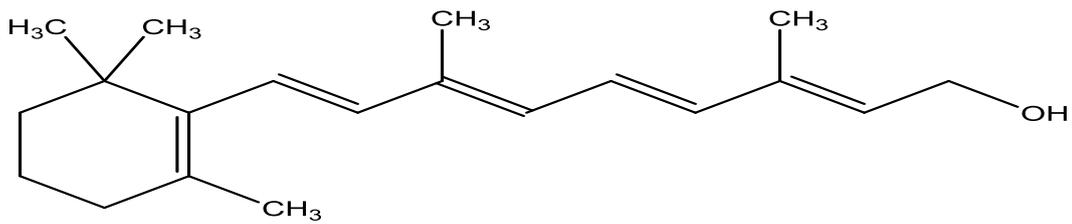


Figure 8 :La structure de Rétinol [31].

▪ Di terpènes bi cyclique :

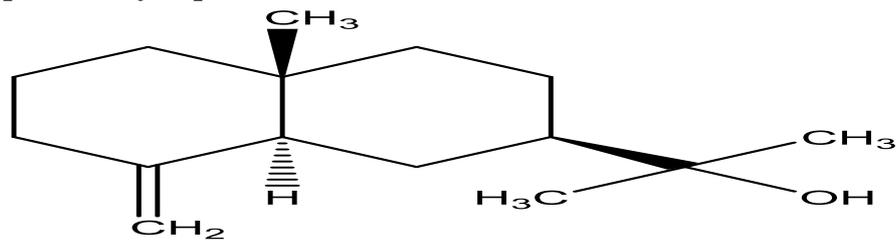


Figure 9 :(+)-β- Eudes mol[31].

c) Tri-terpène :

Les tri-terpènes sont des composés en  $C_{30}H_{56}$  (6 unités isoprène)[32].

▪ Tri-terpène a cycliques :

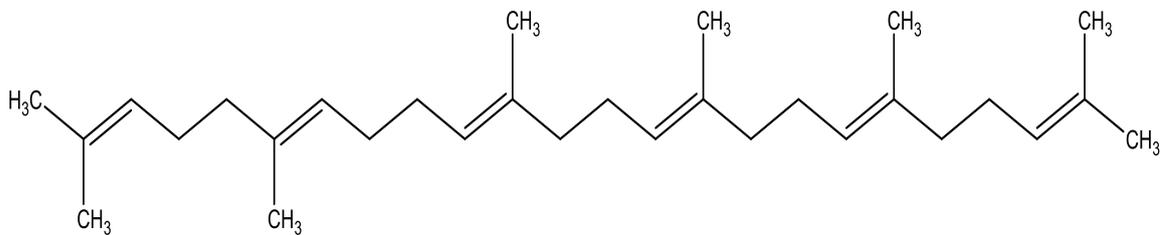


Figure 10 :Structure de squaléne[32].

▪ Tri terpène cyclique :

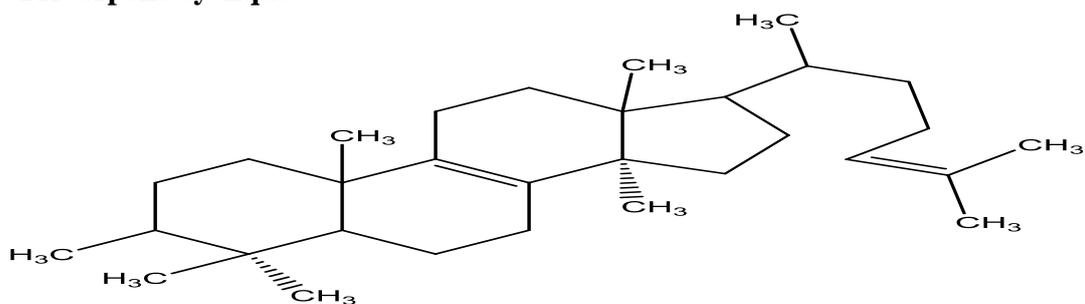


Figure 11 : Lan stérol [32].



▪ Sesquiterpènes monocycliques :

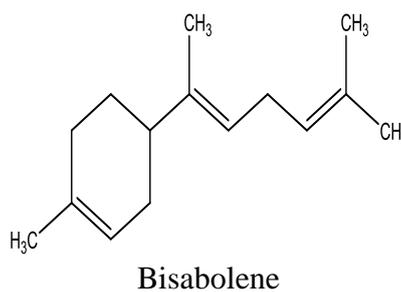
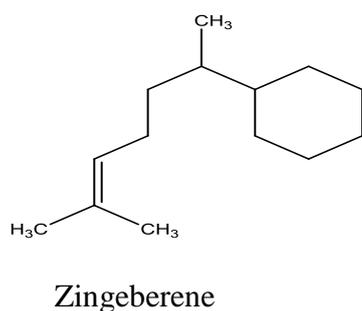


Figure 14 : sesquiterpènes monocyclique[33].

▪ Sesquiterpènes bi cycliques et tricyclique :

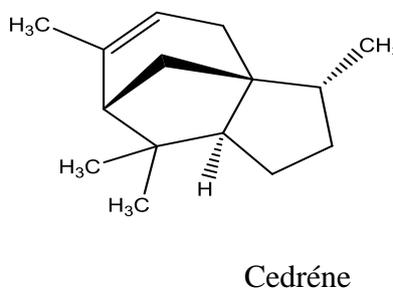
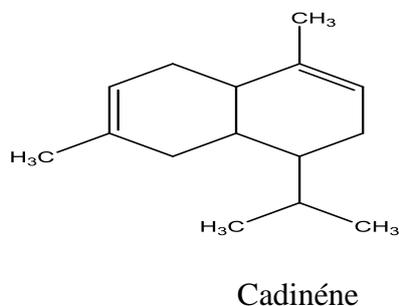
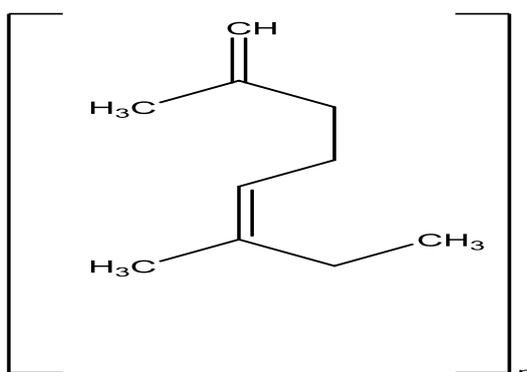


Figure 15 :Sesquiterpènes bi cyclique et tricyclique[33].

f) poly terpène :

Ce sont des polymères ou plusieurs unités isoprène sont jointes le caoutchouc naturel est le meilleurs exemple connu dès cette catégorie [34].

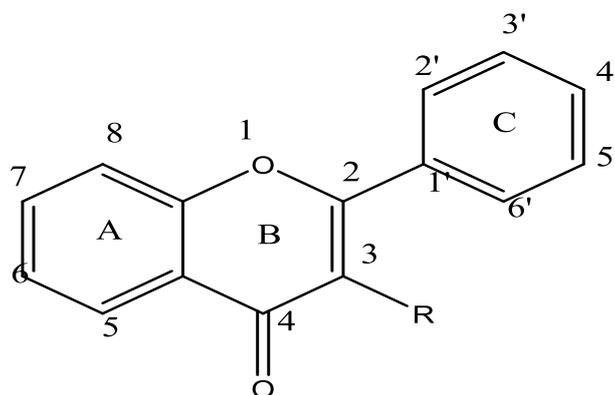


Figures 16 : Structures des caoutchoucs naturels[34].

### II.4.3. Flavonoïdes :

#### II.4.3.1. Définition :

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, par conséquent il possède tous un même squelette de base a quinze atomes de carbone (C-15) constitué de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle central "C" (Figure 19) [35]. La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle "C" c'est-à-dire la présence de double liaison C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxoigure [35].



Figures 17 : La structure des flavonoïdes[35].

#### II.4.3.2. Classification :

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon la position de connexion du cycle B à l'hétérocycle en C2, C3 ou C4[35].

- Dans la position(2), les flavonoïdes est appelé flavane.

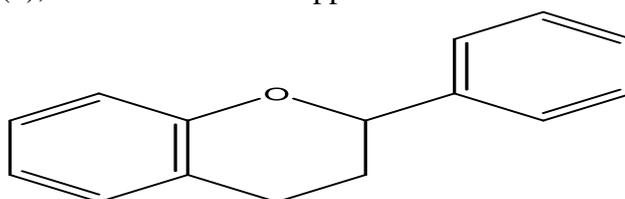


Figure 18 : structure des flavanes[35].

- Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle, le flavonoïde est appelé flavanone[35].

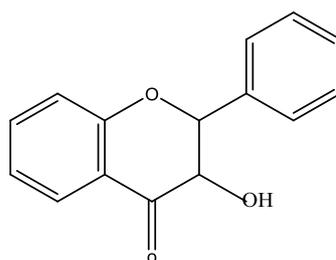


Figure 19 : Structure des flavonons[35].

- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé flavone[35].

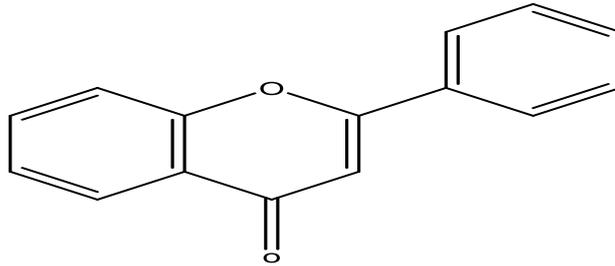


Figure 20 : Structure des flavones[35].

- Si ce dernier est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de flavonol.

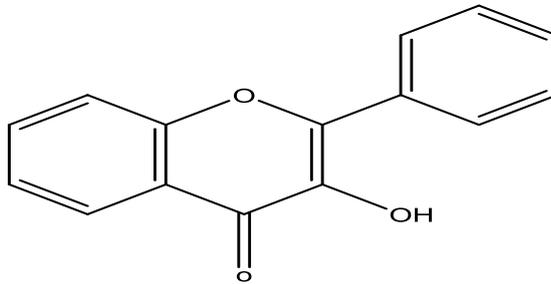


Figure 21 : Structures des flavonols[35].

- Dans la position 3, le flavonoïde est désigné par le terme isoflavane.

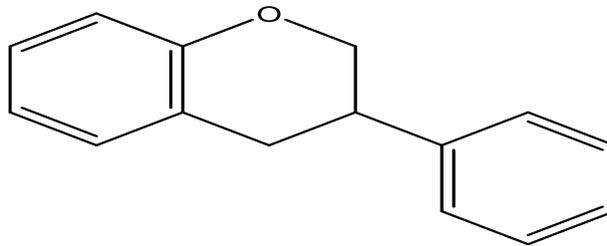


Figure 22 : Structures d'isoflavane[35].

- Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement hydroxyle, le composé est désigné par le nom isoflavanol[35].

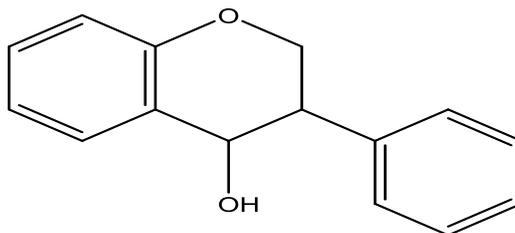


Figure 23 : Structure d'isoflavanol[35].

- Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement carbonyle, le composé est appelé isoflavanone[35].

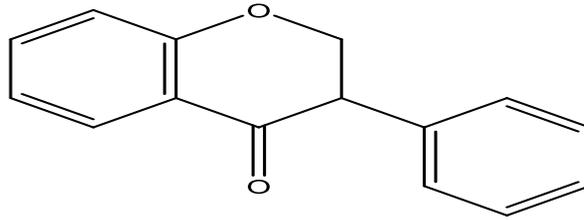


Figure 24 : Structure d'isoflavanone[35].

- Si la position C2-C3 dans le squelette de l'isoflavanone est insaturée le composé est nommé isoflavon[35].

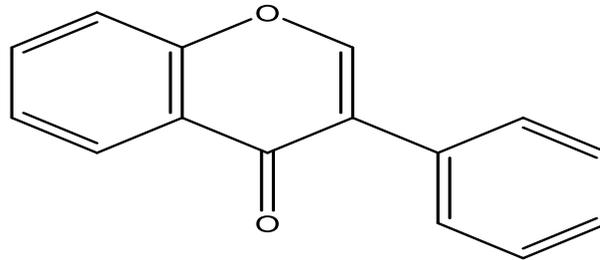


Figure 25 : Structure d'isoflavon[35].

- **Les anthocyanidines** : Les anthocyanines sont basées sur l'ion de benzopyrylium (chromenylium). Elles constituent un grand groupe de colorant de poly méthine. En particulier les anthocyanidines sont des dérivés de sel du cation du phenylchromenylium[36].

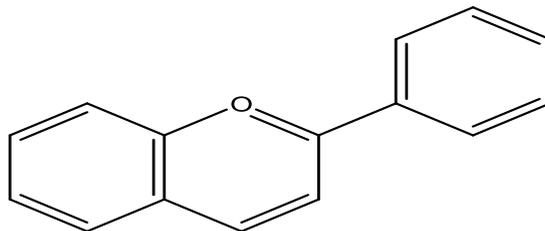
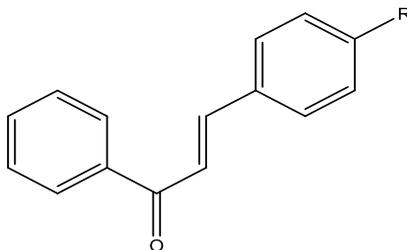


Figure 26 : Structure des anthocyanidines[36].

- **Chalcones:**

Les chalcones sont des énones aromatiques, qui appartiennent à la famille des flavonoïdes, on a des propriétés biologiques importantes telles que les activités: antibactérienne, fongicide,

anti tumorale et anti-inflammatoire, De plus, elles sont des précurseurs dans la synthèse des flavonoïdes comme indique dans la figure ci-dessus[37].



Figures 27 :Structures des chalcones[37].

- **Aurones :**

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidene coumaranone[38].

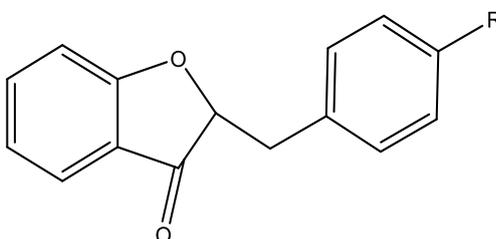


Figure 28 : Structure des Aurones [38].

#### II.4.4. Rôle des métabolites secondaires :

- **Chez l'homme :**

Ils ont des domaines d'action importants et possèdent de nombreuses propriétés médicinales antioxydantes, ils sont surtout actifs pour maintenir une bonne circulation. Certains flavonoïdes ont également des propriétés et des effets anti-inflammatoires et antiviraux protection des propriétés biologiques notables sont : antihypertenseurs, anti hépatotoxiques, antibactériens, Anti-cancer, antiallergique, etc.

- **Chez les plantes :**

1. Protégez les plantes des rayons UV.
2. Impliqué dans le processus de défense des plantes contre les infections bactéries et virus.
3. Comme pigment ou pigment auxiliaire.
4. Régule la distribution de l'auxine.
5. Ajustez l'allongement de la tige.
6. Impliqué dans la maturation des fruits [39].

## II.5. Méthodes d'extraction :

### II.5.1. Méthodes classiques :

Les techniques classiques pour l'extraction par solvants des molécules actives à partir des matrices végétales sont basées sur le choix du solvant couplé à la température ou à l'agitation. Ce sont la macération, Soxhlet et l'hydro-distillation [41].

#### a) La Macération :

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant avec ou sans agitation, à température ambiante ou à température élevée pour une durée déterminée [41].

#### b) L'extraction par Soxhlet :

L'extraction par Soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première [41].

### II.5.2. Méthodes alternatives :

L'extraction des molécules issues du matériel végétal ou ligneux par les techniques conventionnelles se révèle être une étape souvent délicate et très longue qui nécessite une consommation importante de solvant. Cela a pour conséquence d'engendrer des dégradations des matières traitées (à chaud par exemple) et de diminuer le rendement d'extraction. Une demande croissante des nouvelles techniques d'extraction permettant de réduire à la fois, le temps d'opération, la consommation de solvant et la quantité d'effluents. Telles que l'extraction assistée par ultrasons et micro-ondes [41].

#### a) Extraction assistée aux ultrasons :

L'extraction par ultrasons est une méthode simple, efficace et peu coûteuse. Cette technique est facile à mettre en œuvre. Comme le Soxhlet, l'extraction par ultrasons permet d'utiliser une large gamme de solvant afin d'obtenir différents composés naturels [41].

#### b) L'extraction assistée par microondes :

L'extraction assistée par microondes est un processus par lequel l'énergie microonde accélère l'extraction. Ce traitement accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales [41].

## II.6. Méthodes de séparation et purification

### II.6.1. Chromatographie :

La chromatographie est une méthode physico-chimique de séparation basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Parmi les diverses techniques chromatographiques, on distingue : Chromatographie sur couche mince CCM et Chromatographie sur colonne CC [42].

#### a) Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et d'interaction. La phase mobile est un solvant ou un mélange solvant, ainsi que fixé sur une plaque de verre ou feuille de plastique ou d'aluminium semi-rigide [42].

#### b) Colonne :

La technique de chromatographie repose sur le phénomène d'adsorption, elle nous permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes. La séparation est basée sur les bonnes conditions (phase mobile et phase stationnaire) et aussi le solvant qui parvient à dissoudre tous les constituants du mélange [42].

### II.6.2. Analyse chromatographique de la composition chimique des huiles essentielles :

En alliant une technique de séparation de haute résolution à une méthode de détection très sensible, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS) est devenue une méthode de choix pour l'analyse des mélanges aussi complexes que ceux des huiles essentielles. Étant donné la gamme très diversifiée des concentrations des composés d'une huile essentielle. Cette technique est la seule de par sa grande sensibilité (de l'ordre de  $\mu\text{g}$ ) qui permet de contribuer à la résolution de la plupart des problèmes d'identification rencontrés. Cette technique permet d'obtenir à la fois le temps de rétention des constituants volatils de l'échantillon pour un programme donné et leur spectre de masse [55].

---

---

*Chapitre 3 :*  
*Activité Antioxydante*

---

---

La recherche sur la capacité antioxydante représente un enjeu scientifique important largement relatée dans l'étude des propriétés biologiques de la plante médicinale.

### **III.1. Stress oxydant :**

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la production de substances oxydantes activation (EOA) et défenses anti-oxydants de l'organisme qui favorisent les premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcool, obésité, activité physique intense) et nos mauvaises habitudes alimentaires augmentent anormalement la production d'AOE dans notre organisme. À long terme, cela peut conduire à diverses conditions liées au vieillissement comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires [43].

### **III.2. Radicaux libres :**

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électron (s) libre (s) non apparié(s) sur leurs orbitales externes. Un radical (souvent appelé radical libre) est une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur sa couche externe, il se note par un point la présence d'un électron célibataire confère à ces molécules, la plupart du temps une grande instabilité (elles ne respectent pas la règle de l'octet), ce qui signifie qu'elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés dans des processus le plus souvent non spécifiques.

Les radicaux libres peuvent être d'origine endogènes c'est-à-dire ils sont produits naturellement par notre organisme, en majorité au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobies, lors de la transformation des nutriments en énergie. Cependant, ils peuvent aussi provenir de sources extérieures (origine exogène) comme le tabac, l'exposition aux UV, la pollution et les pesticides[44].

Dans les systèmes vivants, la production des radicaux libres oxygénés se fait de manière continue et leur présence a des conséquences potentiellement graves pour la cellule, mais l'organisme possède des systèmes de défense très efficaces, les antioxydants [45]. [46].

### **III.3. Antioxydants :**

Les antioxydants sont définis comme l'ensemble des molécules susceptibles de retarder ou d'inhiber directement le processus d'oxydation même à une concentration relativement faible. Les constituants antioxydants du matériel végétal (les fruits, les légumes, le thé, ...etc.) agissent en tant que piègeurs de radicaux et contribuent à la conversion des radicaux en espèces moins réactives [47].

Les antioxydants peuvent être classés de plusieurs façons.

- Selon leur cible et leur mécanisme d'action ; ils peuvent être classés en tant qu'antioxydants primaires et antioxydants secondaires.
- Selon leur origine : les antioxydants naturels (synthétisés dans l'organisme ou amenés

Par l'alimentation) ou synthétiques [47].

#### III.4. Utilisations des antioxydants :

L'industrie des matières plastiques : des additifs sont utilisées pour protéger les polymères de l'oxygène de l'air. L'activité éventuelle des molécules médicamenteuses déjà connues qui présentent les avantages d'une biodisponibilité et de paramètres pharmacocinétiques et toxicologiques déjà bien connus. Ce sont concernées par l'utilisation dans l'industrie alimentaire et l'industrie de lubrifiants : elle produit notamment les huiles pour moteurs et transmissions automobiles.

L'industrie cosmétique : les molécules utilisées sont plus ou moins les même que dans L'industrie alimentaire [49].

#### III.5. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour mesurer l'activité antioxydante, nommé d'après la substance utilisée comme source des radicaux libres. Tel que :

- FRAP (réduit la capacité anti-oxydante du fer)
- ABTS (2,2-azinobis 3-ézoline- sulfonate).
- DPPH(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)...etc.

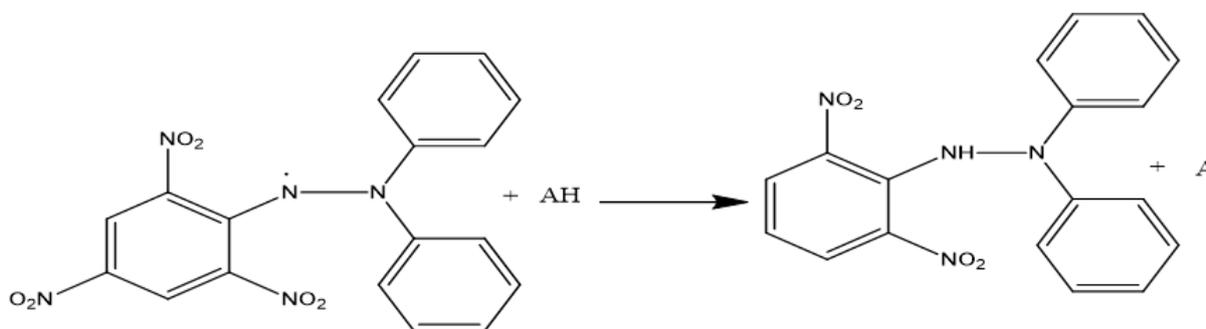
Il a indiqué que les différentes méthodes donnent des résultats assez différents et devaient être appliqués préférentiellement pour la comparaison des produits similaires [48].

##### III.5.1. Test de piégeage par le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) :

Le DPPH est un radical libre stable qui peut accepter un électron ou un radical hydrogène devenant une molécule diamagnétique stable.

La solution méthanoïque de DPPH présente une forte bande d'absorption à 517 nm en raison de ses électrons impairs, le radical DPPH réagit avec un agent réducteur approprié pour créer de nouvelles liaisons, qui modifient la couleur de la solution (la couleur violet a une couleur jaune). La solution perd sa couleur avec l'augmentation de la concentration antioxydante à mesure que les électrons sont absorbés par les radicaux DPPH. Cette réactivité a été utilisée

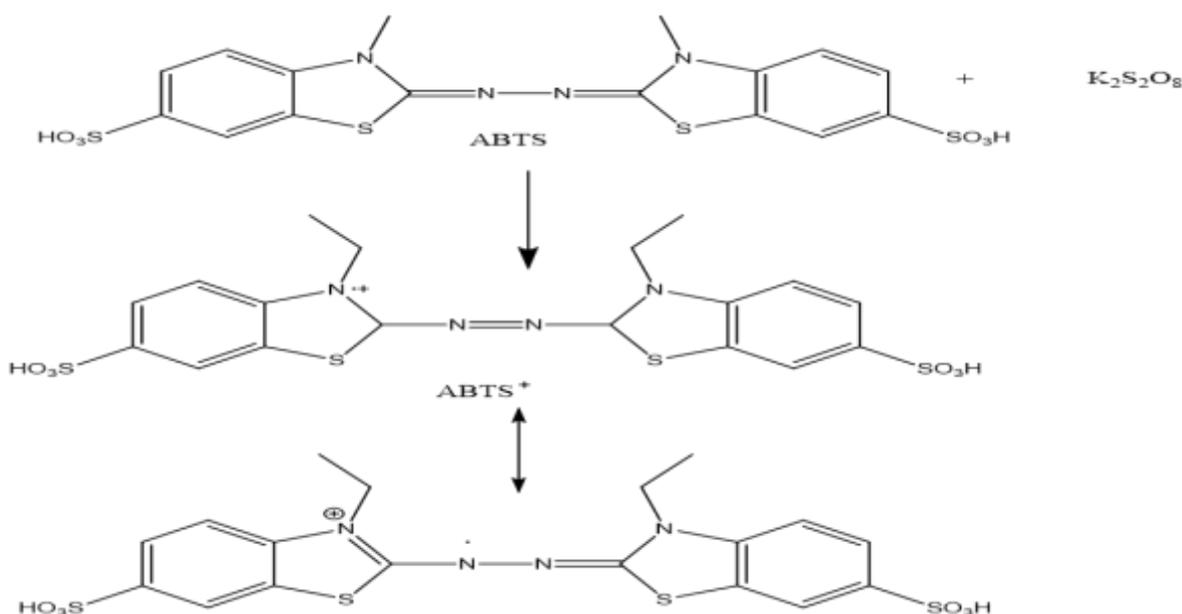
pour tester les composés et les extraits des plantes pour leur capacité à agir comme piègeurs de radicaux libres. La réduction des radicaux DPPH peut être contrôlée par spectrophotométrie par une diminution de l'absorbance [50].



**Figure 29 :** Réaction du radical DPPH avec d'autres radicaux ( $\cdot R = \cdot H$ , radical alkyle) [50].

### III.5.2. Test de piégeage par le cation radicalaire ABTS<sup>·+</sup> :

Lors de la mise en œuvre de ce test, l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) incolore est préalablement oxydé avec du persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ) pour former le radical cationique ABTS<sup>·+</sup> de coloration bleu-vert. L'addition d'un composé antioxydante engendre la réduction du radical ABTS<sup>·+</sup> en ABTS. L'activité antioxydante est déterminée par la décoloration de la solution et s'exprime par le pourcentage d'inhibition (PI) de l'absorbance à 734 nm, longueur d'onde à laquelle le radical ABTS<sup>·+</sup> présente une bande d'absorption caractéristique [51].



**Figure 30 :** Formation du radical cation ABTS<sup>·+</sup> à partir de l'ABTS [51].

### III.5.3. Réduction du Fer : FRAP

L'activité réductrice du fer des extraits préparés est déterminée selon la méthode décrite par (Oyaizu,1986), basée sur la réduction du  $\text{Fe}^{3+}$  présent dans le complexe  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  en  $\text{Fe}^{2+}$  de la couleur bleu cyanée. Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur significatif de l'activité antioxydante potentielle d'un composé. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à une longueur d'onde de 700 nm [52].

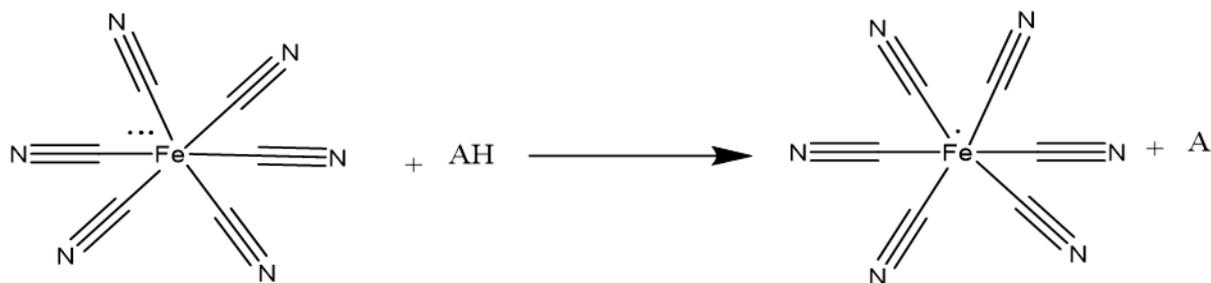


Figure 31 : Schéma de la réaction de test FRAP [52].

### III.5.4. Piégeage du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) :

L'une des méthodes les plus courantes pour évaluer la capacité de piégeage du peroxyde. L'absorption de l'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine ultraviolet. Lorsque la concentration de  $\text{H}_2\text{O}_2$  diminue en raison du composé de piégeage, la valeur de l'absorbance à 230 nm de ce dernier est également réduite. Toujours assez normalement, l'échantillon absorbe également à cette longueur d'onde, il est donc nécessaire de mettre en œuvre des mesures blanches. La réalisation d'une telle méthode nécessite beaucoup de rigueur au moment de la manipulation [53].

---

---

## *Partie Expérimentale*

---

---

La partie expérimentale a été effectuée au laboratoire de chimie organique à l'université de Mohamed Seddik Ben Yahia–Jijel. Notre travail repose sur l'étude des métabolites secondaires extrait à partir de l'espèce *Ruta graveolens* de la famille Rutaceae.

#### **IV. Matériel et Méthodes**

##### **IV.1. Récolte de la matière végétale :**

L'espèce *Ruta graveolens*, a été récoltée en mars 2022, de la région d'Bni Harroun(Mila). La plante a été bien nettoyées et séchée à l'aire libre et sec, les parties utilisées (la partie arienne) ont été ensuite pesées, broyées grossièrement et récupérées dans des sacs propres.



**Figure 32 :** Espèce *Ruta graveolens*.

##### **IV.2. Extraction solide-liquide :**

Après le séchage des feuilles de l'espèce *Ruta graveolens*, nous avons pris une quantité de 200 g à température ambiante dans un mélange hydro-alcoolique (mélange Méthanol/Eau ; 70/ 30) pendant 24 à 48 heures, puis faire filtrer sur un coton et sécher le filtrat à sec, cette opération doit être répétée trois fois avec renouvellement du solvant pour augmenter la masse de l'extrait.



**Figure 33 :** Macération de la plante *Ruta graveolens*.

Le filtrat concentré par élimination du solvant sous vide à 40°C à l'aide d'un rotavapeur. Il s'agit d'un appareil de distillation simple sous pression réduite. Les points d'ébullition des ingrédients et des solvants sont considérablement réduits (il existe des graphiques pour connaître la température d'ébullition du produit à pression atmosphérique et la pression dans la coque).



**Figure 34** : L'appareil de Rotavapeur.

#### **IV.3. Préparation des extraits :**

Après la filtration puis concentrée sa sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif, on a ajouté 400 ml de l'eau distillée et le mélange filtré.



**Figure 35** : La préparation des extraits.

Le filtrat a subi une extraction liquide/liquide en utilisant des solvants de polarité croissante donnant ainsi trois phases :

- Epuisement par le chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ ) : phase chloroformique.
- Epuisement par l'acétate d'éthyle (ACOEt) : phase acétate d'éthyle.
- Epuisement par n-butanol (n-But) : la phase n-butanolique.

Chaque épuisement est refait par 3 fois avec la même quantité du solvant (250ml).



Epuisement de l'extrait par chloroforme



Epuisement de l'extrait par l'acétate d'éthyle



Epuisement de l'extrait par n-butanol

**Figure 36** : Extraction par solvants.

#### IV. 3.1. Calcul du rendement des extraits :

Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extrait sec en calculant le rapport suivant :

$$R (\%) = ((M_{EXT}/M_{SÉCH}) \times 100)$$

R: Rendement des extraits en %.

$M_{EXT}$ : La masse de l'extrait obtenu.

$M_{SÉCH}$ : La masse sèche de la plante.

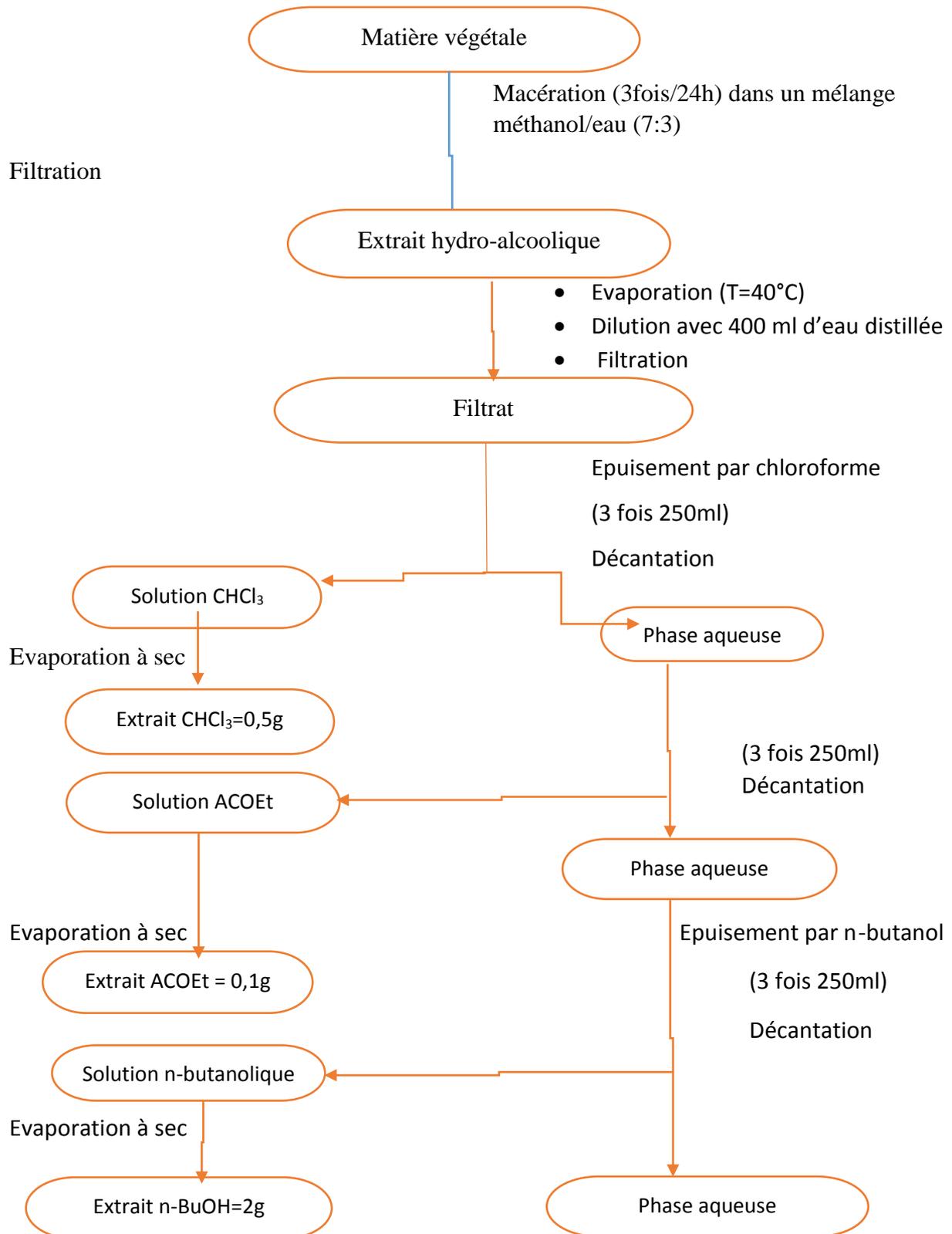
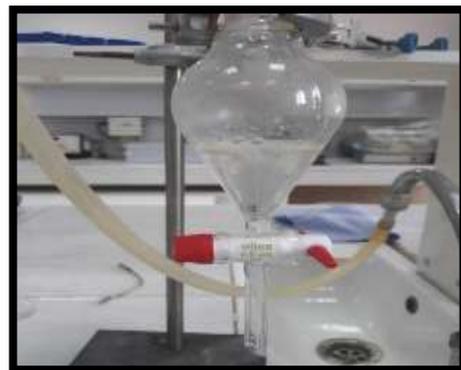


Figure 37 : Protocole de séparation des extraits.

#### **IV.4. Procédé d'extraction des huiles essentielle :**

Pour l'extraction des huiles essentielles de la plante la *Ruta graveolens*, nous avons choisis la méthode de l'hydro distillation pour cela 100g de la plante dans 500 ml de l'eau distillée met sur un ballon de 1000ml pendant 1h 30 minutes jusqu'à l'ébullition. Les vapeurs chargés des huiles se condensant en traversant un réfrigèrent et récupérée dans une ampoule à décanter.



**Figure 38 :** Montage de hydro-distillation.

#### **IV.4.1. Calcul du rendement des huiles essentielles :**

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse d'huile essentielle extraite et la masse de la plante sèche traitée. Le rendement en pourcentage (R %) est calculé par la formule suivante :

$$R\% = (m_{HE} / m_p) \times 100$$

**R:** Rendement d'huile essentielle en %.

**m<sub>HE</sub>** : C'est la masse de l'huile essentielle extrait en g.

**m<sub>p</sub>** : C'est la masse de la plante traitée en g.

#### **IV.5. Analyse des extraits**

##### **IV.5.1. Analyse qualitative**

##### **IV.5.1.1. Screening phytochimique :**

L'un des buts essentiels d'un test phytochimique consiste dans la détection des différentes familles de métabolites secondaires existant dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou

de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés ainsi que des examens en lumière ultraviolette [56]. Dans notre étude expérimentale nous avons utilisé les techniques standards décrites par *Terease et Evans, Harborne, Bruneton*[57].

**a) Test pour la mise en évidence des flavonoïdes :**

Dans un tube à essai, introduire 1 ml d'extrait à tester, ajouter 1ml d'acide chlorhydrique (HCl) et 3 copeaux de magnésium. L'apparition d'une coloration rouge ou jaune révèle la présence des flavonoïdes.

**b) Test pour la mise en évidence des tanins :**

A 1 ml d'extrait à analyser, ajouter 0,5 ml d'une solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  à 1 %. La présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre.

**c) Test pour la mise en évidence des alcaloïdes :**

Les tests sont réalisés par des réactions de précipitation avec les réactifs de Mayer et Wagner. 1ml de chaque extrait est divisé en deux volumes égaux. Un volume est traité par 0,5ml de réactif de Mayer, l'autre par 0,5ml de réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence des alcaloïdes.

❖ **Réactif de Mayer** : on dissout 1.758g de  $\text{HgCl}_2$  dans 60 ml de l'eau distillée, puis 5g de KI dans 10 ml de l'eau distillée, et on mélange les deux solutions.

❖ **Réactif de Wagner** : on dissout dans 75 ml de l'eau distillée 2g de KI et 1.27g de  $\text{I}_2$  le volume est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

**d) Test pour la mise en évidence des terpénoïdes :**

5ml d'extrait est ajouté à 2ml de chloroforme et 3ml d'acide sulfurique concentré. La formation de deux phases et un couleur marron à l'interphase indique la présence des trapézoïdes.

**e) Test pour la mise en évidence des quinones :**

Sur un volume de chacune des extraits, on ajoute quelques gouttes de NaOH, l'apparition d'un couleur jaune, rouge ou violet confirme la présence des quinones.

**f) Test pour la mise en évidence des coumarines :**

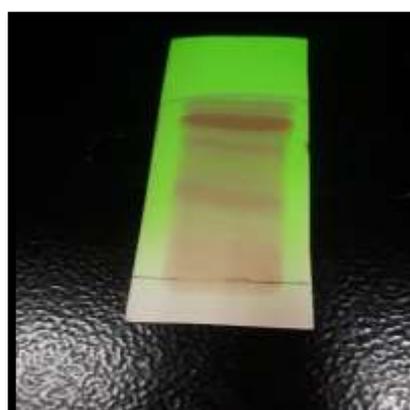
Introduire 5ml d'extrait dans un tube, ajouter 0,5ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 10%, mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

**IV.5.1.2. Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince (CCM) :**

L'analyse des extraits bruts par la CCM permet de voir que ces extraits sont riches en métabolites secondaires, le choix du système est basé sur ceux qui donnent les meilleures migrations des différents constituants des extraits.



La phase Chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ )  
Système (3/1)  
(chloroforme/méthanol)



La phase acétate  
d'éthyle (ACOEt)  
Système (4/1)  
(chloroforme/méthanol)

**Figure 39 :** Le test chromatographique des phases obtenues.

**IV.5.2. Analyse quantitative**

**IV.5.2.1. Dosage des polyphénols totaux :**

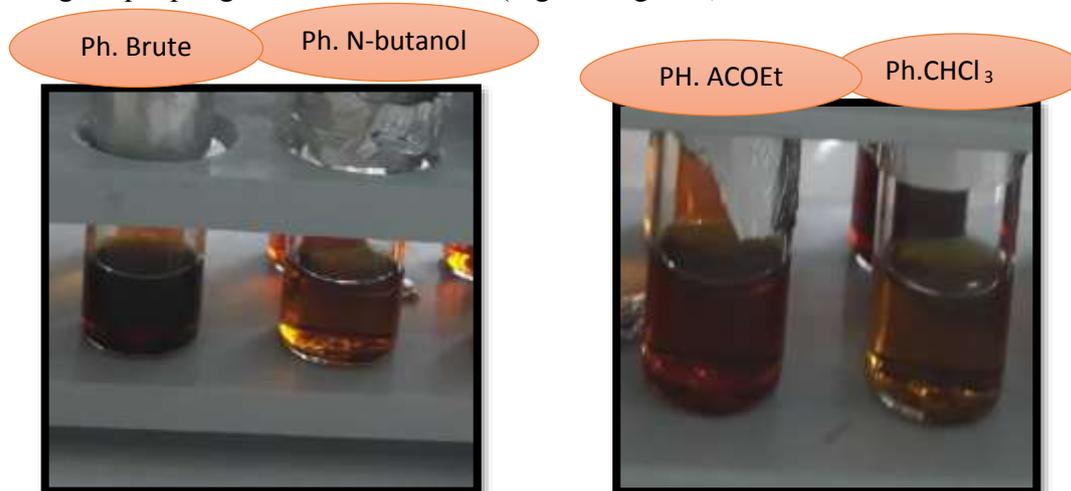
Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMO}_{12}\text{O}_{40}$ ) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénolique qui entraîne la formation d'un nouveau complexe d'oxyde métallique de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits [58].

• **Mode opératoire :**

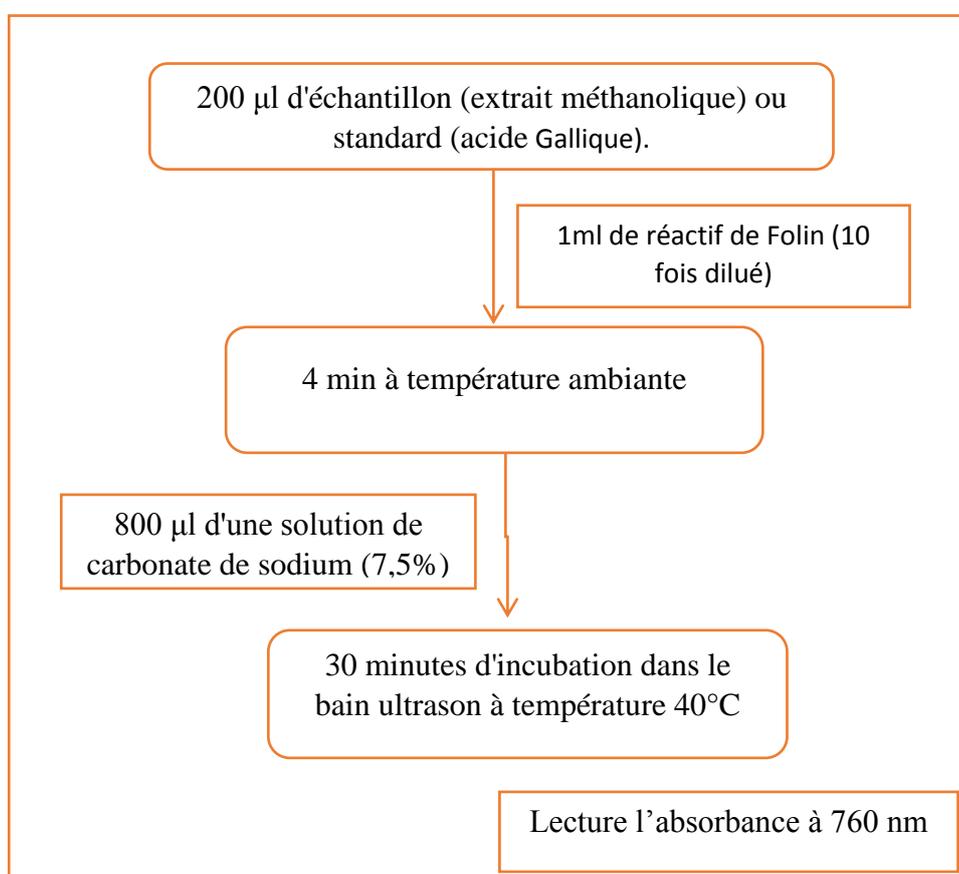
1ml de réactif de Folin (10 fois dilué) préparé fraîchement est ajouté à 200  $\mu\text{l}$  d'échantillon (extrait méthanoïque). Après 4 min, 800  $\mu\text{l}$  d'une solution de carbonate de sodium (7,5%) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 30 minutes d'incubation dans un bain ultrason à 40°C,

l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique à différentes concentrations (0,1, 0,5, 1, 3, 6, 10) µg/ml dans les mêmes conditions que les échantillons. Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg GAE/g EXS).



**Figure 40 :** Test de mise en évidence des polyphénols des quatre extraits.



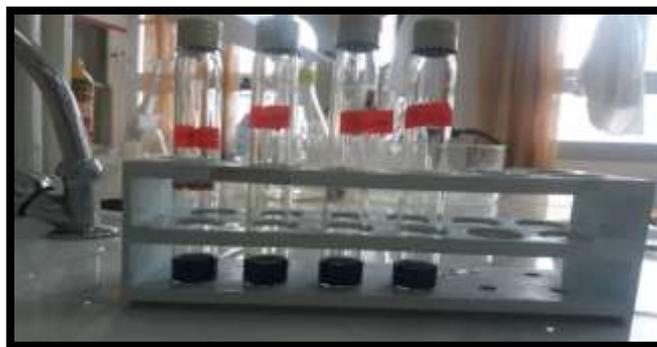
**Figure 41 :** Protocole expérimentale de dosage des polyphénols totaux.

#### IV.5.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

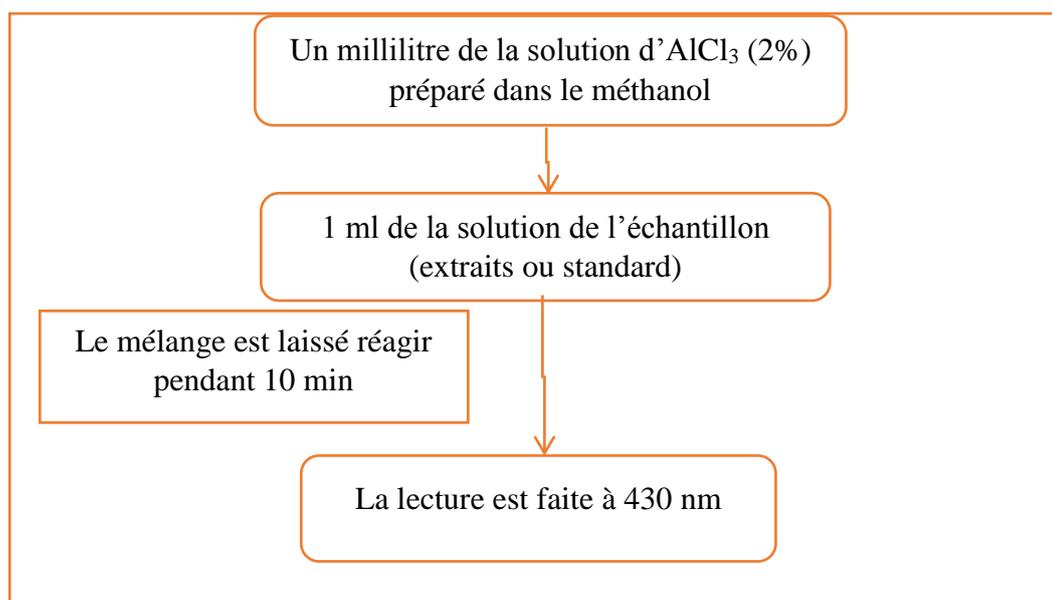
L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de la plante est réalisée par la méthode chlorométrique. Le principe repose sur la capacité des flavonoïdes à former des complexes de couleur jaune avec le chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre UV à 510 nm [59].

- **Mode opératoire :**

Un millilitre de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2%) préparé dans le méthanol est ajouté à 1 ml de la solution de l'échantillon (extraits ou standard) à différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm. La teneur des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercitine (2-14  $\mu\text{g/ml}$ ) et exprimée en milligramme d'équivalents de quercitine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g EXS).



**Figure 42 :** Test de mise en évidence des flavonoïdes des quatre extraits.



**Figure 43 :** Protocole expérimentale de dosage des flavonoïdes totaux.

## **IV.6. Evaluation des activités biologiques :**

### **IV.6.1. Activité antioxydante :**

#### **IV.6.1.1. Test de piégeage par le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) :**

On a dissout 0,0023g du DPPH dans 100ml de MeOH puis on a fait l'agitation pendant 1h à 4°C dans l'obscurité. 50µl de chaque solution méthanolique des différents extraits de différentes concentrations sont ajoutés à 1950µl d'une solution méthanolique de DPPH<sup>•</sup> pour chaque concentration. On prépare un blanc en parallèle en mélangeant 50µl du méthanol avec 1950µl d'une solution méthanolique de DPPH<sup>•</sup> la même concentration utilisée en ce qui concerne le contrôle négatif. Pour l'extrait chloroforme, on prend les concentrations suivantes : (15, 20, 25,30, 35) µg/ml et pour l'acétate d'éthyle, le n-butanol et l'extrait brute on prend les concentrations : (0, 01, 1, 3, 5, 7, 8 ,10) µg/ml

Après incubation à l'obscurité pendant 30 minutes et avec température de 35°C, L'activité anti-radicalaire des extraits vis-à-vis du radical DPPH<sup>•</sup> a été évalué par spectrophotométrie UV-Visible en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur mesurable à 515nm. En calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant (PI%) qui est donné selon la formule suivante :

$$PI\% = [(A_{\text{control}} - A_{\text{extrait}} / A_{\text{control}}) \times 100]$$

**PI%** : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup>.

**A<sub>control</sub>**: Correspond à l'absorbance du DPPH<sup>•</sup> sans antioxydant après le temps de réaction.

**A<sub>extrait</sub>** : Correspond à l'absorbance de l'échantillon avec DPPH<sup>•</sup> après le temps de réaction.

#### **Calcul des IC<sub>50</sub> :**

L'IC<sub>50</sub> est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH<sup>•</sup>.

Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés: pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. Il faut rappeler que la valeur d'IC<sub>50</sub> est inversement proportionnel avec l'activité antioxydante des extraits.



**Figure 44** :Test d'activité antioxydant par la réduction du radical DPPH'.

#### IV.6.1.2. Test de piégeage par le cation radicalaire ABTS<sup>•+</sup> :

Le test a été réalisé selon la méthode de Re et *al* avec quelques modifications. L'ABTS a été dissous dans de l'eau à une concentration de 7 mM. Le cation radical ABTS<sup>•+</sup> a été produit en faisant réagir une solution ABTS avec du persulfate de sodium 2,45 mM. Le mélange réactionnel est mis en incubation, à l'obscurité, pendant 16 h à température ambiante. La solution ABTS<sup>•+</sup> a été diluée avec le méthanol afin d'obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm.

Un volume de 50 µl de différentes concentrations de chaque extrait ou de standard (acide ascorbique) est ajouté à 1950 µl de la solution diluée d'ABTS<sup>•+</sup>. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 µl du méthanol avec 1950 µl de la solution diluée d'ABTS<sup>•+</sup>.

Après incubation à l'obscurité pendant 1h et à la température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Pour chaque concentration le test est répété 3 fois.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = \frac{[\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs extrait}]}{\text{Abs contrôle négatif}} \times 100$$

**Abs contrôle négatif:** correspond à l'absorbance de l'ABTS sans antioxydant après le temps de la réaction.

**Absextrait:** correspond à l'absorbance de l'échantillon avec l'ABTS après le temps de la réaction.

### Calcul des IC<sub>50</sub> :

L'IC<sub>50</sub> est la concentration d'extrait nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical ABTS.

Les IC<sub>50</sub> sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés: pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.



**Figure 45 :** Teste d'activité antioxydant de cation radicalaire ABTS<sup>+</sup>.

### IV.6.1.3. Réduction du Fer : FRAP

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> à 0,1% sont additionnées. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm. Le blanc est semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Pour chaque concentration le test est répété 3 fois.



**Figure 46 :** Teste d'activité antioxydant par la Réduction de fer.

#### **IV.6.1.4. Piégeage du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :**

L'essai de réduction du peroxyde d'hydrogène a été effectué suivant la méthode de Ruch et al. Pour ce test, une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été préparée dans une solution tampon phosphaté (0,1M pH=7,4) à 20°C. Les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont déterminées par la méthode spectrophotomètre avec absorbance 240nm. Pour chaque échantillon à tester, les extraits sont dissous dans DMSO. Une dilution de 100µg/ml préparé dans un tampon phosphate. On a été ajoutés à 0,6ml d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La valeur de l'absorbance du mélange réactionnel a été enregistrée à 240nm. Le blanc contient uniquement le tampon phosphate sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **IV.7. Analyse CG/MS des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles récupérées sont recueillies et conservées au réfrigérateur à 4 °C dans des bouteilles sombres pour les préserver de la lumière.

##### **❖ Principe :**

En alliant une technique de séparation de haute résolution à une méthode de détection très sensible. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/MS) est devenue une méthode de choix pour l'analyse des mélanges aussi complexes que ceux des huiles essentielles. Etant donné la gamme très diversifiée des concentrations des composés d'une huile essentielle. Seulement cette technique qui a une grande sensibilité (de l'ordre de µg) permet de contribuer à la résolution de la plupart des problèmes d'identification rencontrés. Cette technique permet d'obtenir à la fois le temps de rétention des constituants volatils de l'échantillon pour un programme donné et leur spectre de masse [64].



**Figure 47:** Appareil de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse.

La spectrophotométrie de masse repose sur l'ionisation et la fragmentation des molécules. Leur ionisation entraîne un effet d'accumulation d'énergie qui en se dissipant, peut provoquer la rupture des liaisons interatomiques et donner naissance à des fragments caractérisés par le rapport de leur masse et leur charge. Les différents fragments ainsi produits sont accélérés avant de parvenir à un analyseur appelé filtre de masse qui le sépare. Le recueil sélectif des différents ions permet l'établissement d'un spectre caractéristique appelé : spectre de masse [65].

❖ **Mode opératoire :**

Les constituants de l'huile essentielle ont été identifiés par CG/MS. L'analyse a été réalisée par un chromatographe à phase gazeuse du type Shimadzu QP 2010 EI couplé à un spectromètre de masse. La colonne capillaire était du type OV1701 de 25m longueur, diamètre 0,25mm. Le débit du gaz porteur (hélium) était de 1,5 ml/min. 1µl d'huile essentielle a été injecté en utilisant le mode split. La température de 5°C jusqu'à 230°C. Le détecteur était à une spectrométrie de masse (MS).

---

---

## *Résultats et discussion*

---

---

### V.1. Extraction liquide-liquide :

Cette étape repose sur la spécificité et la polarité des solvants organiques utilisés :

- Epuisement par le chloroforme : qui est un solvant organique apolaire, entraîne souvent les composés apolaires tels que les terpénoïdes.
- Epuisement par l'acétate d'éthyle : qui est un solvant moyennement polaire, extrait généralement les molécules moyennement polaires tels que les glycosides.
- Epuisement par le n-butanol : qui est un solvant polaire, entraîne essentiellement les composés polaires tels que les flavonoïdes.

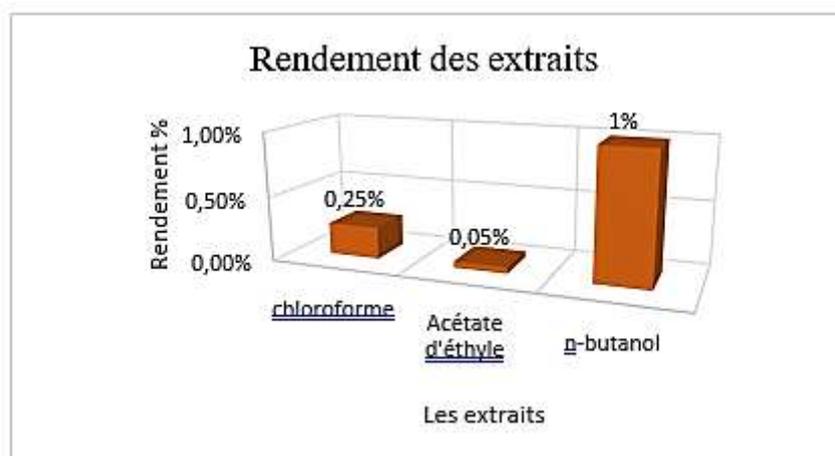
#### V.1.1. Le rendement des trois phases :

Les trois extraits récupérés après évaporation à sec, ont été pesés pour déterminer la masse sèche obtenue, les résultats sont représentés sur le tableau(1) :

**Tableau (1).** La masse, le rendement et couleurs des extraits de la plante (partie aérienne) étudiées.

| La matière végétale : <i>Ruta graveolens</i> |              |       |           |
|--|--------------|-------|-----------|
| Extrait                                      | couleur      | masse | Rendement |
| Chloroforme                                  | Jaune foncée | 0,5g  | 0,25 %    |
| Acétate d'éthyle                             | Jaune Claire | 0,1 g | 0,05%     |
| n-Butanol                                    | Rouge        | 2g    | 1%        |

Les résultats obtenus montrent que le rendement des extraits de la plante sont variables, le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait n-butanol 1% suivi par l'extrait Chloroforme 0,25 %. Tandis que le plus faible est celui d'Acétate d'éthyle d'ordre 0,05 %.



**Figure 48 :** Le rendement des extraits.

V.2. Analyse des extraits

V.2.1. Analyse qualitative

V.2.1.1. Screening phytochimique :

Ce sont des tests qualitatifs qui ont été effectués pour la plante *Ruta graveolens*, et qui nous renseigne sur la composition chimique des différentes phases méthanoïque. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau :

Tableau (2) : Résultats de screening phytochimique.

| Tests   | Photos   | Extraits         | charges | Interprétations  |
|---|--|------------------|---------|--|
| -Test de mise en évidence des Flavonoïdes :   |  <p>Figure 49 : Test de mise en évidence des flavonoïdes des quatre extraits.</p> | Chloroforme      | -       | La présence des Flavonoïdes dans chaque extrait est confirmée par la coloration rouge, ce qui montre que les flavonoïdes sont présents dans l'extrait brute et surtout dans l'extrait n- butanolique qui est le plus riche en flavonoïdes. |
|   |  | Acétate d'éthyle | -       |  |
|   |  | n-butanol        | + +     |  |
|   |  | Brute            | +       |  |
| Test de mise en évidence des tanins:  |  <p>Figure 50 : Test de mise en évidence des tanins des quatre extraits</p>     | Chloroforme      | + +     | La présence des tanins dans chaque extrait est confirmée par la coloration bleu-noirâtre, ce qui montre la présence des tanins catéchiques dans les quatre extraits.   |
|   |  | Acétate d'éthyle | + +     |  |
|   |  | n-Butanol        | + +     |  |
|   |  | Brute            | + +     |  |
| Test pour mise en évidence des Alcaloïdes :<br>(traité par les réactifs de Mayer et Wagner) |  <p>Figure 51. Test de mise en évidence des alcaloïdes des trois extraits.</p>  | Chloroforme      | + +     | la formation d'un précipité blanc ou brun indique la présence des Alcaloïdes, où on peut conclure que les alcaloïdes sont présents dans les quatre extraits  |
|   |  | Acétate d'éthyle | + +     |  |
|   |  | n-Butanol        | + +     |  |
|   |  | Brut             | + +     |  |
| Test de mise en   |  | Chloroforme      | +       | La présence des terpenoides  |

|   |   |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
|---|---|---|-----------------|----|-----------------|----|-----------|----|---|----|---|
| <p><b>évidence des Terpenoides :</b></p>                |  <p><b>Figure 52.</b> Test de mise en évidence des terpenoides des quatre extraits.</p>  | <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Acétated'éthyle</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>n-Butanol</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>Brut</td> <td>++</td> </tr> </tbody> </table>   | Acétated'éthyle | ++ | n-Butanol       | ++ | Brut      | ++ | <p>est confirméepar l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase, on observe que les quatre extraits contiennent des Terpenoides, ce qui confirme que la plante estriche en terpenoides.</p> |    |   |
| Acétated'éthyle   | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| n-Butanol   | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| Brut  | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| <p><b>Test de mise en évidence des quinones :</b></p>   |  <p><b>Figure53.</b> Test de mise en évidence des quinones des quatre extraits.</p>      | <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Chloroforme</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>Acétated'éthyle</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>n-Butanol</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>Brut</td> <td>++</td> </tr> </tbody> </table> | Chloroforme     | ++ | Acétated'éthyle | ++ | n-Butanol | ++ | Brut  | ++ | <p>L'apparition d'une couleur jaune ou rouge confirme la présence des quinones, donc les quinones présentes dans les quatre extraits.</p>   |
| Chloroforme   | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| Acétated'éthyle   | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| n-Butanol   | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| Brut  | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| <p><b>Test de mise en évidence des coumarines :</b></p> |  <p><b>Figure 54.</b> Test de mise en évidence des coumarines des quatre extraits.</p> | <table border="1"> <tbody> <tr> <td>Chloroforme</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>Acétated'éthyle</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>n-Butanol</td> <td>++</td> </tr> <tr> <td>Brut</td> <td>++</td> </tr> </tbody> </table> | Chloroforme     | ++ | Acétated'éthyle | ++ | n-Butanol | ++ | Brut  | ++ | <p>Une fluorescence intense on UV a 366nm indique la présence des coumarines, or on observe une fluorescence dans tous lesextraits qui signifie que la plante contient de coumarines.</p> |
| Chloroforme   | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| Acétated'éthyle   | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| n-Butanol   | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |
| Brut  | ++  |   |                 |    |                 |    |           |    |   |    |   |

(+ +) : Fortement positif.

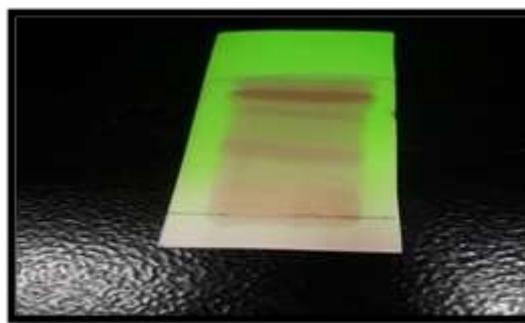
(+ ) : La présence des substances chimiques.(-) : L'Absence des substances chimiques.

### V.2.1.2 Résultats de la chromatographie sur une couche mince de l'extrait CHCl<sub>3</sub> et d'ACOEt

Après une série d'essais réalisés pour trouver un système d'élution adéquat afin de séparer les différents composants des métabolites secondaires du *Ruta graveolens*. nous avons opté pour le mélange (CHCl<sub>3</sub>/ CH<sub>3</sub>OH) (3:1)(4:1); qui nous semble comme étant le meilleur système d'élution. Les plaques CCM révèlent une série des taches (la phase chloroforme 3 taches, la phase acétate d'éthyle il y'a une seule tache majoritaire) indiquant la richesse de chaque extrait en produits.



Phase chloroformique



Phase acétate d'éthyle

Figure 55 : Résultats de la CCM des deux phases.

### V.2.2. Analyse quantitative des extraits :

Les métabolites secondaires constituent une large gamme des molécules végétales dont leur nature chimique et teneur sont extrêmement variables d'une espèce à l'autre. L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux des extraits a été réalisée par la procédure écrite ci-dessous.

#### V.2.2.1. Dosage des polyphénols totaux :

La teneur en polyphénols totaux estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu pour chaque extrait à partir d'une gamme étalon établie avec différentes concentrations d'acide gallique en utilisant comme référence l'équation standard de courbe :  $Y=0,0578x-0,0058$  avec un coefficient de corrélation égale à  $R^2=0,9981$  (fig56).

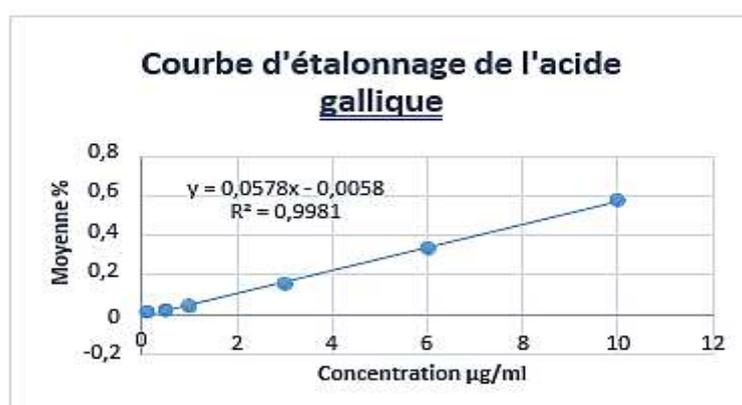


Figure 56. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

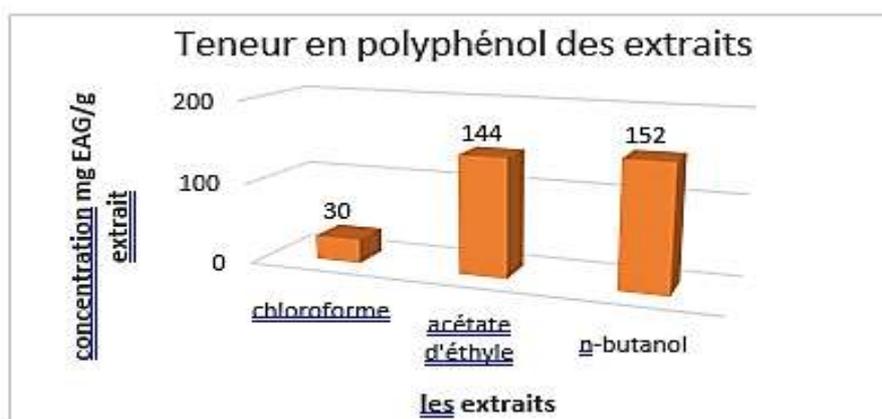
Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par une gramme de l'extrait sec (mg EAG/g EXS). Cette méthode de dosage présente une productibilité plus que sa sensibilité. Par ce que l'absorbance est étroitement liée à la concentration de l'acide gallique

utilisé dans la gamme étalon.

Les résultats d'analyse quantitative obtenus par spectrophotométrie UV-visible des trois extraits : chloroformique, acétate d'éthyle et n-butanolique, des parties aériennes de la plante. sont représentés dans la figure (56) et le tableau suivants :

**Tableau (3) :** Résultat de la quantification spectrophotométrique des polyphénols totaux.

| Phase                  | Chloroforme | Acétate d'éthyle | n-butanol  |
|------------------------|-------------|------------------|------------|
| Teneur en mg EAG/g Ext | 30± 0,0778  | 134 ±1,1332      | 152±0,2685 |
| La matière sèche       | 0,075g      | 0,067g           | 1,52g      |



**Figure 57 :** Teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits de la plante.

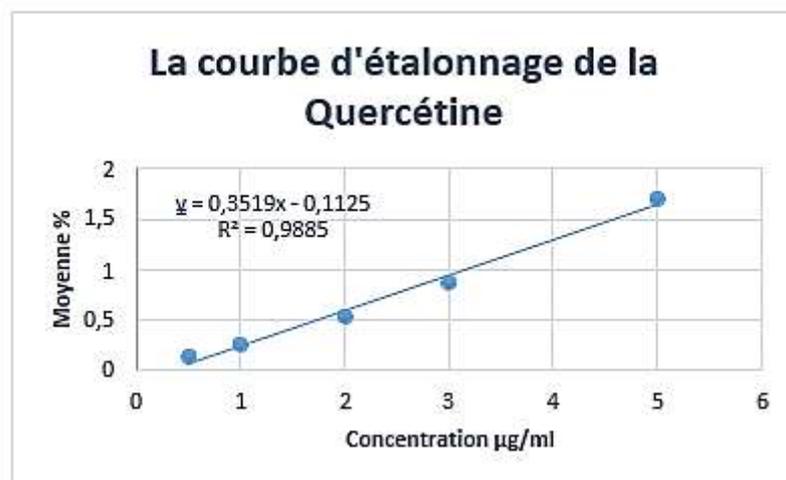
D'après les résultats, on constate que tous les extraits de la plante étudiés sont riches en polyphénols mais avec des quantités différentes.

L'histogramme montre que l'extrait n-butanol contient la plus grande teneur en polyphénols (152 mgEAG/g EXS), suivi par Acétate d'éthyle (144mgEAG/g EXS) et enfin l'extraitsChloroforme (30 mg EAG/g EXS).

#### V.2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux :

Les teneurs en flavonoïde dans les extraits ont été estimées en utilisant  $AlCl_3$ . Une couleur jaune est observée afin d'ajouter le trichlorure d'aluminium à la solution méthanolique de la quercétine qui présente un flavonoïde très connu de la famille des flavonols, ce dernier est utilisé comme une référence de réalisation de la courbe d'étalonnage dans la gamme de concentration. Les résultats sont illustrés sur l'histogramme (fig.61). La teneur en flavonoïde est exprimée en  $\mu g$  équivalent

de quercétine par mg d'extrait (mg EQ/g) d'extrait sec.



**Figure 58 :** Courbe d'étalonnage de la quercitrine pour le dosage des Flavonoïdes.

Les résultats obtenus par ce dosage pour les extraits de *Ruta graveolens* sont résumés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau (4) :** Résultats de la quantification spectrophotométrique des Flavonoïdes totaux.

| Phase                  | Chloroforme    | Acétate d'éthyle | n-butanol    |
|------------------------|----------------|------------------|--------------|
| Teneur en mg EAG/g Ext | 117,96 ±0,0071 | 140,34±0,0425    | 518,8±0,3560 |
| La matière sèche       | 0,29g          | 0,07g            | 5,18g        |

Les teneurs de ces composés varient entre 117,96 et 518,8 mg EQ/g d'extrait. Des taux élevés sont notés dans les extraits n-butanol et acétate d'éthyle respectivement avec 518,8 et 140,34 mgEQ/g d'extrait sec. Tandis que le plus faible est celui de chloroforme avec 117,96 mg EQ/g d'extrait sec

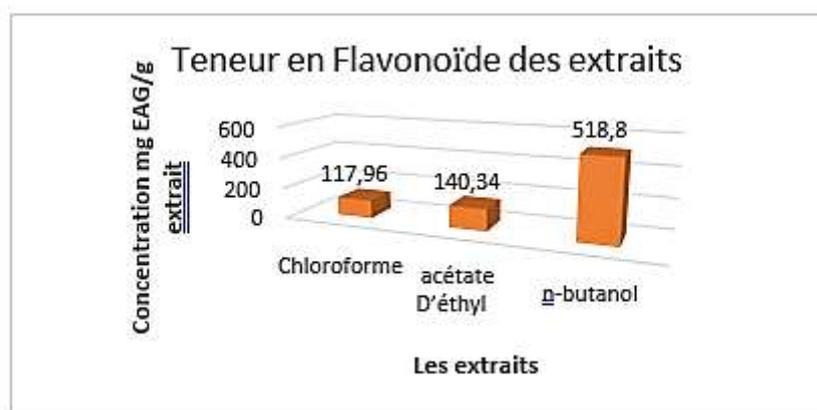


Figure 59 : Teneurs en flavonoïde dans les différents extraits de la plante.

### V.3. Les activités biologiques :

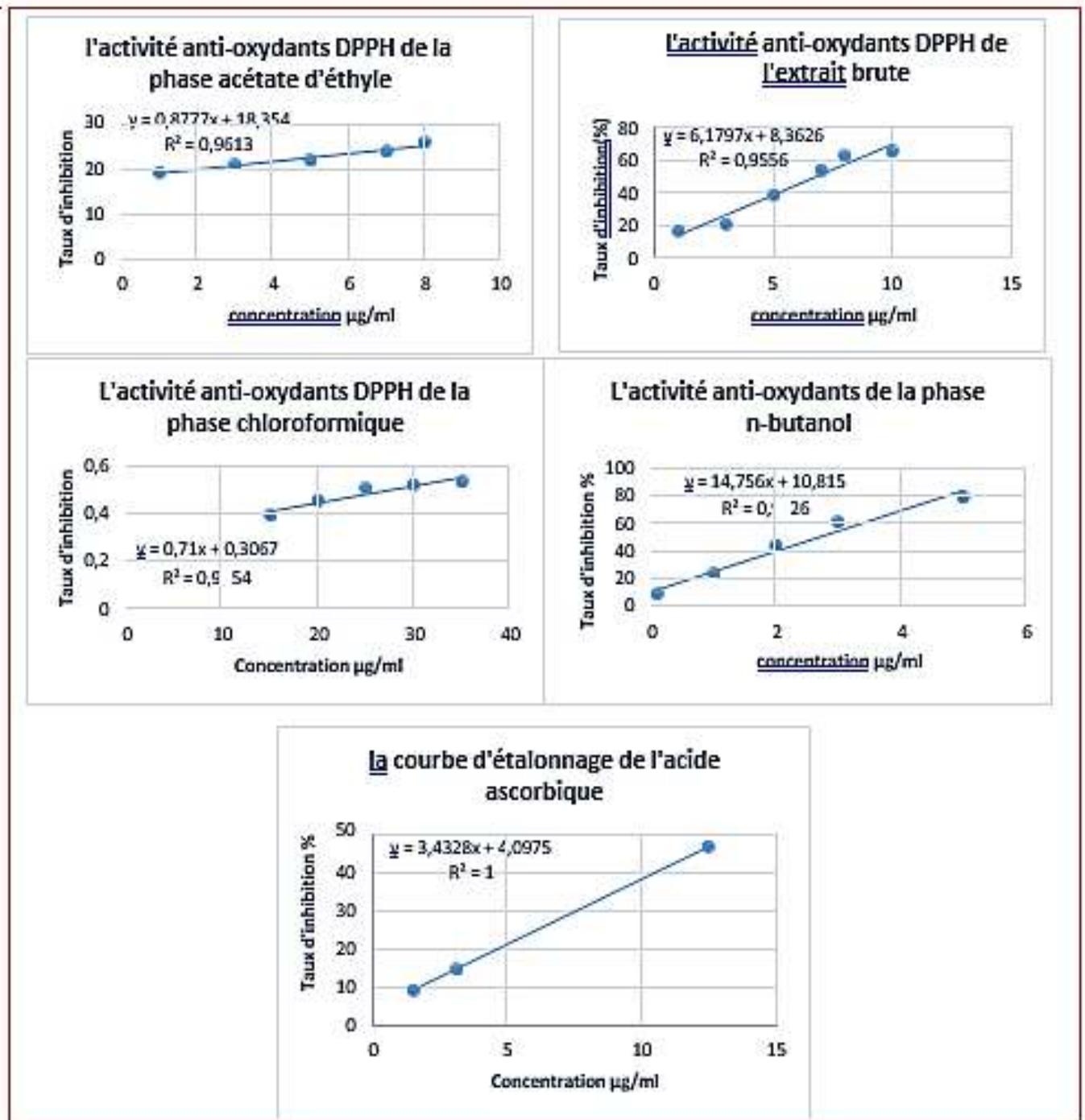
#### V.3.1. Activités antioxydantes :

Quatre méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante des trois extraits (chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol): le test de DPPH<sup>·</sup>, ABTS<sup>·+</sup>, FRAP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

##### V.3.1.1. Test de piégeage du radical DPPH<sup>·</sup> :

L'activité antioxydant des extraits vis-à-vis du radical DPPH<sup>·</sup> a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par le passage de la couleur du violet au jaune mesurable à 515 nm. En calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant afin de tracer la courbe qui représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait pour déterminer l'IC<sub>50</sub>. Cette concentration nécessaire pour inhiber 50% du radical DPPH<sup>·</sup>. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH<sup>·</sup> puis les comparés par le référence (acide ascorbique).

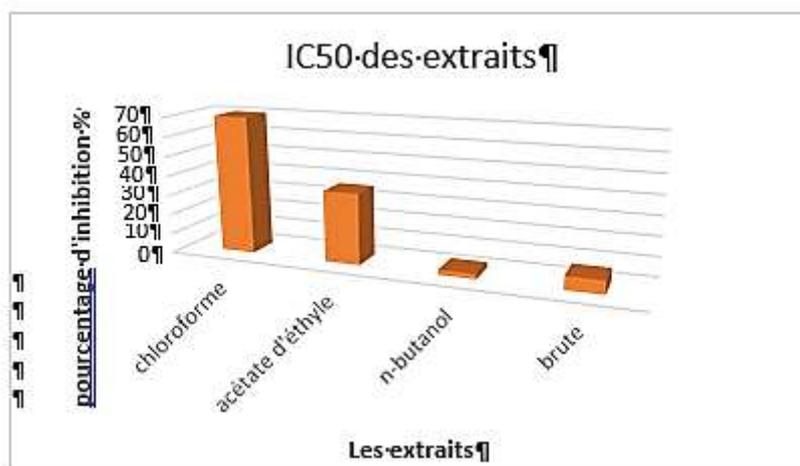
Les résultats sont représentés par la figure suivante



**Figure 60** : Représentation graphique des pourcentages d'inhibitions du radical DPPH en fonction des concentrations des extraits et l'acide ascorbique.

**Tableau (5):** Activité antioxydante exprimée en IC50 des extraits de l'espèce *La Ruta garveolens*.

| Extrait          | IC50(mg/ml)±Ecart type |
|------------------|------------------------|
| Chloroforme      | 69,9905±0,4244         |
| Acétate d'éthyle | 36,0555±1,9715         |
| n-butanol        | 2,6555±0,2188          |
| Brute            | 6,7377±0,1612          |



**Figure 61 :** Histogramme présente l'activité antioxydant exprimée en IC50 des extraits vis-à-vis le radical DPPH'.

Les résultats montre que la valeur de l'IC50 obtenu pour l'acide ascorbique égale à 0,6824863mg/ml qui est utilisé comme une molécule de référence, elle est inférieure à celles des extraits et selon la définition la valeur de l'IC50 est inversement proportionnelle avec l'activité antioxydant, donc l'extrait n-butanol est plus efficace en tant que inhibiteur en comparaison aux autres extraits qui possède une IC50 d'ordre de 2,6555 mg /ml cette valeur est inférieure à celle d'extrait brute 6,7377 mg/ml. L'acétate d'éthyle présente 36,0555 mg/ml suivi par Chloroforme avec 69,9905 mg/ml.

En effet, les extraits ayant la plus grande capacité de piégeage des radicaux sont les extraits obtenus par des solvants polaires et moyennement polaires : n-butanol et acétate d'éthyle. Ces résultats peuvent être expliquer par la richesse de cette plante en composés

Antioxydants polaires et moyennement polaires solubles dans le n-butanol et l'acétate d'éthyle tel que les polyphénols.

### **V.3.1.2. Test de piégeage par le cation radicalaire ABTS<sup>•+</sup> :**

Pour valider les résultats de l'activité antioxydant des extraits obtenu précédemment par le test anti-radicalaire du DPPH'on a utilisé le test d'ABTS<sup>•+</sup> (piégeage d'un proton du radical cationique ABTS<sup>•+</sup>).

Le piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup> est une méthode efficace déterminant l'activité antioxydant pour une large diversité des substances antioxydants donateurs d'hydrogène ou piégeurs de radicaux. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS<sup>•+</sup> de coloration bleu-vert en le transformant en ABTS<sup>++</sup> incolore par piégeage d'un proton.

Les valeurs des absorbances enregistrées au cours de l'expérimentation permirent les calculs en pourcentages d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup>. Ces pourcentages augmentent proportionnellement en fonction des concentrations des extraits.

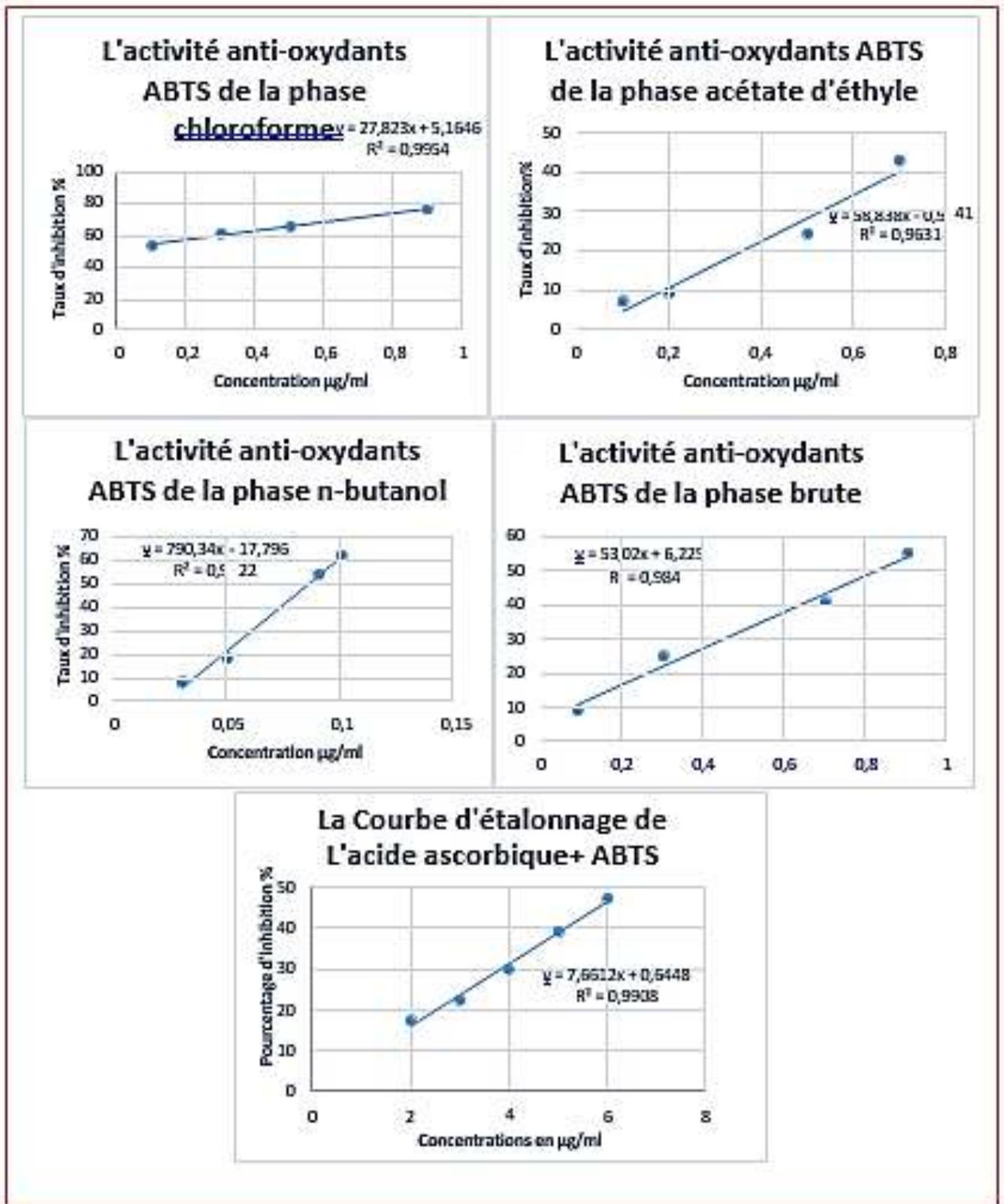
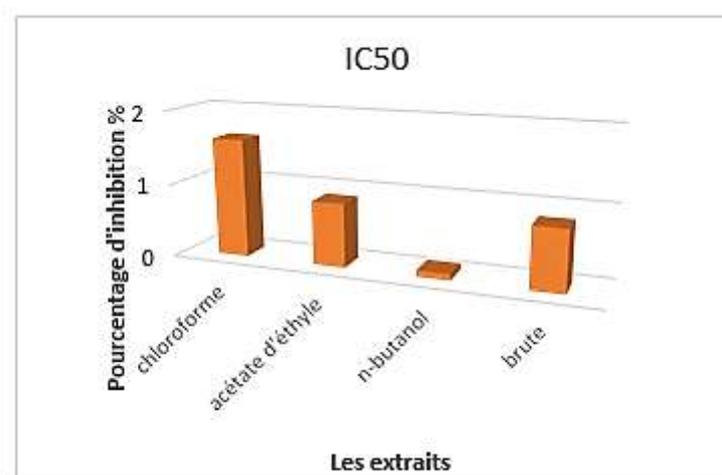


Figure 62 : Présentation graphique des pourcentages d'inhibitions de l'ABTS<sup>++</sup> en fonction des concentrations.

**Tableau(6):** Le pouvoir antioxydant d'ABTS<sup>•+</sup> (exprimé par IC<sub>50</sub> (en mg /ml)) de référence standard et des extraits testés.

| Extract          | IC <sub>50</sub> (mg/ml)±Ecart type |
|------------------|-------------------------------------|
| Chloroforme      | 1,6114±0,0122                       |
| Acétate d'éthyle | 0,8661±0,0039                       |
| n-Butanol        | 0,0857±0,0013                       |
| Brute            | 0,8256±0,078                        |

D'après les résultats, le pourcentage d'inhibition du radical augmente avec l'augmentation de la concentration soit pour la référence standard (l'acide ascorbique) ou pour les différents extraits de la plante étudiée. Les valeurs des IC<sub>50</sub> des différents extraits donnent une idée sur leurs efficacités.



**Figure 63 :** L'activité antioxydants exprimée en IC<sub>50</sub> des extraits vis-à-vis radical ABTS<sup>•+</sup>.

L'IC<sub>50</sub> obtenu pour l'acide ascorbique est égale à 6,4422mg/ml. Cette valeur est inférieure à celles des extraits donc la référence standard possède une activité antioxydante très élevée. L'extrait n-butanol présente une IC<sub>50</sub> de l'ordre de 0,0857mg /ml inférieur à celles de l'extrait brute 0,8256mg/ml, acétate d'éthyle 0,8661mg/ml et chloroforme 1,6114mg/ml. On constate que l'efficacité inhibitrice est plus élevée respectivement dans l'extrait d'acétate et n- butanol que celui de chloroforme. on conclut que la partie aérienne de la plante possède une bonne activité de piégeage du radical ABTS<sup>•+</sup>.

### V.3.1.3. Réduction du Fer: FRAP

Dans la même procédure, le dosage FRAP donne une estimation directe des antioxydants ou réducteurs présentés dans un échantillon en fonction de sa capacité à réduire le couple  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ . Ce test mesure le changement d'absorbance à 700 nm en raison de la formation de  $Fe^{2+}$  de couleur vert à partir de  $Fe^{3+}$  oxydé incolore par l'action des antioxydants donneurs d'électrons. La courbe d'étalonnage (figure 67) est établie à partir de taux d'inhibition en fonction des absorbances lues pour la gamme de concentrations de l'acide ascorbique utilisée comme composé de référence.

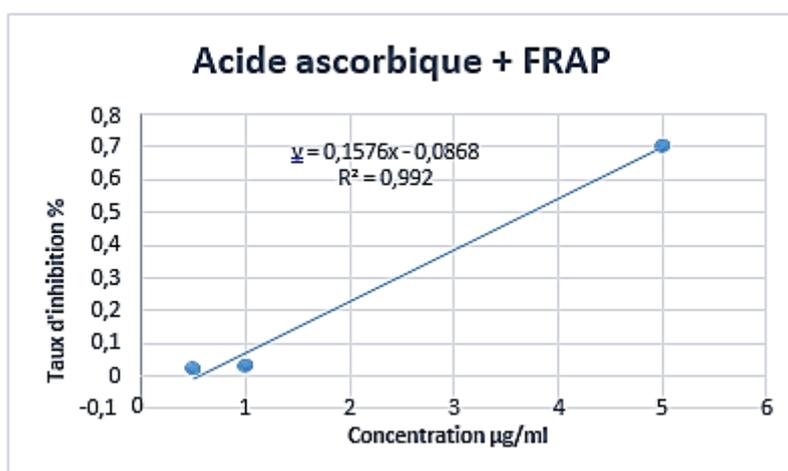


Figure 64 :L'acide ascorbique pour le test FRAP.

Le test est établi sur chaque échantillon. L'absorbance obtenue permet de déterminer la concentration équivalente d' $A_{asc}$  en µg en utilisant la formule suivante :

$$\text{Concentration éq. } A_{asc} \text{ en } \mu\text{g} = \frac{Abs - b}{a}$$

« a » représente la pente, « b » l'ordonnée à l'origine de la droite étalon.

Les résultats obtenus sont simplifiés à l'aide des histogrammes qui présentent la variation de pouvoir réducteur de chaque échantillon en fonction de la concentration (figures67).

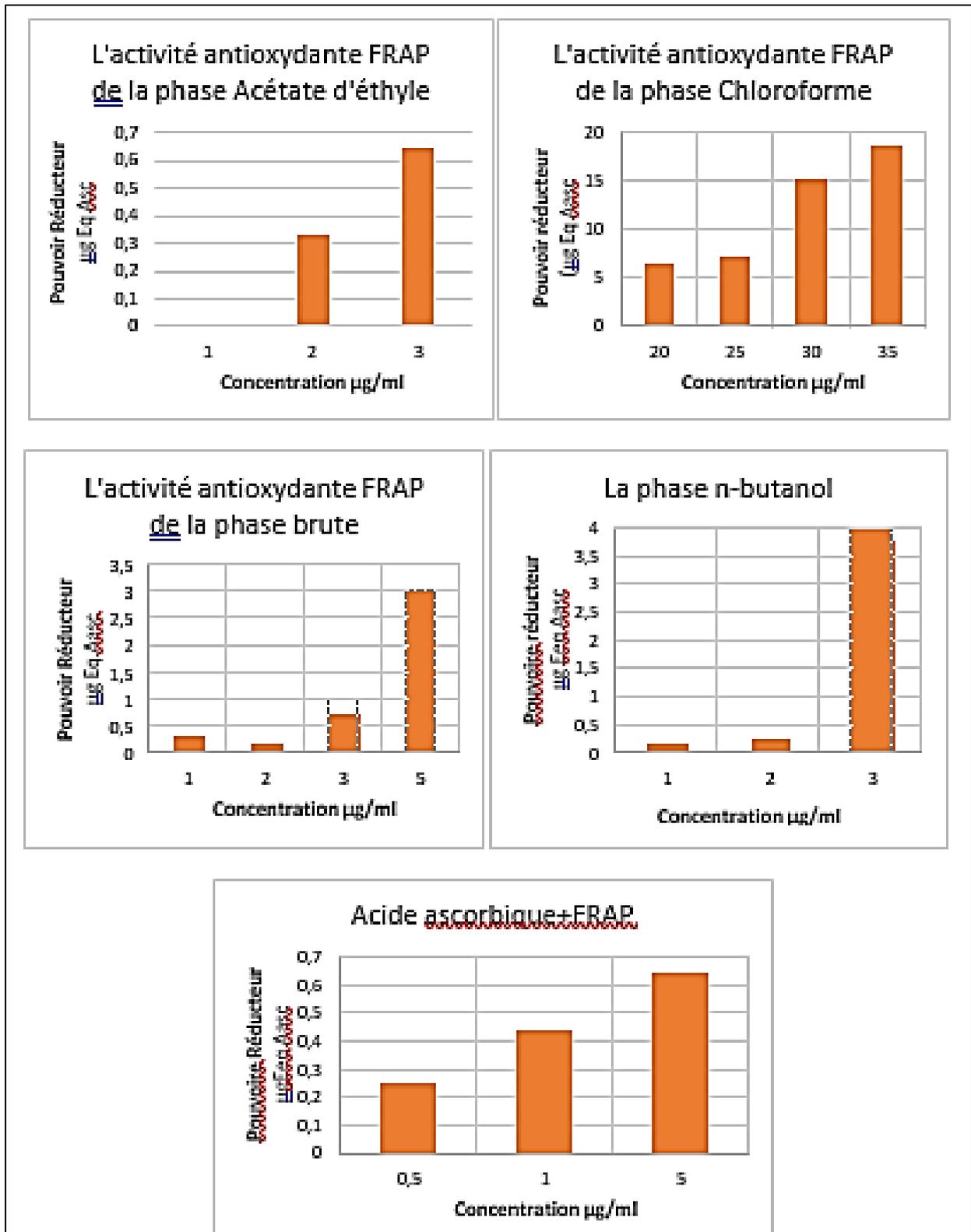


Figure 65 : l'activité antioxydant des quatre phases et de l'acide ascorbique par la méthode de FRAP.

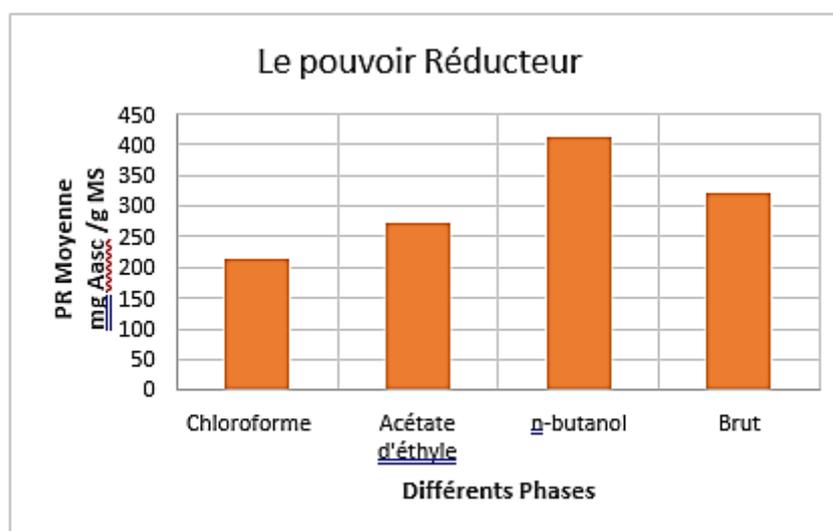
A partir des résultats obtenus (figure 65), on remarque que le pouvoir réducteur des

extraits de la plante dépend tout d'abord de la concentration utilisée c'est-à-dire la capacité de réduction du fer varie proportionnellement avec l'augmentation de la concentration des extraits.

En considérant en suite la concentration de l'échantillon étudié, le pouvoir réducteur signifie la capacité antioxydante et s'exprime en milligramme équivalent de l'acide ascorbique par gramme de l'extrait en milligramme équivalent de l'acide ascorbique par milligramme de la matière sèche pour les extraits des plantes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau(7) :** Pouvoir Réducteur des différents extraits de l'espèce *La Ruta garveolens*.

| Extrait          | PR ± ET (mg Eq Aasc /g) |
|------------------|-------------------------|
| Chloroforme      | 412,676±12,62           |
| Acétate d'éthyle | 131,133±10,56           |
| n-Butanol        | 534,095±9,44            |
| Brute            | 320,008±21,58           |



**Figure 66 :** Histogramme de Pouvoir réducteur des différents extraits.

En revanche la capacité de la réduction du fer dépend aussi le type d'extrait à tester. On remarque que la capacité de l'extrait n-butanol pour réduire le Fer est plus élevée à celles des deux extraits Acétate d'éthyle et chloroforme comparant avec l'acide ascorbique comme référence qui révèle une efficacité très élevée. On constate que le pouvoir réducteur est plus

important dans la phase n-butanol dans toutes la gamme des concentrations par rapport à la phase chloroforme et Acétate d'éthyle.

#### V.3.1.4. Piégeage du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :

L'activité antioxydant des extraits a été évaluée également in vitro en utilisant l'espèce réactive de l'oxygène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les résultats sont présentés dans ci-dessous (fig67) :

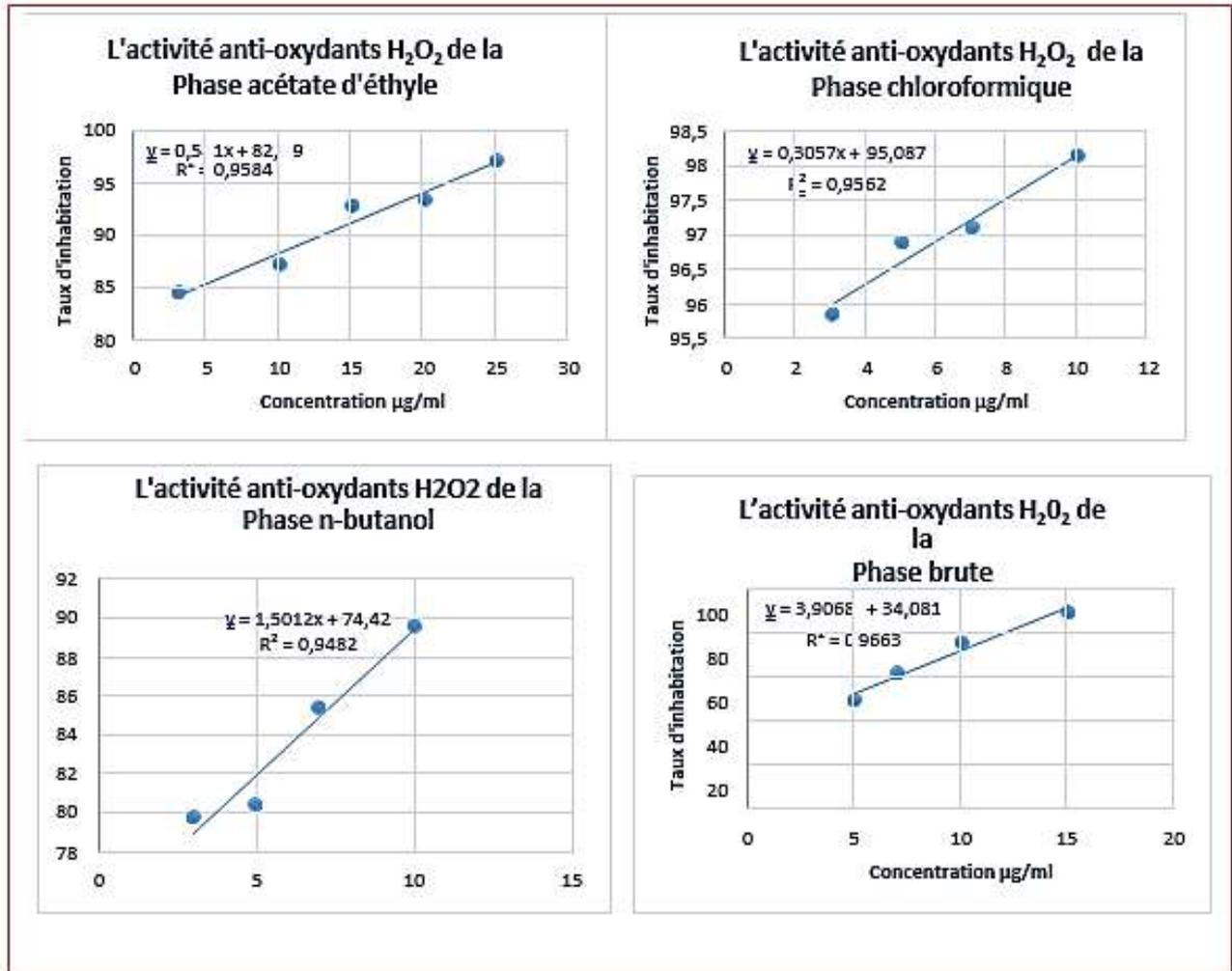
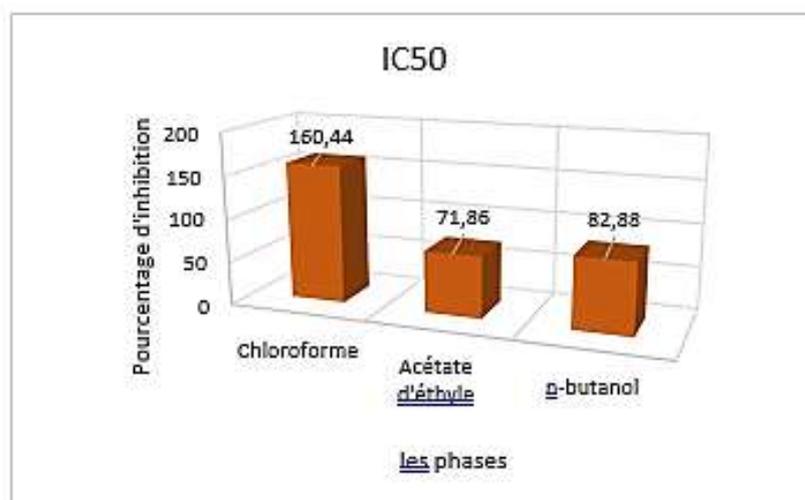


Figure 67 : Les pourcentages d'inhibitions de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction des concentrations.



**Figure 68 :** L'activité antioxydants exprimée en IC<sub>50</sub> des extraits vis-à-vis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle présente l'activité la plus efficace en terme d'inhibition du peroxyde d'hydrogène qui est de l'ordre de 71,86 mg/ml suivi par l'extrait butanolique qui présenté une activité de l'ordre de 82,88 mg/ml. En comparant l'activité du piégeage de ces extraits, on a été remarqué qu'ils présentent l'activité la plus élevée.

L'extrait chloroformique présente une activité inhibitrice d'ordre de 160,44mg/ml. Les résultats obtenus suggèrent que ce dernier a un pouvoir remarquable pour donner des électrons aux radicaux libres réactifs (ou espèces réactives), les convertisseurs en espèces non-réactives est stable et terminant la réaction en chaîne des radicaux libres.

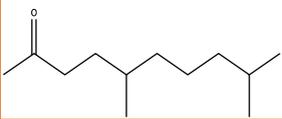
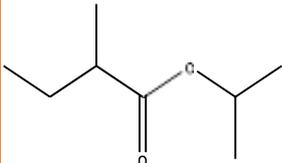
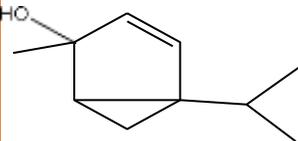
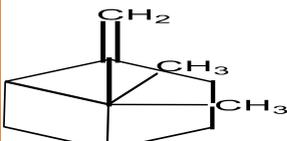
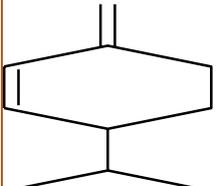
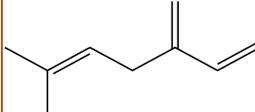
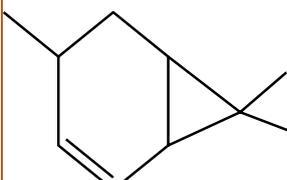
#### **V.4. Les huiles essentielles :**

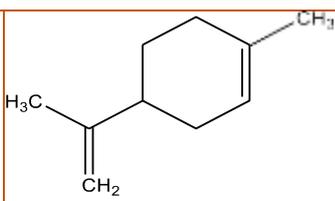
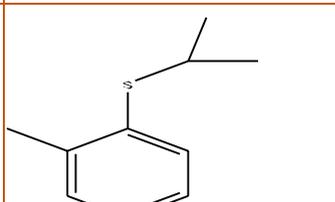
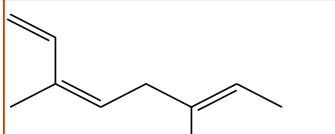
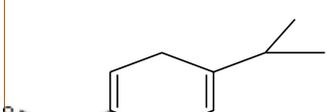
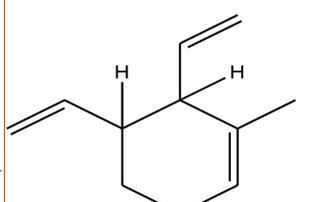
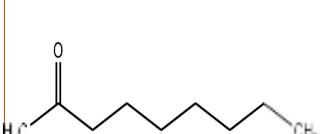
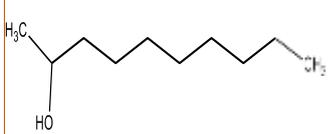
On s'est intéressé dans cette partie à l'étude phytochimique de l'espèce *Ruta graveolens*, ainsi que l'extraction des huiles essentielles et la détermination de la composition chimique de ces derniers, en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG/MS.

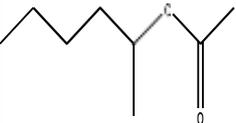
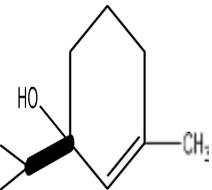
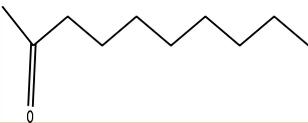
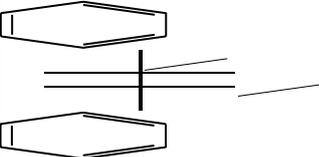
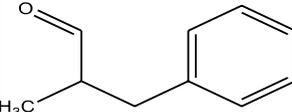
##### **V.4.1. Evaluation des composants chimiques des huiles essentielles de l'espèce *Ruta graveolens* par CG-MS :**

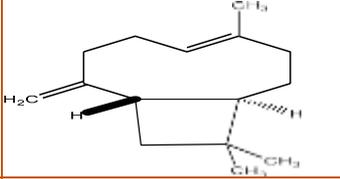
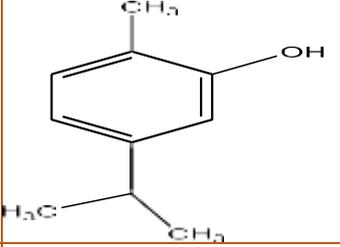
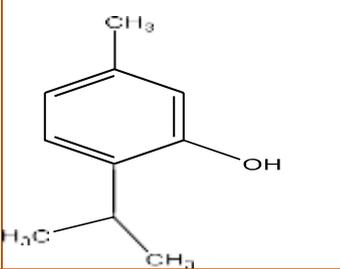
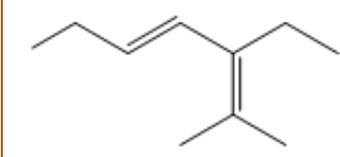
L'analyse par CG-MS des huiles essentielles du *Ruta graveolens* obtenues par hydro distillation de la matière végétale sèche, a permis d'identifier 64 composés qui représentent 100 % de la composition d'huile détectée. Les résultats ont été représentés dans le tableau et le profil GC-MS de l'huile essentielle a été donné dans le tableau (8)

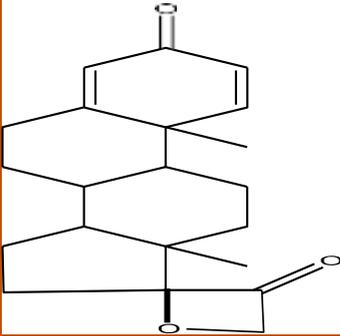
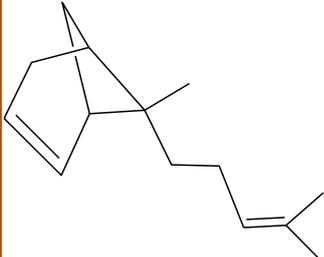
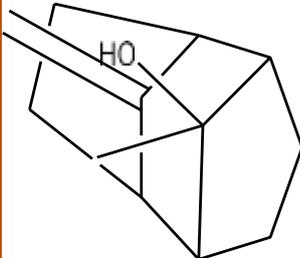
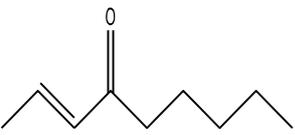
Tableau(8) : Composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta graveolens*.

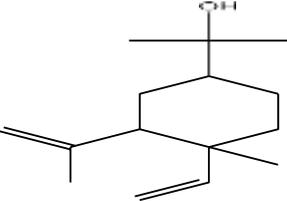
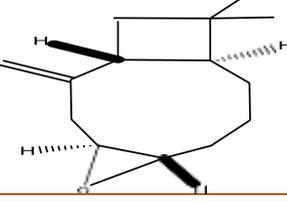
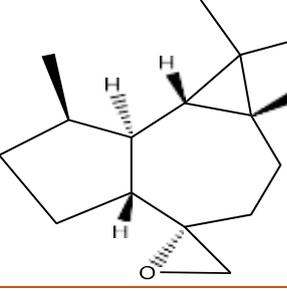
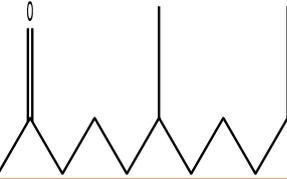
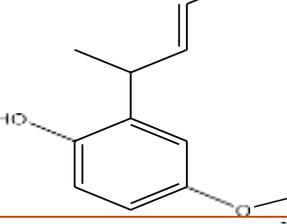
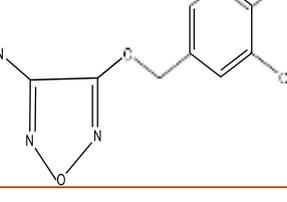
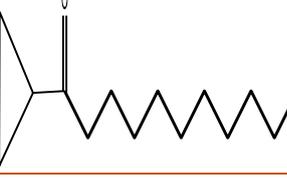
| Nombre des Pics | Composé  | Structure   | Nom systématique   | Aire % | Tr    |
|-----------------|--|---|--|--------|-------|
| 1               | 2-Undecanone, 6,10-dimethyl                            |    | 6,10-Dimethyl-2-undecanone   | 0,91   | 3,093 |
| 2               | Butanoic acid, 2-methyl-, 1-methylethyl ester          |    | 1-Methylethyl 2-methylbutanoate  | 0,13   | 3,295 |
| 3               | Bicyclo [3.1.0] hex -2-ene, 2-methyl-5-(1-methylethyl) |    | Bicyclo [3.1.0] hex-3-en-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha. 2. alpha., 5.alpha.) | 0,08   | 3,360 |
| 4               | Alpha.-pinene  |   | triméthyl-2, 6,6-bicyclo [3.1.1]hept-2-ène   | 0,08   | 3,466 |
| 5               | 2-Hexenal,(E)  |  | (E)-Hex-2-ena  | 0,08   | 3,746 |
| 6               | beta.- phellandrene                                    |  | 3-méthylidène-6-(propan,2,yl)cyclohex-1-ène  | 0,42   | 4,561 |
| 7               | beta.-Myrcene  |  | 7-méthyl-3-méthylidèneocta-1,6-diène   | 0,06   | 4,963 |
| 8               | (+)-4-Carene   |  | (1S, 4S, 6R)-4, 7,7-trimethylbicyclo[4,1]hept-2-ene  | 0,05   | 5,638 |
| 9               | D-Limonène   |   | 1-méthyl-4-(prop-1-  | 0,86   | 5,887 |

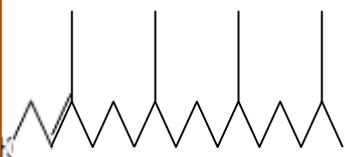
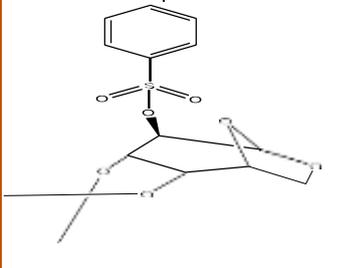
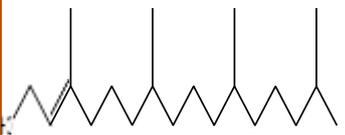
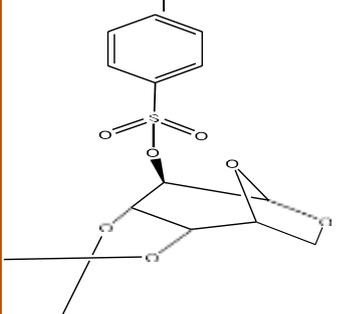
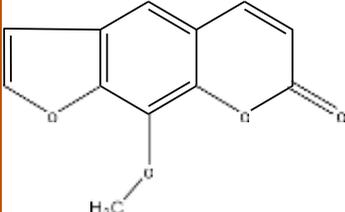
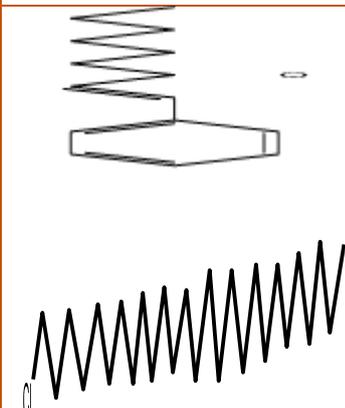
|    |   |   |  |       |         |
|----|---|---|--|-------|---------|
|    |   |  <p>Limonène</p> | en-2- yl) cyclohex- 1-ene              |       |         |
| 10 | Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-          |                  | 1-methyl-2-propan-2-ylsulfany lbenzene | 0,47  | 6,19    |
| 11 | cis-β-Ocimene                                 |                  | 1,3, 6-Octatriene ;3,7-dimethyl-(Z)-   | 0,06  | 6,744   |
| 12 | 1,4Cyclohexadiene,1-methyl-4-(1-methylethyl)- |                 | 1,4-p-Menthadiene                      | 0,77  | 6,871   |
| 13 | Octaldehyde                                   |                | Octanal                                | 0,05  | 6,980   |
| 14 | Cyclohexene,5,6-diethenyl-1- methyl           |                | 5,6-bis (ethenyl)-1-methylcyclohexene  | 0,19  | 9,694   |
| 15 | 1-Octanol                                     |                | Octan-1-ol                             | 0,13  | 10,242  |
| 16 | 2-Nonanone                                    |                | Nonan-2-one                            | 10,12 | 10,464  |
| 17 | Nonanal                                       |                | Nonan-1-al                             | 0,20  | 10,634  |
| 18 | 2-Nonanol                                     |                | Nonan-1-ol                             | 0,51  | 10 ,926 |

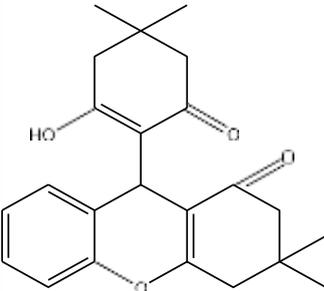
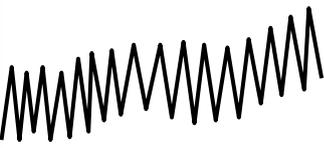
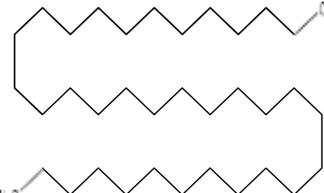
|    |   |   |  |       |            |
|----|---|---|--|-------|------------|
| 19 | 2-Octanol, acétate                            |    | [(2 <i>S</i> )-octan-2-yl]<br>acétate            | 0,13  | 11,077     |
| 20 | 3-Cyclohexen-1-ol, 4-méthyl-1-(1-méthylethyl) |    | p-Menth-1-én -4-ol                               | 0,13  | 13,50<br>9 |
| 21 | 1-Decanol                                     |    | Decan-1-ol                                       | 0,19  | 14,243     |
| 22 | 2-Decanone                                    |    | Decan-2-one                                      | 4,58  | 14,522     |
| 23 | 2-Decen-1-ol, (E)                             |    | (E)-dec-2-en-1-ol                                | 0,09  | 14,743     |
| 24 | 2-Acetoxytridecane                            |  | tridecan-2-yl acétate                            | 4,89  | 15,048     |
| 25 | Cyclohexane, 3,4-diethenyl-3-phenyl-          |  | (3,4-diméthyl-4-<br>phenylhexan-3-yl)<br>benzene | 0,17  | 16,499     |
| 26 | 2-Undecanone                                  |  | undecan-2-one                                    | 0,06  | 17,160     |
| 27 | Propanal, 2-méthyl-3-phényl-                  |  | 2-méthyl-3-phényl-<br>propanal                   | 0,29  | 17,608     |
| 28 | 2-Undecanone                                  |  | undecan-2-one                                    | 30,16 | 18,783     |
| 29 | 2-Nonadecanone                                |  | Nonadecan-2-one                                  | 5,29  | 18,967     |

|    |                      |   |   |      |        |
|----|----------------------|---|---|------|--------|
| 30 | 2-Tridecanone        |    | Tridecan-2-one  | 8,83 | 19,154 |
| 31 | Caryophyllene        |    | (1R, 4E, 9S)-4,11,11-triméthyl-8-méthylidènebicyclo [7.2.0] undéc-4-ène | 0,81 | 21,185 |
| 32 | 2-Dodecanone         |    | Do decan-2-one  | 0,46 | 21,626 |
| 33 | Carvacrol            |   | 2-méthyl-5-(propan-2-yl) phénol   | 0,07 | 22,428 |
| 34 | Thymol               |  | 5-méthyl-2-(propan-2-yl)-phénol   | 1,20 | 22,652 |
| 35 | 2-Dodecanone         |  | dodecan-2-one   | 2,47 | 22,824 |
| 36 |                      |  | (2S, 3S)-2-Acetoxy-   | 5,70 | 23,067 |
|    | 2-Acetoxytetradecane |  | 3-(tosylmethyl) tetradecane-4-one                                       |      |        |

|    |   |   |  |      |        |
|----|---|---|--|------|--------|
| 37 | 3-Oxo-androsta-1,4-dien-1,7.beta ; -spiro-2'-3'-oxo-oxetane |    | 10,13-dimethylspiro [7,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthrene-17,2'-oxetane]-3,3'-dione | 0,07 | 23,781 |
| 38 | alpha - Bergamotene   |    | Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene,2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentyl)-   | 0,25 | 24,392 |
| 39 | Trans fernesol  |  | 2,6,10-Dodecatrien-1-ol,3,7,11-trimethyl-  | 0,06 | 24,658 |
| 40 | 9-Methyl-10-methylenetricyclo [4.2.1.1 (2,5)] decan-9-ol    |  | 9-Methyl-10-methylenetricyclo [4.2.1.1(2,5)] decan-9-ol  | 0,28 | 25,949 |
| 41 | /   | /   | /  | 0,06 | 26,240 |
| 42 | 2-Tridecanone   |  | Tri decan-2-one  | 0,92 | 27,698 |
| 43 | 2-Nonen-4-one   |  | (E)-non-2-en-4-one   | 3,74 | 30,054 |

|    |  |   |  |      |        |
|----|--|---|--|------|--------|
| 44 | Cyclohexanemethanol, 4-ethyl-.alpha.,.alpha.,4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,3.alpha |    | (1S, 2S, 4R)-(-)- $\alpha$ ,<br>$\alpha$ -dimethyl-1-vinyl-omenth-8-ene-4-methanol                                     | 0,08 | 31,247 |
| 45 | Caryophyllene oxide  |    | (1R, 4R, 6R, 10S)-4, 12, 12-trimethyl-9-methylidene-5-oxatricyclo[8.2.0.0.4,6]dodecane                                 | 0,83 | 32,250 |
| 46 | 5-Isopropyl-6-methyl-hepta-3,5-dien-2-ol   |    | (3E)-6-methyl-5-propan-2-ylhepta-3,5-dien-2-ol   | 0,05 | 34,649 |
| 47 | Aromadendrene oxide-(2)  |   | (1aR, 4S, 4aR, 7R, 7aS, 7bS)-1,1,7-trimethylspiro[2,3,4 a,5,6,7,7a,7b-octahydro-1aH-cyclopropa[e]azulene-4,2'-oxirane] | 0,15 | 34,834 |
| 48 | 2-Undecanone, 6,10-dimethyl  |  | 6,10-dimethylundecan-2-one   | 1,47 | 35,259 |
| 49 | Phenol,2-(2-penta-4-yl)-4-methyl   |  | 4-methoxy-2-[(E)-pent-3-en-2-yl]phenol   | 0,07 | 37,672 |
| 50 | Furazan-3-amine,4-(3,4methylenedioxybenzyloxy)   |  | Furazan-3-amine, 4-(3,4-methylenedioxybenzyloxy)-  | 0,25 | 38,789 |
| 51 | 1-Dodecanone ,1-cyclopropyl-   |  | 1-cyclopropyldodecan-1-one   | 0,79 | 39,112 |

|    |   |   |  |      |             |
|----|---|---|--|------|-------------|
| 52 | 3, 7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol   |    | 3, 7,11,15-Tetramethyle-2-hexadecen-1-ol                       | 0,17 | 43,374      |
| 53 | 1,6-Anhydro-4-(3,4-methylenedioxyphenylmethylamino)-2-O-tosyl-4-deoxy-b-d-glucopyranose |    | 1,6-anhydro-3,4-o-isopropylidene-2-tosyl-b-d-galactopyranose   | 0,31 | 43,857      |
| 54 | 3, 7, 11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol  |    | 3, 7, 11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol                       | 0,10 | 45,118      |
| 55 | 1,6-Anhydro-4-(3,4-methylenedioxyphenylmethylamino)-2-O-tosyl-4-deoxy-b-d-glucopyranose |   | 1,6-anhydro-3,4-o-isopropylelidene-2-tosyl-b-d-galactopyranose | 0,10 | 45 ,63<br>2 |
| 56 | Methoxsalen   |  | 9-méthoxyfuro [3,2-g] chromen-7-one                            | 0,36 | 46,500      |
| 57 | 1-Nonen-3-one, 1-phenyl-  |  | 1-Nonen-3-one, 1-phenyl-                                       | 0,12 | 46,688      |
| 58 | Heptacosane, 1-chloro   |  | 1-Chloroheptacosane  | 0,20 | 47,157      |

|                |   |   |   |        |               |
|----------------|---|---|---|--------|---------------|
| 59             | Tetracosane   |    | Tetracosane   | 4,32   | 47,725        |
| 60             | 1H-Xanthen-1-one, 2, 3, 4,9-tetrahydro-9-(2-hydroxy-6-oxo-1-cyclohexenyl) |    | 9-(2-hydroxy-4,4-dimethyl-6-oxocyclohexen-1-yl)-3,3-dimethyl-4,9-dihydro-2H-xanthen-1-one | 1,80   | 48,660        |
| 61             | Heptadecane, 8-methyl-  |    | 8-methylheptadecane   | 0,10   | 49,307        |
| 62             | Eicosane  |   | Eicosane  | 0,09   | 49,748        |
| 63             | tetratriacontane  |  | tetratriacontane  | 1,42   | 51,407        |
| 64             | Hexatriacontane   |  | Hexatriacontane   | 1,16   | 51,448        |
| <b>TOTAL :</b> |   |   |   | 100.00 | 523120<br>106 |



**Figure69** : Cycle de distribution de familles de la composition chimique d'H.E de *Ruta graveolens*.

Les résultats de l'analyse par Chromatographie gazeuse - Spectrométrie de masse de la composition chimique de l'HE sont présentés dans le tableau (8), dans lequel les composés identifiés sont listés suivant l'ordre de prédominance. Au total 64 composés ont été identifiés ce qui correspond à un pourcentage de 100 % par rapport à l'ensemble des constituants isolés.

2-Undecanone le constituant majoritaire de l'HE (30,22%), suivi du 2-Nonanon (10,12%), du 2-Tridecanol(8,83%), du 2-Acetoxytétradécane(5,70%) et du 2-Nonadecanone (5,29) .

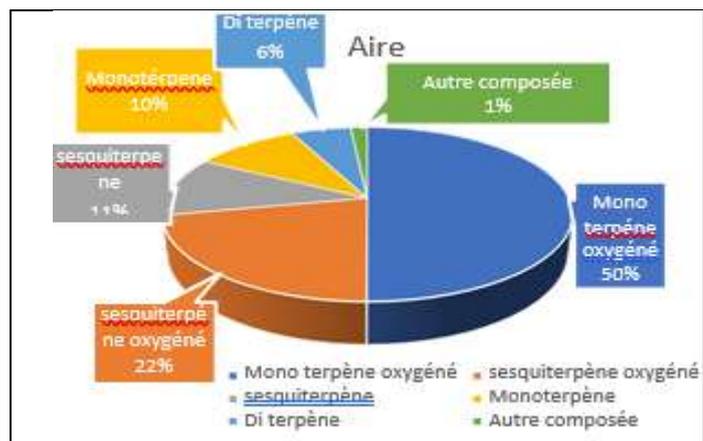
Biochimiquement parlant, cette HE est composée essentiellement du Mono terpène oxygéné (50,03 %) suivis des sesquiterpènes oxygéné (21,78 %). Les sesquiterpènes sont à un taux assez important (11,02 %), suivis par des mono terpènes (10%). Enfin, les composés minoritaires sont des autres composées (1,57%) telle que les oxydes. (Tableau9).

**Tableau (9)** : Représente les familles des composés identifiés de *Ruta graveolens* et leurs proportions :

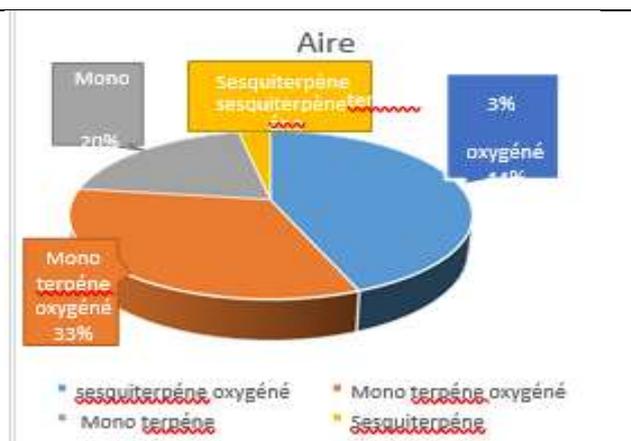
| Les composé           | Mono-terpène oxygéné | Sesquiterpène oxygéné | Sesquiterpène | Mono-terpène | Di terpène | Autre composée |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|---------------|--------------|------------|----------------|
| Le pourcentage %      | (50,03 %)            | (21,783%)             | (11,02 %)     | (10 %)       | (5,6 %)    | (1,567 %)      |
| Le nombre des composé | 20                   | 15                    | 10            | 9            | 6          | 4              |

Etude comparative de la composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta graveolens* de région de Texanna, wilaya de Jijel(2019) :

Une étude comparative de la composition chimique a été réalisée sur l'huile essentielle de l'espèce *Ruta graveolens*, cette étude montrée que l'H.E de cette plante a des compositions chimiques différentes d'une région à une autre, donc des composés majoritaires différents, Cette différence peut être liée à la nature du sol, au climat, à la période de récolte, à la durée de séchage et à d'autres paramètres.



**Figure70** : Cycle de distribution des composés de la composition chimique d'H.E de *Ruta graveolens* de Mila.



**Figure71** : Cycle de distribution des composés de la composition chimique d'H.E de *Ruta graveolens* de texanna.

Etude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de notre espèce *Ruta graveolens* récolté dans Mila a montré que :

d'après le cycle de distribution on ne constate que l'huile essentielle du *Ruta graveolens* de T constituée de la même famille présente majoritairement avec des pourcentages différents, Même si Le produit majoritaire est le même(2- Un decanone).

Ces différences de concentrations pourraient être liées aux procédés d'extraction, à la période récolte, à la maturation de la plante, ainsi qu'à la nature du sol.

V.3.2. Rendement des huiles essentielles :



Figure72 : L'histogramme de Rendement des huiles essentielles.

La masse de l'huile essentielle récupérée de l'espèce est de 0,1395g, et la masse de la plante sèche est de 200g ; et comme le rendement étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle récupérée sur la masse utilisée de la plante que multiplie par cent, alors le rendement est : ( $R = 0,069\%$ ). Ce qui confirme la richesse de la plante *Ruta gravelons* en métabolites secondaires, par rapport aux autres espèces de la même famille étudiées, **MESSAI Samah** et al. 2011 il est obtenu une variété de rendement 0,2% chez *Ruta gravelons* en Mitidja (Algérie).

On peut déduire que le rendement en huile essentielle d'une même espèce peut varier, et ceci en fonction de plusieurs paramètres, telle que : l'espèce de la plante, le temps, de récolte, la méthode d'extraction.

---

---

## *Conclusion et perspective*

---

---

## **Conclusion et perspective**

L'étude que nous avons réalisée dans ce mémoire consiste d'une part en l'étude phytochimique et l'étude des activités biologiques. L'évaluation phytochimique a révélé la richesse de *Ruta graveolens* en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes, tanins catéchique, des terpènes, des alcaloïdes dans la plante. Quantitativement, l'évaluation du contenu des extraits en poly phénols totaux adoptant la présence des quantités importantes des polyphénols dans chaque extrait mais avec des quantités différentes, extrait n-butanol contient la plus grande teneur en polyphénols, suivi par Acétate d'éthyle et enfin extraits Chloroforme. De même le dosage des flavonoïdes montré que l'extraits qui contient la teneur la plus élevée c'est le n-butanol et acétate d'éthyle respectivement.

D'autre part l'étude de l'activité biologique telle que l'activité antioxydante des extraits issus de l'espèce *Ruta graveolens* par la méthode du piégeage du radical libre DPPH $\cdot$  dont des résultats montrent que l'extrait n-butanol possède une bonne activité est plus efficace en tant que ( $2,6555\pm 0,2188$ mg/ml), suivi par l'acétate d'éthyle puis Chloroforme.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode d'ABTS $\cdot^+$  montre que l'extrait n-butanol possède une activité plus élevée ( $0,0857\pm 0,0013$ mg/ml) on montre que la partie aérienne de la plantes est possède une bonne activité anti oxydante.

En revanche, l'évaluation de l'activité antioxydante par la réduction de fer (FRAP) dépend aussi du type d'extrait à tester. On remarque que la capacité de extrait n-butanol pour réduire le Fer est plus élevée à celles des deux extraits Acétate d'éthyle et chloroforme.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> montre que l'extrait acétate d'éthyle représente l'activité la plus efficace en termes d'inhibition du peroxyde d'hydrogène suivi par extrait n-butanolique, puis par extrait chloroformique.

Par ailleurs, l'évaluation de l'activité anti inflammatoire par la méthode de la stabilisation des membranes des globules rouges (HRBC) de cette plantes montre que *Ruta Graveolens* est une plante cytotoxique car elle provoque éclatement des globules rouge(les extraits provoquent hémolyse),

Les Analyses qualitatives des huiles essentielles par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG /MS ont permis d'identifier 64 composés dont cinq produits majoritaires qui sont : 2-Undecanone (30,22%), 2-Nonanon (10,12%), du 2-Tridecanol (8,83%), 2-Acetoxytetradecane (5,70%), et du 2-Nonadecanone (5,29 %)

Cela ouvre la voie à d'autres études qui complètent nos travaux en raison de la richesse de *Ruta graveolens* en métabolites secondaires telle que les alcaloïdes qui sont responsable de de la cytotoxicité qui peuvent avoir une activité anti cancéreuse.

---

---

## *Liste des références*

---

---

**liste des références :**

[1] : ATTIYET A.,1995 .Plantes médicinales et aromatiques dans le monde Arabe .Ed . Institution arabe pour les études et publication, Beyrouth , 296P.

[2]: Baba Aissa F.(1999) Enncyclopédie des plantes utiles (Flore dAlgérie et du Maghreb) . Substances végétales d'Afrique , d'Orient et d'Occident , Ed . Edas , 178 p .

[3]: Badiaga M. (2011) Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* (smith). Une plante médicinale artificiel récoltée au Mali , Thèse de Doctorat , Université de Bamako , 137 p.

[4]: Hammiche V. et Gueyouche R.(1988) Plantes médicinales et thérapeutiques , 1ère partie : les plantes médicinales dans la vie moderne et leur situation en algérie, Annales de IINA El Harrach , Alger, 12 : (1) , 419-433.

[5]: Zeichen de Sa, R., Rey, A. et al .2000. Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) in mice. Journal of Ethnopharmacology,69: 93 – 98.

[6] : Baladehi., M et all. 2013. Pollen morphology of kanian species of *Anemone* L. & *Pulsatilla* Mill. (Rutaceae) and its implications, Acta Botanica Gallica: Botany Letters, Vol. 160. No. 1. pp. 19-26 .

[7] :Guy Deysson.(1979) .organisation et classification des plantes vasculaires. Tome(2), deuxième partie systématique; SEDES, paris 1979. pp. 326-329-331.

[8] : Spichiger R., Stutz de Ortega L., Flora de Paraguay: Rutaceae (Missouri botanical garden),1987.

[9] :Brizicky G. K.(1962). The genera of Rutaceae in the Southeastern United States, J. Arnold Arbor. 1962, 43, 80

[10] : Zeichen de Sa, R., Rey, A. et al .2000. Perinataltoxicology of *Ruta graveolens* (Rutaceae) in mice. Journal of Ethnopharmacology,69: 93 – 98 .

[11] : Gilkey, H. H. 1957. Weeds ofthe PacificNorth-west. Oregon State College, Oregon. P. 185.

[12] : Bossard, R. et Cuisance, P. 1981. Arbres Et Arbustes D'ornement Des RégionsTempérées Et Méditerranéennes, Paris, France.

[13] : adford Harry E., Ahles C., Ritchie 8e11.1968. Manual ofthe Vascular Flcira of congress catalog card No 68, P 28, 62,64.

- [14] :Harper, J.L,1977. Population biology of plants. Academic Presso London, U.K. P. 892.
- [15] : Malik, S., Coutinho Moraes, D. F., Mendonça do Amaral, F. M. & Sousa Ribeiro M. N. (2017). *Ruta graveolens: Phytochemistry, Pharmacology, and Biotechnology*. Springer International Publishing Switzerland [En ligne]. 177-204. DOI 10.1007/978-3-319-28669- 3\_4.
- [16] : Doerper, S. 2008. Modification de la synthèse des furo-Coumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique , Thèse de Nancy – Université. INRA
- [17] : Barthe, S. 2005. Les huiles essentielles. désintoxiquer et fortifier l'organisme, soulager vos maux grâce aux huiles essentielles. Un véritable - guide sur l'utilisation des huiles. Ed France exclusif, Paris, 254p .
- [18] : Lutge U., Kluge M., Bauer G.(2002) . Technique et documentation. Ed 3eme Botanique Lavoisier .Paris. 211 p. 2002.
- [19] :Bagchi, G.D., Dwivedi, P.D. et al . 2003. Variations in essential oil constituents at different growth stages of *Ruta chalepensis* on cultivation at North Indian Plains. *J Essent OilRes*, 15:263–264.
- [20] :Clarke, S. 2008. Essential oils, Ed 2. churchill livingstone, elsevier, p 42- 77.
- [21] :Georgetti,S .R. ,Casagrande,R.,Di Mabro,V.M., Azzolini Ana, E.C.S. Fonsica Maria , J.V. (2003) . Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoides by the chemiluminescence Methodes. *AAPS. Pharm . Sci* , 5(2) :p(1) :5
- [22] : J.M. Meynadier, N. Raison-Peyron.(1993) . Allergie aux parfums. *Re. Fr. Allergol.*, 37 (5) ,641 - 650. 1997.
- J.Brunton, « pharmacognosie photochimie, plantes medicinales », 1<sup>em</sup> Ed; Ed Lavoisier, Paris, 1993.
- [23] : TEISSEIRE P.J., « Chimie des substances odorantes ». Ed Tee et Doc., Lavoisier, Paris, France.480p. 1991.
- [24] : Raynaud ,J.(2006)Prescription et conseil en aromathérapie. Edition lavoisier.
- [25] : Duke, A .J., Duke, P.A.K., Duceille, J.L. 2008. *duke's handbook of Medicinal Plants of the Bible*. CRC PRESS. 528p.
- [26] : Samia AOUDHI ,(2010). «Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle ». Etude de 57 plantes recommandées par les herboristes, Faculte de medecine de Tunis - Master specialise en toxicologie 2010.

- [27] : Harborne.J.B, Swain.T.( 1969)."Perspectives in Phytochemistry", Academic Press, London, New York..
- [28] : Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., Mc Allister T.A. et al.(2008). "Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production". *Animal Feed Science and Technology*. 145: 209-228.
- [29] : VandermotenS,cussonM,FrancisF,HaubrueE(2008) .La biosynthese des isoprenoides chez les pucerons :un cible potentielle de nouveaux bio-insecticides biotechnolRE ,Agron.SocEviron ;vol.12 ;N°4 ;App451-460,2008.
- [30] : Duraffourd, C. Lapraz, J.C. et Chemti, R. 1997. la plante médicinale de la tradition à la science. Ed. Crancher, Paris, 538p.
- [31] : Graham T.L.( 1998). "Flavonoid and flavonal glycoside metabolism in arabidopsis ». *Plant physical and biochem*, 36(1-2):135-144..
- [32] : Paul I, "Encyc/opedie des plantes medicinales", 2nd Edition Larousse, Paris, 2001. [21]. Park H.J., Cha H. C. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society*. 7: 327-330. 2003.
- [33] : Lahouel M. 2005. « Interaction flavonoides-mitochondrie et role de la pro polis dans la prevention de l'apoptose induite par certains medicaments anticancereux ». These de doctorat de l'universite Mentouri de Constantine; Piquemal G. 2008 .
- [34] : Park H.J., Cha H. C. Flavonoids from leaves and exocarps of the grape Kyoho. *Korean journal of biological society*. 7: 327-330. 2003.
- [35] : Bellakhdar, J. 1997. *Medecine Arabe Ancienne et Savoir Populaire, La Pharmacopée Marocaine et Traditionnelle*, Ibis Press, France.
- [36] : Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.
- [37] : Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- [38] : Routray, W., & Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 409-424

- [39] : Chabot, G. G., Touil, Y. S., Pham, M. H., & Dauzonne, D. (2010). Flavonoids in cancer prevention and therapy: chemistry, pharmacology, mechanisms of action, and perspectives for cancer drug discovery. In *Alternative and complementary therapies for cancer* (pp. 583-612). Springer, Boston, MA. Chapitre II Les métabolites secondaires 29
- [40] : Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169
- [41] : Chaudhary, K., Singh, R., Kumar, V., & Kumar, S.(2003). *journal of scientific & INNOVATIVE RESEARCH*.
- [42] : Peterson, J., & Dwyer, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18(12), 1995-2018.
- [43] : Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*, 3, 222.
- [44] : Jain, C., Khatana, S., & Vijayvergia, R. (2019). Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(2), 494-498
- [45] : Zimmer, N., & Cordesse, R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Productions animales*, 9(3), 167-179.
- [46] : Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C.(2005). Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*, pp .11-13
- [47] : Audigié CI., Dupont G., Zonzain F.( 1995). *Principes des méthodes d'analyse biochimique*. Tome I. Chap. 2: Méthodes de fractionnement: filtration, sédimentation (centrifugation et ultracentrifugation), électrophorèse, chromatographie. Doin Editeurs, Paris: 7-84.
- [48] : Ezeonu,C.F.,chidume, I.G., udedi, C.s., 2001.insecticidal propertier of volatile extracts of orange peels. *Bioressources technology*. 76: 273-274.
- [49] :Bruneton J. (1999) *pharmacognoise, phytochimie, plantes médicinales*, (3eme édition). Paris, editions médicinales internationnales, editions Tec et Doc lavoisier. p. 1120. 20-Marouf A, (2002)-analyse instrumentale à l'usage des biologistes. 2eme édition Dar el Gharb, Oran. p. 17-24.
- [50] : Dave Omah;( 2003)- l'isolation, la caractérisation et l'évaluation des metabolites secondaires derives de plantes pour utilisation dans le domaine de la santé humaine, les plantes curatives, programme national de bio produits et de bio processus, agriculture et ...

- [51] : Baudoux,(2000). l'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles. Edition Atlantica,.
- [52] : Dorman H.J.D. et al.(2000).antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil, Journal of applied microbiology,88: 308-316.
- [53] : Bach-Nga PHAM.( 2003). Cahier de formation: Immunoglobulines monoclonales. Biologie médicale. Chap. : Electrophorèse des protéines du sérum. A. Daunizeau., 28: 26-46.
- [54] : Bégin D., Gérin M.(2002) . Solvants industriels. Les grandes familles de solvants organiques. Chap. 2: Utilisation et aspects physico-chimiques. Ed. Masson, 13-38.
- [55] : Bourguet E., Auge C. Les techniques de laboratoire: Purification et analyse des composés organiques. Chap. 2: L'extraction; Chap. 5: La chromatographie. Ellipses Edition Marketing S.A., 2008: 19-27; 77-96.
- [56] : Burgot G., Burgot J-L. Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales.
- [57] : A.F .N.O.R. ( Mai 1997 [22]) . «les huiles essentielles » analyse par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire chirale methode generate T75 -425; J-Goust « Thym et Sarriette », ed .par Actes sud, collection chronique du potager, 1999.
- [58] :**Balasaheb SN et Palb D. (2015)**. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. The Royal Society of Chemistry. 5: 27986-28006.
- [59]:**Georgieva,s., Boyadzhiev,L.,&Angelov,G.(2010)**.Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydante.
- [60]:**Brand-williams,w., Cuvelier,M.E.,&Berset,C.L.W.T.(1995)**.Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.LWT-Food science and Technology.
- [61] :**Lehucher-Michel, M.P. et al.(2001)**. *Stress Oxydant et Pathologies Humaines*. La Presse Médicale 30, p 1076-1081.
- [62] :**Fulbert, J. C., Cals, M. J.( 1992)**. Les Radicaux libres en biologie clinique. Pathol. Biol., 49:1.
- Tessier, F., &Marconnet, P. (1995)**. Radicaux libres, systèmes antioxydants etexercice. Science & sports, 10(1), 1-13.

- [63] : **Goudable, J., & Favier, A. (1997)**. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.
- [64] : **Costa, V., & Moradas-Ferreira, P. (2001)**. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular aspects of medicine*, 22(4-5), 217-246.
- [65] : **Papazian, L., Roch, A. 2008**. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë, édition Springer,
- [66] : **Médart, J. 2009**. Manuel pratique de nutrition. L'alimentation préventive et curative. Editions De Boeck Supérieur.
- [67] : **Gonzalez-Trujano, M.E., Carrera, D., Ventura-Martinez, R., Cedillo Portugal, E., Navarrete, A. 2006**. Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Rutachalepensis* L. In mice. *J. Ethnopharm.* 106, 129-135.
- [68] : **Vansant, G. (2004)**. Radicaux libres et antioxydants: principes de base. In Symposium «Antioxydants et alimentation». Institut Danone.
- [69] : **Sarr SO., Dior FA., Gueye R., Diop A., Diattak., Diop N., Ndiaye B et Diop YM. (2015)**. Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex Doniana* (Verbenacea). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 9(3) : 1263-1269.
- [70] : **Mbaibougadobé Set Ngagegni-Limbili AC., Gouollaly T., Koane JN., Ngaissona P., Loumpangou CN et Ouamba JM. (2017)**. Evaluation de l'activité anti-oxydante de trois Espèces de plantes utilisées dans le traitement de la goutte au Tchad. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle africaine*. 18(2): 28-35.
- [71] : **Hennebelle, T. (2006)**. Investigation chimique, chimio taxonomique et pharmacologique De Lamiales productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum*, *Ballota la rendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées) (Doctoral dissertation, Lille 1).
- [72] : **J.Sadique, W.A.Al-Rqobahs, E.I.Bughaiith et al.(1989)**.The bioactivity of certains medicinal plants on the stabilization of RBC membrane system, *Fitoterpia*, vol.10,n°5

[73] : *Mohamed Didi. Scientific Study and Research, Tlemcen University, Faculty of SNV, Department of Biology, Laboratory of Separation and Purification Technologies, 13000 Tlemcen, Algeria.*

[74] : Sarr SO., Dior FA., Gueye R., Diop A., Diatta k, Diop N., Ndiaye B et Diop YM. (2015). Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de Vitex Doniana (Verbenaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 9(3) : 1263-1269.

[75] : Mbaibougadobé Set Ngakegni-Limbili AC., Gouollaly T., Koane JN., Ngaissona P., Loumpangou CN et Ouamba JM. (2017). Evaluation de l'activité anti-oxydante de trois espèces de plantes utilisées dans le traitement de la goutte au Tchad. *Pharmacopées Médecine traditionnelle amatriceana*. 18(2) : 28-35.

[76] : Brand-williams, w., Cuvelier, M.E., & Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*.

## Résumé

Dans le cadre de la découverte du nouveau antioxydant à partir des sources naturelles, on s'est intéressé dans ce travail sur l'étude phytochimique de la plante (*Ruta graveolens*) : l'évaluation de la teneur en polyphénol et flavonoïde totaux, l'étude de leur activité biologique tel que l'activité antioxydante .

La première partie de cette étude concerne l'extraction et la quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes. Les résultats obtenus montrent que la phase n-butanolique présente la teneur maximale en poly phénol est en flavonoïdes , suivi par la phase acétate d'éthyle et dernière position la phase chloroformique .La deuxième partie a été l'étude de l'activité antioxydante des extraits de la plante en utilisant les techniques suivantes : piégeage du radical DPPH, le piégeage par le cation radicalaire ABTS<sup>+</sup>, réduction de fer FRAP et la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les méthodes de l'activité antioxydante ont montré que tous les extraits de la plante étudiée ont un pouvoir antioxydant important, grâce à leur richesse en constituants polyphénoliques. On a trouvé que l'extrait n-butanolique a une activité élevée par rapport à l'autre extraits dans les teste DPPH<sup>•</sup> , ABTS<sup>+</sup> et FRAP, et pour le teste H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extrait majoritaire est l'acétate d'éthyle. à la fin du l'étude, La technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de Masse (GC/MS) a permis l'analyse des Huiles essentielles de l'espèce *Ruta graveolens*. Les résultats montrent une composition riche en produits.

**Mots clés :** *Ruta graveolens*, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, huile essentielle, hémolyse, métabolites secondaires.

## Summary

In the context of the discovery of new antioxidants from natural sources, we were interested in this work on the phytochemical study of the plant (*Ruta graveolens*): the evaluation of the content of polyphenol and flavonoid total, the study of their biological activity such as antioxidant activity .

The first part of this study concerns the extraction and quantification of total polyphenols and flavonoids. The results obtained show that the n-butanolic phase has the maximum polyphenol content in flavonoids, followed by the ethyl acetate phase and the chloroformic phase. The second part was the study of the antioxidant activity of the plant extracts using the following techniques: trapping of the radical DPPH, trapping by the radical cation ABTS<sup>+</sup>, reduction of iron FRAP and reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The methods of antioxidant activity have shown that all extracts of the studied plant have an important antioxidant power, thanks to their richness in polyphenolic constituents. It was found that the n-butanolic extract has a slender activity compared to the other extracts in the DPPH<sup>•</sup> , ABTS<sup>+</sup> and FRAP, and for the majority extract H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> test is ethyl acetate. In the trioxime. At the end of the study, the gas chromatography technique coupled with mass spectrometry (GC/MS) allowed the analysis of the essential oils of the species *Ruta graveolens*. The results show a composition rich in products.

**Keywords:** *Ruta graveolens*, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, , essential oil, hemolysis, secondary metabolites.

## موجز

في سياق اكتشاف مضادات الأكسدة الجديدة من المصادر الطبيعية، كنا مهتمين بهذا العمل على الدراسة الكيميائية النباتية للنبات (*Ruta graveolens*): تقييم محتوى إجمالي البوليفينول والفلافونويد، ودراسة نشاطهم البيولوجي مثل النشاط المضاد للأكسدة .

يتعلق الجزء الأول من هذه الدراسة باستخراج وتقدير إجمالي البوليفينول والفلافونويد. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن المرحلة n-butanolic تحتوي على أقصى محتوى من البوليفينول في الفلافونويد، تليها مرحلة أسيتات الإيثيل والمرحلة الكلوروفورمية. كان الجزء الثاني هو دراسة النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات النبات باستخدام التقنيات حبس DPPH الجذري، والاحتجاز بواسطة الكاتيونات الجذرية ABTS<sup>+</sup>، وتقليل الحديد وتقليل H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. أظهرت طرق النشاط المضاد للأكسدة أن جميع مستخلصات النبات المدروس لها قوة مهمة مضادة للأكسدة، وذلك بفضل ثرائها في المكونات متعددة الأكسدة. وجد أن المستخلص n-butanolic له نشاط ضئيل مقارنة بالمستخلصات الأخرى في DPPH<sup>•</sup>، ABTS<sup>+</sup> و FRAP، وبالنسبة لاختبار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> المستخرج في الغالب هو أسيتات الإيثيل. في الثلاثي، سمحت تقنية الكروماتوغرافيا الغازية إلى جانب قياس الطيف الكتلي (GC/MS) بتحليل الزيوت الأساسية لأنواع مقابر روتا. تظهر النتائج تركيبة غنية بالمنتجات. الكلمات الرئيسية: مقابر روتا، البوليفينول، الفلافونويد، النشاط المضاد للأكسدة، الزيت العطري، انحلال الدم، المستقلبات الثانوية.