



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers
قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité: Biochimie

Intitulé:

Etude physicochimique, phytochimique et évaluation des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des extraits de *Ruta sp.*

Présenté par:

HANIFI Lamia & HEREM Ibtissem

Devant le Jury :

Président : Mme. BOUMERFEG Sabah	Professeur	Université de B.B.A.
Encadreur : M. BELLIK Yuva	MCA	Université de B.B.A.
Co-Encadreur : M. SID Nassim	MAA	Université de B.B.A.
Examineur : Mme. CHENOUF Nadia Safia	MAA	Université de B.B.A.

Année universitaire : 2021/2022

Résumé

Ruta sp est une plante médicinale et aromatique appartenant à la famille des Rutacées largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Dans le cadre de la contribution à la valorisation de cette plante médicinale, nous avons mené dans le présent travail l'analyse physicochimique, phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de différents extraits de la partie aérienne de *Ruta sp*. L'analyse physicochimique a révélé que la plante est riche en métabolites primaires soit 3,55% de matière grasse, 8,64% de protéines et 19,89% de sucres totaux. L'extraction a été réalisée par macération sous agitation en utilisant différents solvants (méthanol 70%, éthanol 70%, acétone 70% et aqueux). Les rendements obtenus sont respectivement 34,77 %, 32,34 %, 32,56%, et 21,98%. La quantification des polyphénols totaux, des flavonoïdes, et des tanins condensées dans les quatre extraits par des méthodes colorimétriques montrent la richesse également de cette espèce en métabolites secondaires. L'activité antioxydante est évaluée par différentes tests (DPPH, FRAP, CAT). L'extrait éthanolique montre la plus grande capacité de piégeage du radical DPPH avec une IC₅₀ de 1,15 mg/ml. L'extrait acétonique révèle le plus fort potentiel réducteur avec une IC₅₀ de 7,12 mg/ml. De même, l'extrait acétonique montre la plus grande activité antioxydante totale (275,83 µg EAA / mg). L'activité antibactérienne des extraits est évaluée par la technique de diffusion vis-à-vis trois souches bactériennes (*P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus*) et l'activité antifongique par la méthode de contact direct vis-à-vis deux champignons (*Penicillium sp*, *Fusarium oxysporum*). Tous les extraits montrent une bonne activité antimicrobienne. Au terme de ce travail nous pouvons retenir que la plante étudiée possède d'importantes activités biologiques et peut servir d'excellent candidat pour l'application pharmaceutique.

Mots clés : *Ruta sp*, polyphénols, flavonoïdes, tanins condensées, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

المخلص

Ruta sp هو نبات طبي وعطري ينتمي إلى عائلة Rutacée. المستخدمة على نطاق واسع في الطب التقليدي في الجزائر. في إطار المساهمة في تثمين هذا النبات الطبي، أجرينا في هذا العمل التحليل الفيزيوكيميائي و الكميائي النباتي، إضافة إلى تقييم نشاط مضادات الأكسدة والميكروبات لمستخلصات مختلفة من الجزء الهوائي لهذه النبتة. أظهر التحليل الفيزيوكيميائي أن عينتنا غنية بالمواد الأيضية الأولية بحيث نسبة الدهون 3,55%، البروتينات 8,64% والسكريات 19,89%. تم الاستخلاص عن طريق النقع مع التحريك المستمر باستخدام مذيبات مختلفة (ميثانول 70%، إيثانول 70%، أسيتون 70% والماء). المرود الذي تم الحصول عليه هو على التوالي 34,77%، 32,34%، 32,56%، 21,98%. يظهر القياس الكمي لمجموع البوليفينول والفلافونويد والعفص المكثف في المستخلصات الأربعة بواسطة طرق القياس اللوني أن النبتة غنية بهذه المواد. يتم تقييم نشاط مضادات الأكسدة عن طريق اختبارات مختلفة (DPPH/FRAP/TAC). يظهر المستخلص الإيثانولي أكبر قدرة على الكسح الجذري ل DPPH مع IC₅₀ تساوي 1,15 مغ/ مل. يكشف مستخلص الأسيتون عن أقوى إمكانية للإرجاع مع IC₅₀ تساوي 7,12 مغ/مل. كما يظهر مستخلص الأسيتون أيضا أعلى نشاط مضاد للأكسدة 275,83 ميكروغرام/مغ. يتم تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلصات بتقنية الإنتشار ضد ثلاث سلالات بكتيرية (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*) والنشاط المضاد للفطريات بطريقة الإتصال المباشر ضد نوعين من الفطريات (*Fusarium* ، *Penicillium sp*) و *oxy Sporum*. تظهر جميع المستخلصات نشاطا جيدا كمضاد للمكروبات. وفقا للنتائج التي تم الحصول عليها في هذا العمل، يمكن القول أن النبات المدروس لديه أنشطة بيولوجية مهمة، مما يجعله مرشحا ممتازا للتطبيق الصيدلاني.

الكلمات المفتاحية: *Ruta sp*، البوليفينول، الفلافونويد، العفص المكثف، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للمكروبات .

Abstract

Ruta sp is a medicinal and aromatic plant belonging to the Rutaceae family, it is widely used in traditional medicine in Algeria. The main goal of the present study was to investigate physicochemical, phytochemical and antioxidant as well as antimicrobial activity of different extracts of the aerial part of *Ruta sp*. The physico-chemical analysis revealed that the studied plant is rich in primary metabolites with 3,55% fats, 8,64% proteins and 19,89% total sugars. The extraction was carried out by maceration under agitation using different solvents (methanol 70%, ethanol 70%, acetone 70% and aqueous). The obtained yields were 34,77%, 32,34%, 32,56% and 21,98%, respectively. The quantification of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins by colorimetric methods showed the richness of this species in secondary metabolites. The antioxidant activity was evaluated by different tests (DPPH, FRAP and TAC). Ethanolic extract showed the greatest DPPH radical scavenging capacity with IC_{50} of 1,15 mg/ml. Acetone extract displayed the strongest reducing potency with IC_{50} of 7,12 mg/ml. Similarly, acetone extract showed the highest total antioxidant activity (275,83 μ g EAA / mg). The antibacterial activity of the extracts was evaluated by diffusion method against three bacterial strains (*P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus*), and the antifungal activity was tested using direct contact method against two fungi (*Penicillium sp* and *Fusarium oxysporum*). All extracts showed good antimicrobial activity. These findings demonstrate that the studied plant has considerable biological activities, which makes it an excellent candidate for pharmaceutical application.

Key words: *Ruta sp*, polyphenols, flavonoids, condensed tannins, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions ALLAH de nous avoir donné la volonté, la force, le courage et la patience pour réaliser ce travail.

Nous exprimons nos profondes gratitudees à nos parents pour leur soutiens, leurs encouragements et pour les sacrifices qu'ils ont endurés.

*Nous remercions **M. BELLIK Yuva** pour avoir accepté de nous encadrer, pour son aide, ses conseils et aussi pour la confiance qu'il nous accordé pendant la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions notre Co-encadrant **M. SID Nassim** pour les efforts qu'il a consentit afin de nous aider à réussir notre travail et lui exprimons notre gratitude et notre profond respect.*

*On exprime notre profonde gratitude à **Mme. BOUMERFEG Sabah** qui nous a fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance. Nous lui adressons nos respectueux remerciements.*

*A **Mme. CHENOUF Nadia Safia** qui a bien voulu accepter d'examiner ce travail et de participer au jury de ce travail. Nous lui exprimons nos profondes reconnaissances et nos sincères remerciements.*

*On tient à remercier sincèrement **M. MEKHOUKH Nasreddine** pour sa disponibilité tout au long de ce travail, pour nous avoir guidées dans ce travail, sa patience, ses orientations, ses encouragements et surtout ses conseils judicieux qui nous ont permis de mener à terminer ce travail.*

Nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs, les enseignants et toutes les personnes qui par leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté de répondre à nos questions durant notre recherche.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à ...

Ma mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

A mon Père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes très chères sœurs

A mes très chers frères

Riad et Anis

A tous les membres de ma famille, oncles et tantes,

*A ma chère binôme **Lamia** avec qui j'ai partagé les bons et les durs moments.*

*A mes collègues de promo qui ont cru en moi et qui m'ont toujours encouragé, et avec qui j'ai passé des années inoubliables : **Amel, Rania, Anfel, Ibtissem, et***

Karima.

A toutes les personnes qui m'ont encouragé ou aidé tout au long de mes études

Ibtissem

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, de reconnaissance et de gratitude :

A ALLAH le tout puissant de m'avoir donné le courage, la santé et m'a accordé son soutien durant les périodes les plus difficiles.

*A mon père **Mohamed** qui m'a donné le courage pour continuer mon trajet d'étude et qui m'a redonné la confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous.*

*A ma maman **Hayate** qui était la source d'amour, le motif et le grand soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.*

*A ma chère belle-sœur **Warda** et mes frères **Anis** et **Sofiane** pour leurs tendresse et leurs permanentes présences à mes côtés.*

A toutes ma famille.

*A ma chère binôme **Ibtissem** pour son soutien moral et avec laquelle j'ai passé des bons moments au cours de mon parcours à l'université.*

A tous les enseignants de notre faculté qui m'ont toujours guidé tout au long de mon parcours éducatif.

A mes amis qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours encouragé et avec qui j'ai passé des années inoubliables.

A toutes les personnes que je porte dans mon cœur.

A ceux qui me connaissent de près ou de loin.

Lamia

Sommaire

Résumés

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

I. Introduction	01
II. Matériel et méthodes	
II.1. Matériel	04
II.1.1. Matériel végétal	04
II.1.1.1. Description botanique.....	04
II.1.1.2. Répartition géographique	05
II.1.1.3. Classification botanique	05
II.1.2. Souches microbiennes	06
II.2. Méthodes	07
II.2.1. Séchage.....	07
II.2.2. Broyage et tamisage.....	07
II.2.3. Analyse physicochimique.....	07
II.2.3.1. Détermination du taux d'humidité.....	07
II.2.3.1.1. Teneur en eau.....	07
II.2.3.1.1. Humidité de la poudre	08
II.2.3.2. Détermination du taux de cendre.....	08
II.2.3.3. Teneur en matière grasse	08
II.2.3.4. Dosage des protéines	09
II.2.3.5. Dosage des glucides.....	10
II.2.4. Etude phytochimique	12
II.2.4.1. Préparation des extraits.....	12
II.2.4.2. Calcul du rendement.....	12
II.2.4.3. Dosage des composés phénoliques.....	12
II.2.4.4. Dosage des flavonoïdes	13
II.2.4.5. Dosage des tanins condensés (proanthocyanidines).....	13
II.2.4.6. Extraction et dosage des caroténoïdes	13
II.2.4.7. Détermination des pigments liposolubles.....	14
II.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante	14
II.2.5.1. Activité anti-radicalaire	14
II.2.5.2. Pouvoir réducteur	15

II.2.5.3. Capacité antioxydante totale.....	15
II.2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	16
II.2.6.1. Activité antibactérienne.....	16
II.2.6.1.1. Méthode des puits de diffusion sur gélose.....	16
a. Préparation de l'inoculum.....	16
b. Mode opératoire.....	16
II.2.6.2. Activité antifongique.....	16
II.2.6.2.1. La méthode de contact direct.....	16
II.2.6.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	17
II.2.6.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide/ fongicide.....	18
II.2.7. Analyse statistique.....	18
III. Résultats et Discussion	
III.1. Résultats et discussion de l'étude physicochimique.....	19
III.1.1. Teneur en eau.....	19
III.1.2. Taux d'humidité.....	19
III.1.3. Taux de cendre.....	19
III.1.4. Teneur en matière grasse.....	20
III.1.5. Teneur en protéines.....	20
III.1.6. Teneur en glucides.....	20
III.2. Résultats et discussion de l'étude phytochimique.....	21
III.2.1. Rendement d'extraction.....	21
III.2.2. Teneurs en polyphénols totaux.....	22
III.2.3. Teneurs en flavonoïdes totaux.....	22
III.2.4. Teneur en tanins condensés.....	24
III.2.5. Teneur en caroténoïdes.....	24
III.2.6. Teneur en pigments liposolubles.....	24
III.3. Résultats et discussion de l'activité antioxydante.....	25
III.3.1. Activité scavenger à l'égard du radical libre DPPH.....	25
III.3.2. Résultats du test du pouvoir réducteur.....	26
III.3.3. Résultats de l'activité antioxydante totale.....	27
III.4. Résultats et discussion de l'activité antimicrobienne.....	28
IV. Conclusion.....	31

Références

Annexes

Liste des tableaux

Tableau I : Teneurs en pigments lipo-solubles des différents extraits de <i>Ruta sp.</i>	25
Tableau II : Diamètres des zones d'inhibition (mm) en présence des différents extraits de <i>Ruta sp.</i>	28
Tableau III : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) en mg/ml des différents extraits vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	29
Tableau IV : Diamètres des zones d'inhibition en (cm) et le taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage, en présence des différents extraits de <i>Ruta sp.</i>	29
Tableau V : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF), en mg/ml des différents extraits vis-à-vis de <i>Fusarium oxysporum</i> et <i>Penicillium sp.</i>	30

Liste des figures

Figure 1 : Photographie de la plante <i>Ruta sp</i>	04
Figure 2 : Partie aérienne de la plante [(a) fruits, (b) fleurs, (c) feuilles)].....	05
Figure 3 : Structure botanique de <i>Ruta sp</i>	05
Figure 4 : Opération de broyage et de tamisage.....	07
Figure 5 : Teneur en eau des feuilles fraîches de <i>Ruta sp</i>	19
Figure 6 : Résultats de l'analyse des paramètres physico-chimiques de <i>Ruta sp</i>	20
Figure 7 : Histogramme montrant le rendement d'extraction de <i>Ruta sp</i>	21
Figure 8 : Histogramme montrant les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de <i>Ruta sp</i>	22
Figure 9 : Histogramme montrant les teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de <i>Ruta sp</i>	23
Figure 10 : Histogramme montrant les teneurs en tanins condensés des différents extraits de <i>Ruta sp</i>	24
Figure 11 : Histogramme montrant l'activité scavenger des différents extraits de <i>Ruta sp</i> à l'égard du radical DPPH.....	26
Figure 12 : Histogramme montrant le pouvoir réducteur des extraits de <i>Ruta sp</i>	27
Figure 13 : Histogramme montrant l'activité anti-oxydante totale des extraits de <i>Ruta sp</i> ..	27

Liste des abréviations

- ANOVA** : Analyse de la variance.
- ATCC** : American type cultur collection.
- BHT** : Hydroxy toluène butylé.
- CMB** : Concentration minimale bactéricide.
- CMF** : Concentration minimale fongicide.
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice.
- DO** : Densité optique.
- DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle.
- EAA** : Equivalent acide ascorbique.
- EAG** : Equivalent acide gallique.
- EC** : Equivalent catéchine.
- EQ** : Equivalent quercétine.
- ES** : Extrait sec.
- EX** : Extrait.
- E β -C** : Equivalent β -carotène.
- Fe²⁺** : Fer ferreux.
- Fe³⁺** : Fer ferrique.
- FeCl₂** : Chlorure de fer.
- g** : Gramme.
- H₂SO₄** : Acide sulfurique.
- HCl** : Chlorure d'hydrogène.
- HPLC** : Chromatographie en phase liquid à haute performance.
- IC₅₀** : Concentration qui induit la réduction de 50% du substrat.
- K₃Fe(CN)₆** : Ferricyanure de potassium.
- M** : Molarité (1mol/l).
- MH** : Milieu de Mueller Hinton.
- min** : Minute.
- ml** : Millilitre.
- mm** : Millimètre.
- MS** : Matière sèche.
- N** : Normalité.
- Na₂CO₃** : Bicarbonate de sodium.
- NaCl** : Chlorure de sodium.
- NaOH** : Hydroxyde de sodium.

P : Probabilité.

PDA : Gélose dextrose à la pomme de terre.

pH : Potentiel d'hydrogène.

SM : Solution mère.

TAC : Capacité antioxydant totale.

UV : Ultra-violet.

v/v : Volume / volume.

Introduction

I. Introduction

Si la médecine par les plantes connaît un engouement extraordinaire à travers le monde, il est impossible de ne voir là qu'un phénomène de mode. Bien sûr, l'ère moderne est profondément marquée par la recherche d'une vie plus saine, d'un retour à la nature, et aux valeurs essentielles. Le succès de la phytothérapie s'explique avant tout par le niveau de maîtrise technique et scientifique atteint désormais dans ce domaine. L'agronomie, la chimie, la pharmacologie ont permis, en progressant, de mettre au point des formes thérapeutiques et galéniques plus sûres, plus adaptées, et plus efficaces. Par son action en douceur et en profondeur, la phytothérapie apparaît comme la réponse idéale aux "maladies du siècle" qui ont bouleversé les sociétés par le monde (**Jean, 2010**).

Depuis plusieurs années, l'homme est habitué à utiliser les plantes pour leurs propriétés médicinales et nutritives, afin de traiter toutes sortes de maladies (**Korra et Selmi, 2020**). Ces plantes (environ 35000 espèces) (**Sivaraj et al., 2011**), représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques (**Allouni, 2018**). En effet, ces métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro* notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques, les saponosides et les huiles essentielles (**Hazzit et al., 2015**).

Les composés phénoliques constituent un large groupe de produits naturels largement distribués dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires dérivés des voies de pentoses phosphate, shikimate et phénylpropanoïdes dans les plantes (**Balasundram et al., 2006**). Ces composés sont d'une importance physiologique et morphologique considérable chez les végétaux, ils jouent un rôle important dans leur reproduction, leur pigmentation et dans leur mécanisme de défense contre les rayonnements ultraviolets et les agents pathogènes (**Hu et Luo, 2016**).

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. Ils sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (**Daglia, 2011**). Ces molécules radicalaires sont des composés instables ayant des durées de vie le plus souvent extrêmement courtes. Les radicaux libres produits dans l'organisme sont toxiques, et s'ils ne sont pas éliminés ou neutralisés, ils réagissent avec les lipides, les protéines, les acides nucléiques et altèrent en conséquence les fonctions cellulaires (**Fang et al., 2002**). En effet, à de faibles concentrations ces radicaux sont bénéfiques car ils agissent au niveau des cellules immunitaires responsables de

la destruction des cellules bactériennes, et la tonification des muscles lisses, qui à leur tour régulent le fonctionnement normal des vaisseaux sanguins. Toutefois, la génération incontrôlée de ces radicaux dans notre corps peuvent entraîner divers effets néfastes telles que les maladies auto-immunes, les maladies cardiaques, les cancers, ...etc (**Rizwan, 2018**).

Un antioxydant correspond à toute substance qui retarde ou supprime les dommages oxydatifs. Il existe deux systèmes antioxydants, des antioxydants enzymatiques telles que la glutathion peroxydase, la catalase et le superoxyde dismutase, et les antioxydants non enzymatiques dont les principaux sont les vitamines (A, E, C), les minéraux (zinc, sélénium), les composés phénoliques, ...etc (**Shebis, 2013**).

Par ailleurs, les maladies infectieuses affectent des millions de personnes dans le monde entier et causent de lourdes pertes économiques. Les bactéries sont des organismes unicellulaires microscopiques qui peuvent provoquer des maladies en fabriquant des substances nocives (les toxines), en envahissant les tissus vivants (**Bush, 2020 a**). Elles sont de deux types : les bactéries à Gram positive dont la paroi est constitué d'une couche de peptidoglycane épaisse et uniforme, contrairement à celle des bactéries à Gram négative qui a une couche mince peu dense (**Bousakhraoui et al., 2017**). D'autre part, les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, vivant en symbiose avec des végétaux ou en parasitant les végétaux et les animaux, d'autres sont des saprophytes (**Leveau et Bouix, 1993**).

Les infections bactériennes sont généralement traitées par des antibiotiques qui sont des agents antimicrobiens le plus souvent toxiques pour l'organisme humain et animal (**Rhayour, 2002**). De plus, l'apparition de formes résistantes de plusieurs bactéries à certains antibiotiques rend difficile leur traitement. Ainsi, beaucoup de plantes utilisées dans la médecine populaire pour leurs propriétés antiseptiques et thérapeutiques, ont reçu ces dernières décennies un intérêt scientifique constant en raison de leurs efficacités et innocuités. Elles sont capables de supprimer un certain nombre de facteurs de virulence microbienne comme l'inhibition de la formation de biofilms, la réduction de l'adhérence ligands-hôte, et la neutralisation des toxines bactériennes dans les infections bactériennes et montrent un synergisme avec des antibiotiques (**Haddouchi et al., 2016**).

La recherche de nouvelles stratégies de prévention contre les infections bactériennes et les maladies d'origine fongique comporte un intérêt majeur pour la santé humaine. Parmi les espèces de plante à intérêt potentiellement thérapeutique dans le domaine pharmaceutique, *Ruta sp.* Il appartient à la famille des Rutacées qui contient environ 160 genres et plus de 1600 espèces (**Pollio et al., 2008; Asgarpanah et Khoshkam, 2012**). Il est communément connu sous le nom de rue, cultivée comme herbe ornementale dans les jardins (**Benkiki, 2006**).

Ruta sp est une herbe odoriférante et médicinale bien connue dans les civilisations anciennes. En homéopathie, cette plante est utilisée pour le traitement des douleurs musculaires, des blessures, des douleurs articulaires, arthrite, rhumatismes, maux de dents et de tête (**Pollio et al., 2008**).

D'après les études et les applications pharmaceutiques, *Ruta sp* est largement utilisée pour ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antidiabétiques, antibactériennes, antifongiques et insecticides. Elle se caractérise par une richesse en molécules actives tels que les polyphénols, les alcaloïdes et les terpénoïdes (**Benkiki, 2006**).

Les objectifs de la présente étude sont :

- L'analyse physicochimique de la plante (taux d'humidité, teneur en eau, taux de cendre, matière lipidique, matière protéique, matière glucidique) ;
- L'extraction des substances actives par différents solvants (méthanol 70%, éthanol 70%, acétone 70% et l'eau distillée) ;
- Le dosage des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins, des caroténoïdes, et des pigments chlorophylliens des différents extraits de la plante ;
- L'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro* des différents extraits à travers différents tests : l'activité scavenger à l'égard du radical libre DPPH, le pouvoir réducteur, et la capacité antioxydante totale (CAT) ;
- L'évaluation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*) et deux souches fongiques (*Fusarium oxysporum* et *Penicillium sp*).

Matériel et Méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétale

Le matériel végétal utilisé dans cette étude expérimentale est la partie aérienne (feuilles et tiges) de la plante récoltée le 11 mars 2022 (**Annexe 5**), dans la région d'El Ach, daïra d'El Hammadia, wilaya de Bordj Bou Arreridj (**Fig.1**).



Figure 1. Photographie de la plante *Ruta sp.*

II.1.1.1. Description botanique

Ruta sp est un petit sous-arbuste ou une plante vivace semi ligneuse de 0,6 à 0,9 m de haut et presque aussi large. Les tiges deviennent boisées près de la base, mais restent herbacées plus près des conseils. Les feuilles sont de 7,6 à 12,7 mm de long, de couleur verte, et sont alternes. Ils sont un peu charnus et généralement couverts d'une pruine poudreuse. Le feuillage a une odeur forte, piquante, plutôt désagréable lorsqu'il est meurtri (**Asgarpanah et Khoshkam, 2012**). Ses fleurs ont les mêmes nombres de sépales et pétales qui vont de 4 à 5 et de 8 à 10 étamines. La floraison s'étend de mai à août (**Doerper, 2008**). Les fruits sont secs, durs et arrondis, 4 ou 5 lobés au sommet brun grisâtre et rugueux. Les graines sont ovoïdes, arrondies sur le dos, aplaties à l'avant (**Parray et al., 2012**) (**Fig.2**). La plante est hermaphrodite et entomogame (**Doerper, 2008**).

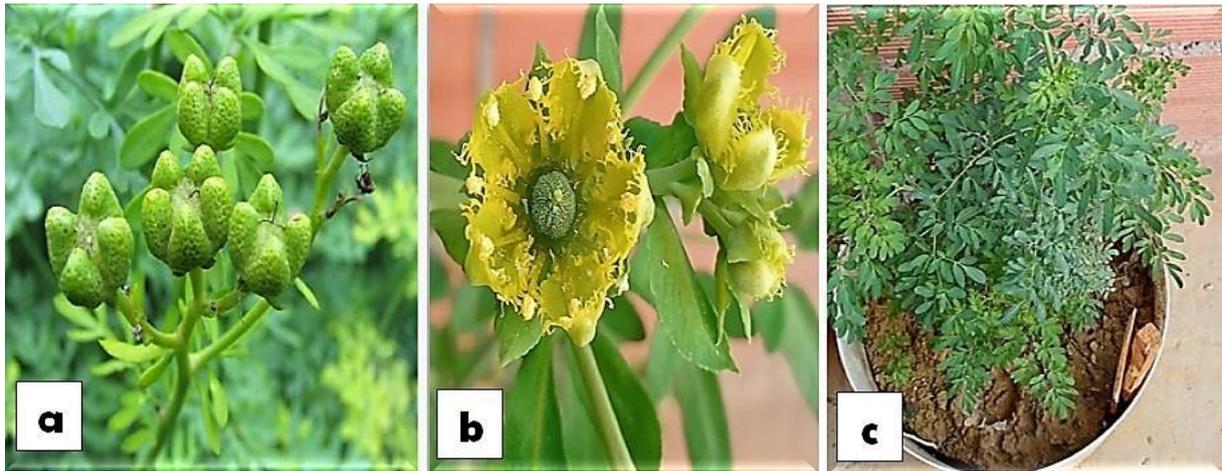


Figure 2. Partie aérienne de la plante : (a) fruits, (b) fleurs, (c) feuilles.

II.1.1.2. Répartition géographique

Ruta sp est une plante vivace originaire de la région méditerranéenne, sauvage ou cultivée, ce genre comprend d'autres représentants en Europe, et en Asie. Dans son aire de distribution naturelle, on la retrouve dans des endroits abrités sur sol sec et pierreux ou calcaire, peut croître cependant en sol humide ou sec bien drainé, elle persiste mieux et est moins affectée par le froid dans un sol pauvre et sec que dans un sol très fertile. Le pH du sol doit se situer entre 5,8 et 8,3. Les besoins en eau peuvent varier entre 300 et 2500 mm annuellement, les températures idéales de croissance se situent entre 8,8 à 25°C. La propagation se fait par semis en mi-printemps avec un espacement de 40 à 46 cm entre les plants, ou bien par division racinaire qui se fait également au printemps (Jean, 1992).

II.1.1.3. Classification botanique

D'après MNHN et OFB (2003), la classification de *Ruta sp* est la suivante :

- **Domaine** : Biota.
- **Règne** : Plantae.
- **Sous-Règne** : Viridaeplantae.
- **Infra-Règne** : Streptophyta.
- **Classe** : Equisetopsida.
- **Clade** : Tracheophyta.
- **Sous-Classe** : Magnoliidae.
- **Super-Ordre** : Rosanae
- **Ordre** : Sapindale.
- **Famille** : Rutaceae.
- **Sous-Famille** : Rutoideae.
- **Genre** : *Ruta L.*
- **Espèce** : *Ruta sp.*



Figure 3. Structure botanique de *Ruta sp* (Rérolle, 2012)

II.1.2. Les souches microbiennes

II.1.2.1. Les souches bactériennes

✓ *Escherichia coli* : C'est une bactérie à Gram négatif connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire (**Bush, 2020 b**).

✓ *Staphylococcus aureus* : Ce sont des microorganismes aérobies à Gram positif très fréquent chez l'homme à l'état commensal ou pathogène. Il est responsable d'infection cutanée et parfois de pneumonies, d'endocardites et provoque fréquemment d'abcès (**Bush et Vazquez-Pertejo, 2021**).

✓ *Pseudomonas aeruginosa* : C'est une bactérie mobile aérobie à Gram négatif, sécréter un vaste éventail de toxines extracellulaires (**ASPC, 2010**). L'éventail des infections s'étend des infections externes légères (touchant l'oreille et les follicules pileux) à des infections internes sévères (affectant les poumons, la circulation sanguine ou les valves cardiaques) (**Bush, 2020 c**).

II.1.2.2. Souches fongiques

✓ *Fusarium oxysporum* : est un champignon cosmopolite se nourrissant de matière en décomposition et pouvant survivre au niveau du sol sur les débris infectés entre les périodes de cultures. Il comprend une multitude de formes spécialisées et affecte une diversité d'hôtes qui lui est propre. Il passe l'hiver dans le sol ou sur des débris végétaux infectés ; les spores du champignon peuvent rester viables pendant plusieurs années dans le sol (jusqu'à 30 ans). Au printemps, quand la croissance végétative reprend, les spores germent, et avec le mycélium déjà présent dans le sol, pénètrent la plante par les racines. Le mycélium se développe et progresse entre les cellules jusqu'aux vaisseaux transportant la sève. Une fois établi, le mycélium se ramifie et produit des spores asexuées qui se détachent, et sont transportées par la sève jusqu'aux parties supérieures de la plante et germent (**Voynaud, 2020**).

✓ *Penicillium sp* : les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud) à des températures modérées de l'ordre de 20 - 27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3 - 4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris. (**Botton et al., 1990**). L'inhalation de ces spores provoque des réactions allergènes, l'asthme, maux de tête et fatigue chronique (**Bouchard, 2019**).

II.2. Méthodes

II.2.1. Séchage

La quantité des feuilles et tiges fraîches de *Ruta sp* après nettoyage était de 911,909 g. Ces parties de la plante ont été séchées à l'aire libre à une température ambiante pendant 3 jours, puis mises à l'étuve pendant 72 h à une température de 40°C (**Annexe 6**).

II.2.2. Broyage et tamisage

Les feuilles et les tiges séchées sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. La quantité de poudre obtenue est de 237,626 g. La poudre obtenue est tamisée à l'aide d'un tamis de granulométrie inférieure à 200 µm (**Fig.4**). La poudre est conservée dans des flacons en verre, fermés hermétiquement, à l'abri de la lumière dans un réfrigérateur (T = -4°C).



Figure 4. Opération de broyage et de tamisage.

II.2.3. Analyse physicochimique

II.2.3.1. Détermination du taux d'humidité

II.2.3.1.1. Teneur en eau

Le test de la teneur en eau permet la détermination de la quantité d'eau existante dans la plante fraîche. La teneur en eau d'une plante a été déterminée comme suit : une quantité précise des parties aériennes de *Ruta sp* fraîches est pesée, après séchage à l'air libre, à température ambiante et à l'ombre pendant environ 3 jours, ces mêmes parties ont été pesées une deuxième fois pour déterminer la diminution du poids.

Calcul :

$$H\% = [(poids \alpha - poids \beta) / poids \alpha] \times 100\%$$

- ✓ H%: taux d'humidité exprimé en pourcentage.
- ✓ α : poids (g) de l'échantillon "plante fraîche".
- ✓ β : poids (g) de l'échantillon "plante sèche".

II.2.3.1.1. Humidité de la poudre (H%)

L'humidité de la poudre a été déterminée par la méthode de séchage à l'étuve selon **AOAC (2000)**. Une quantité de 2 g de poudre de plante est met dans un creuset en porcelaine préalablement taré. Le creuset et son contenu sont ensuite placés dans une étuve universelle (Memmert type-ONE 7, Schutzart DIN EN 60529-IP 20. Germany) à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 h. Après refroidissement dans un dessiccateur renfermant un desséchant (gel de silice), le creuset a été pesé. L'expérience a été répétée 3 fois. L'humidité est calculée comme suite ;

$$H\% = [(m - m') / m] \times 100\%$$

Où ;

- ✓ m : masse de l'échantillon en poudre avant le séchage.
- ✓ m' : masse de l'échantillon en poudre après le séchage.

II.2.3.2. Détermination du taux de cendre (Tc%)

Les cendres totales sont le résidu de composés minéraux qui reste après l'incinération d'un échantillon contenant des substances organiques d'origine animale, végétale ou synthétique. Les cendres représentent environ 1 à 5% de la masse d'un aliment sur une base humide. Le taux de cendre est déterminé selon **AOAC (2000)** après minéralisation par voie sèche, dans un creuset en porcelaine, préalablement taré. On introduit 1 g de poudre végétale dans un four à moufle de type memmert à une température de 800°C pendant 6 heures jusqu'à l'obtention des cendres blanches (toute la matière organique brûle et on ne récupère que la partie inorganique de l'échantillon), on laisse refroidir dans un dessiccateur et on pèse.

Le taux de cendres est calculé selon la règle suivante ;

$$Tc (\%) = (M - M') / E \times 100\%$$

Où

- ✓ M : Masse finale (creuset + cendres totales).
- ✓ M' : Masse du creuset vide.
- ✓ E : Prises d'essais de la matière.

II.2.3.3. Teneur en matière grasse

Les lipides sont insolubles dans l'eau et très solubles dans les solvants organiques, tel l'éther de pétrole et l'hexane. La plupart des méthodes de dosage des lipides exploitent ces propriétés physiques pour extraire les lipides des aliments ou végétaux dans le but de mesurer leur concentration.

a- Méthode Soxhlet : La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments ou végétaux solides déshydratés (BIPEA, 1976). C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction (Annexe 7).

b- Principe de la méthode : L'échantillon solide (poudre de la plante) est pesé et placé dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu par l'éther de pétrole à ébullition qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée. Les capsules de cellulose sont perméables au solvant et à la matière grasse qui y est dissoute. Ces capsules sont jetables. La teneur en fraction lipidique est calculé selon la règle ;

$$\text{Lipides (\%)} = (P1 - P2) / ME \times 100\%$$

Où ;

- ✓ **P1** : poids du ballon après évaporation.
- ✓ **P2** : poids du ballon vide.
- ✓ **ME** : masse de la prise d'essai.

II.2.3.4. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de BIPEA (1976) utilisant un distillateur Kjeldahl; cette méthode est basée sur le dosage de l'azote total, qui est ensuite converti en taux de protéines. La minéralisation de 1 g d'échantillon par 20 ml d'acide sulfurique se fait en présence d'un catalyseur composé de 10 g sulfate de potassium (K_2SO_4) et de 2 g d'oxalate de potassium ($K_2C_2O_4$) dans un digesteur type Buchi 430 (Digestor Germany), pendant 5 h. Ensuite, une distillation est effectuée dans un distillateur type Buchi 320 (Germany), après addition de 70 ml de solution de soude (NaOH) à 40% au minéralisat. Le distillat est recueilli dans 15 ml d'une solution tampon d'acide borique préparée par dissolution de 40 g d'acide borique dans 1000 ml d'eau distillée et 10 ml d'une solution de rouge de méthyl 0,05% comme indicateur coloré (Annexe 7). Le titrage du distillat se fait avec l'acide sulfurique 0,1 N. Les taux d'azote total et de protéines brutes sont obtenus avec des formules :

$$\text{Taux d'azote total (\%)} = V (H_2SO_4) \times N (H_2SO_4) \times 0,014 \times 100\% / P$$

Où ;

- ✓ $V(H_2SO_4)$ = volume H_2SO_4 de la chute de burette.
- ✓ $N(H_2SO_4)$ = normalité de l'acide sulfurique.
- ✓ **0,014** = coefficient affecté à la concentration de la solution normale d'azote (14/1000).
- ✓ **P** = poids de l'échantillon.

Conversion du taux d'azote en taux de protéines

100 g de protéines correspond à 16 g d'azote dans la majorité des cas.

On utilise un facteur de conversion basé sur le taux moyen d'azote des protéines.

$$F = 100 / 16 = 6,25$$

$$\text{Les protéines brutes (\%)} = PB\% = N\% \times 6,25$$

II.2.3.5. Dosage des glucides

La détermination de la quantité en oses repose sur le dosage des sucres totaux par la méthode de **Dubois (1956)** appelée aussi méthode phénol / acide sulfurique.

Principe : Le dosage des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessite la rupture de toutes les liaisons glycosidiques par hydrolyse acide (l'acide sulfurique).

L'analyse repose sur des techniques colorimétriques ; le principe des dosages colorimétriques se base sur la condensation par estérification d'un chromogène (phénol, orcinol, anthrone), avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses, et acides uroniques. En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en des dérivés du furfural, 5-hydroxy-méthyl-furfural et de l'acide 5-formylfuroïque.

Les chromophores ainsi formés de couleur jaune orange absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité des sucres présents (**Ruiz, 2005**).

La teneur en sucres est exprimée en $\mu\text{g/ml}$ de α -D-Glucose à partir d'une courbe d'étalonnage (**Annexe 8**).

Mode opératoire

Préparation des échantillons

Le dosage des glucides a été réalisé selon le protocole du **Dubois et al., (1956)**

- Peser 0,5 g d'échantillon dans un bêcher, ajouter 20 ml d'acide sulfurique à 0,5 N puis placer l'ensemble dans une étuve à 105°C pendant 3 heures.
- Transvaser quantitativement le contenu du bêcher dans une fiole de 500 ml (ajuster le volume par de l'eau distillée jusqu'à 500 ml), puis filtrer la solution et la conserver à 4°C .

- Préparer l'essai.
- Dans un tube en pyrex (2 cm θ), déposer avec précaution 1 ml d'essai, ajouter 1 ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré.
- Après agitation (au vortex), le tube est maintenu dans l'étuve pendant 5 min à 100°C, puis laissé dans l'obscurité pendant 30 min.
- Enfin, lire la densité optique à une longueur d'onde de 490 nm.

Préparation de l'étalon : Pour chaque série de détermination, une gamme d'étalonnage est nécessaire ; une solution mère (SM) de α -D-glucose de concentration 100 μ g/ml est préparée comme suit ;

- Préparer une solution de glucose de 0,01 g / 100 ml (100 μ g/ml).
- A partir de cette solution mère préparer des dilutions de différentes concentrations 20 μ g/ml, 40 μ g/ml, 60 μ g/ml, 80 μ g/ml, et 100 μ g/ml.
- Prendre 1 ml de chaque concentration (2 essais pour chaque concentration) et ajouter 1 ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique à 98% à l'aide d'une burette.
- Après agitation (au vortex), les tubes sont maintenus pendant 5 min à 100°C, puis à l'obscurité pendant 30 min.
- Lire la densité optique de chaque concentration à 490 nm, après tracer la courbe d'étalonnage.

Expression des résultats

A partir des densités optiques de la courbe d'étalonnage, on peut obtenir la teneur en sucres de l'échantillon. La courbe d'étalonnage :

$$\boxed{DO=f(C) \rightleftharpoons DO = \epsilon \times C}$$

Dont

- ✓ ϵ : La pente.
- ✓ C : La concentration de α D Glucose en μ g/ml.

La teneur en sucres est exprimée en μ g/ml de α -D-glucose, elle est convertie par rapport à 100 g de matière sèche.

II.2.4. Etude phytochimique

II.2.4.1. Préparation des extraits

L'extraction est réalisée selon la méthode de macération avec agitation. Quatre solvants sont utilisés : Méthanol 70%, Ethanol 70%, Acétone 70% et l'eau distillée. Un poids bien déterminé (10 g) de la poudre de la plante est mélangé avec 150 ml de chaque solvant. Le mélange obtenu est agité pendant 24 h à température ambiante à l'aide d'un agitateur magnétique, puis filtré à travers le papier filtre. Une deuxième extraction est réalisée sur le retentât dans les mêmes conditions. Les deux filtrats sont mélangés et le solvant est éliminé à pression réduite à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi, Allemagne). Les extraits ainsi obtenus sont séchés à l'étuve portée à 40°C jusqu'à l'obtention d'un extrait sec qui sera conservé au congélateur pour servir aux différents tests. La reconstitution se fait dans le même solvant d'extraction juste avant chaque test.

II.2.4.2. Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est le rapport entre la masse de l'extrait obtenu après évaporation et la masse de la matière première végétale après séchage, exprimé en pourcentage.

$$R\% = ([MEX] / [MMV]) \times 100\%$$

Où

- ✓ **MEX** : masse de l'extrait obtenu après évaporation (g).
- ✓ **MMV** : masse de la matière végétale séchée et laminé (g).

II.2.4.3. Dosage des composés phénoliques

Le contenu en phénols totaux des extraits est déterminé en utilisant le protocole décrit par **Singleton et Rossi, (1965)**. Un volume de 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10%) est ajouté à 200 µl de chaque extrait ou standard avec des concentrations convenables. Après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (7,5%) est additionnée au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, 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 (20 - 140 µg/ml) et est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES).

Le témoin est préparé en mélangeant 0,2 ml du solvant d'extraction avec 1 ml du réactif de Folin-Ciocalteu et 0,8 ml de la solution de carbonate de sodium. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

Une courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique comme standard (**Annexe 9**), afin de déterminer les concentrations en phénols totaux des extraits exprimées en mg équivalent d'acide gallique / g d'extrait sec.

II.2.4.4. Dosage des flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de *Ruta sp* est réalisée par la méthode décrite par **Jain et al. (2011)**. A 1 ml d'extrait on ajoute 1 ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium (AlCl_3) à 2%. On laisse incuber pendant 1 h à température ambiante. L'absorbance est lue à 430 nm au spectrophotomètre UV-visible double faisceau (UV-1800 Shimadzu). La même opération est réalisée avec la quercétine à différentes concentrations (0 - 35 $\mu\text{g/ml}$). Le blanc est préparé en remplaçant l'extrait par le solvant d'extraction. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

Les concentrations des flavonoïdes contenus dans les extraits de *Ruta sp* sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec la quercétine comme standard (**Annexe 10**), les résultats sont exprimés en mg équivalent de quercétine / g d'extrait sec.

II.2.4.5. Dosage des tanins condensés (Proanthocyanidines)

La teneur en pro-athocyanidines est mesurée en suivant le protocole de **Sun et al. (1998)** avec quelques modifications. Un volume de 0,5 ml de la solution d'extrait (5 mg/ml) est mélangé avec 3 ml de la solution de vanilline (4%), préalablement préparée dans du méthanol, et 1,5 ml d'HCl (37%). Le mélange est bien agité, puis incubé pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance est lue à 500 nm. Le blanc est préparé en mélangeant 0,5 ml de solvant d'extraction avec 3 ml de la solution de vanilline 4% et 1,5 ml d'HCl. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata. La concentration des tanins est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la catéchine (**Annexe 11**). Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine / g ES.

II.2.4.6. Extraction et dosage des caroténoïdes

Les caroténoïdes contiennent plusieurs doubles liaisons conjuguées dans leur structure, ces doubles liaisons sont responsables de l'absorption dans la lumière par excitation des électrons des liaisons π (**Rodriguez-Amaya, 2001**). Pour extraire et doser les caroténoïdes dans la partie aérienne de *Ruta sp*, le protocole décrit par **Sass-Kiss et al. (2005)** a été utilisé avec quelques modifications. Pour cela, 50 mg de la poudre sont additionnés à 10 ml d'un mélange de solvant (hexane, acétone, éthanol) (2:1:1, V/V/V). Après agitation pendant 15 min, le mélange est centrifugé à 4500 tours / min pendant 15 min.

La phase supérieure (hexadique) contenant les pigments, est récupérée et le culot a subi une deuxième extraction dans les mêmes conditions. Les deux phases hexadiques sont mélangées puis l'absorbance du mélange est mesurée par spectrophotomètre UV-VIS à 450 nm. Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent de β -carotène par milligramme de matière végétale sèche en se référant à la courbe d'étalonnage de la β -carotène ($\mu\text{g E}\beta\text{-C / mg MS}$) (Annexe 12).

II.2.4.7. Détermination des pigments liposolubles

Les teneurs en β -carotène, lycopène et chlorophylle de *Ruta sp* ont été déterminées selon la méthode adoptée par Nagata et Yamashita (1992). Brièvement, 50 mg de l'extrait de la plante sont ajoutés à 10 ml d'un mélange acétone-hexane (4:6 V/V) puis agité vigoureusement pendant 1 min, ensuite filtré à travers un papier filtre. L'absorbance du filtrat est mesurée à différentes longueurs d'onde : 453 nm, 505 nm, 645 nm et 663 nm. La teneur en pigments est calculée suivant les équations indiquées ci-dessous et les résultats sont exprimés en milligramme de chlorophylle, caroténoïdes ou β -carotène / g d'extrait sec.

Calcul:

- β -carotène (mg/100 ml) = $0,216 \times A_{663} - 1,22 \times A_{645} - 0,304 \times A_{505} + 0,452 \times A_{453}$.
- Lycopène (mg/100 ml) = $-0,0458 \times A_{663} + 0,204 \times A_{645} + 0,372 \times A_{505} - 0,0806 \times A_{453}$.
- Chlorophylle a (mg/100 ml) = $0,999 \times A_{663} - 0,0989 \times A_{645}$.
- Chlorophylle b (mg/100 ml) = $-0,328 \times A_{663} + 1,77 \times A_{645}$.

II.2.5. Évaluation de l'activité antioxydante

Au cours de l'évaluation de l'activité antioxydante, le recours à l'utilisation de plusieurs tests antioxydants complémentaires est utile afin d'évaluer de manière appropriée le potentiel antioxydant des extraits de plante (Ksouri *et al.*, 2009). Dans ce travail, trois tests sont réalisés pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* de la plante étudiée à savoir : l'activité antiradicalaire au DPPH, le pouvoir réducteur, et la capacité antioxydante totale.

II.2.5.1. Activité anti radicalaire

La capacité des extraits de *Ruta sp* de réduire le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a été évaluée selon la méthode décrite par Burits et Bucar (2000). Le DPPH a été dissout dans 100 ml de méthanol pour préparer une solution mère, la solution étalon a été préparée en diluant la solution mère de DPPH avec du méthanol pour obtenir une absorbance de $(0,98 \pm 0,02)$ à 517 nm. Un volume de 100 μl de chaque extrait à différentes concentrations a été ajouté à 2,5 ml de solution méthanolique de DPPH diluée.

Le mélange a été agité et maintenu à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance de la solution résultante a été mesurée à 517 nm. Un contrôle est préparé en remplaçant la solution d'extrait par le méthanol. Le blanc pour chaque extrait est préparé en mélangeant 2,5 ml de méthanol avec 100 µl de solvant d'extraction. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence. Le pourcentage de l'activité scavenger du radical DPPH[•] de chaque extrait est calculé comme suit :

$$\text{Activité scavenger du radical DPPH}^{\bullet}(\%) = [(A_c - (A_t - A_b) / A_c)] \times 100\%$$

Où

- ✓ **A_c** : Absorbance du contrôle; c'est l'absorbance du solvant avec seulement le DPPH[•].
- ✓ **A_t** : Absorbance du test; c'est l'absorbance de la solution de DPPH[•] contenant l'extrait.
- ✓ **A_b** : Absorbance du blanc ; c'est l'absorbance de la solution de l'extrait sans le DPPH[•].

Les résultats sont exprimés en IC₅₀ qui est la concentration qui induit 50% d'activité scavenger du radical DPPH[•].

II.2.5.2. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits de *Ruta sp* est déterminé selon le protocole d'**Oyaïzu (1986)** avec quelques modifications. Un volume de 200 µL de solution de chaque extraits à différentes concentrations est mélangé avec 500 µL de solution tampon phosphate (0,2 M ; pH = 6,6) et 2,5 ml de solution de ferricyanate de potassium à 1% (K₃Fe(CN)₆) préparé dans l'eau distillée. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min, puis les tubes à essais sont retirés. Un volume de 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% (TCA) est ajouté, suivi d'une centrifugation à 650 rpm pendant 10 min, à 500 µL de surnageant sont ajoutés 2,5 ml d'H₂O distillée et 0,5 ml de FeCl₃ à 0,1%. La mesure de l'absorbance a été effectuée à 700 nm. Un blanc a été préparé en remplaçant l'extrait par le solvant d'extraction. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard de référence dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en A_{0,5} qui est la concentration qui donne une absorbance de 0,5.

II.2.5.3. Capacité antioxydant totale

La capacité antioxydante totale des extraits de *Ruta sp* a été évaluée par le test du phosphomolybdène selon la procédure décrite par **Prieto et al. (1999)**. Une aliquote de 0,3 ml de chaque extrait ou étalon a été mélangée avec 3 ml du mélange réactionnel (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Ensuite, les mélanges ont été incubés à 95°C pendant 90 min et l'absorbance a été enregistrée à 695 nm. L'activité antioxydante a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mg

EAG/g d'ES). Le BHT et le BHA ont été utilisés comme standards de référence dans les mêmes conditions.

II.2.6. Activité antimicrobienne

II.2.6.1. Activité antibactérienne

II.2.6.1.1. Méthode des puits de diffusion sur gélose

a. Préparation de l'inoculum

Chaque espèce bactérienne est inoculée au préalable sur une gélose nutritive afin d'obtenir une culture de 18 à 24 heures pour préparer l'inoculum. Ensuite, 4 - 5 colonies bactériennes, bien isolées, sont mises en suspension dans du bouillon nutritif (ou de l'eau physiologique contenant 0,9% de NaCl), puis cette suspension est ajustée à la norme Mc Farland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, ce qui correspond à une lecture de densité optique à 625 nm allant de 0,08 à 0,1 correspondant à une suspension contenant environ 10^7 - 10^8 bactéries / ml (CASFM, 2013).

b. Mode opératoire

L'activité antibactérienne des différents extraits étudiés a été réalisée suivant la méthode des puits sur gélose, en utilisant les microorganismes pathogènes suivants : **1) *Pseudomonas aeruginosa*** (ATCC 27853), **2) *Staphylococcus aureus*** (ATCC 25923), **3) *Escherichia coli*** (ATCC 25922). Des puits de 6 mm de diamètre ont été formés sur gélose Mueller Hinton préalablementensemencée avec des cultures jeunes de bactéries (10^8 UFC/ml), ces puits ont été ensuite remplis avec 80 μ l de chaque extrait à différentes concentrations (128, 64, 32, 16, 8 et 4 mg/ml). Après une mise au réfrigérateur à 4°C pendant 6 heures, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Les zones d'inhibition ont été mesurées (Nighat *et al.*, 2016).

D'après Ponce et ses collaborateurs (2003), la sensibilité des bactéries peut être classée par le diamètre des halos d'inhibition :

- Non sensible (-) pour les diamètres moins de 8 mm.
- Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14 mm.
- Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20 mm.

II.2.6.2. Activité antifongique

II.2.6.2.1. La méthode de contact direct

L'activité antifongique des extraits a été évaluée tel que décrit par **Nighat et al. (2016)**. Un volume de 1 ml de chaque extrait, à différentes concentrations (128, 64, 32, 16, 8 et 4 mg/ml), est incorporé séparément dans des tubes contenant 20 ml du milieu PDA maintenu en surfusion. Chaque tube est homogénéisé instantanément par agitation manuelle puis son contenu est coulé dans une boîte de Pétri. Un disque mycélien de chaque souche fongique (*Fusarium oxysporum* et *Penicillium sp*) de 6 mm de diamètre prélevé de la culture jeune a été inoculé. La lecture des résultats a été faite après 5 jours d'incubation à ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) par mesure du diamètre des zones de croissance. Parallèlement, le diamètre de la zone de croissance des mêmes souches fongiques en absence d'extraits a été déterminé.

L'effet antimicrobien des extraits sur la croissance des souches filamenteuses est déterminé par la mesure du taux d'inhibition de la croissance en utilisant la formule d'Ebbot (**Motiéjunaité et Peiculyté, 2004**) :

$$T = (Dk - D0) / Dk \times 100\%$$

Où

- ✓ Dk : Diamètre de la colonie fongique du témoin (en cm).
- ✓ D0 : Diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait (en cm).
- ✓ T : Taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

L'extrait est dit :

- Très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75 et 100%, la souche fongique est dite très sensible.
- Actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 et 75%, la souche fongique est dite sensible.
- Moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25 et 50%, la souche est dite limite.
- Peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0 et 25%, la souche est dite peu sensible ou résistante.

II.2.6.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration de la substance antimicrobienne inhibant toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 h à 24 h pour les bactéries et pendant 5 jours pour les souches fongiques. Le principe de la méthode consiste à diluer la substance antimicrobienne à tester et à inoculer le milieu avec les microorganismes. Les extraits ont subi des dilutions successives à partir d'une solution mère de concentration (SM =128 mg/ml) (1/2,

1/4 ... etc.) afin de déterminer la moindre concentration donnant une zone d'inhibition. Cette concentration est considéré comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Min et al., 2008**).

II.2.6.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide / fongicide (CMB/CMF)

La CMB/CMF est la concentration de la substance antimicrobienne exerçant un effet bactéricide ou fongicide et permettant d'obtenir, après 18 à 24 h d'incubation à 37°C pour les bactéries et 5 jours à 28°C pour les champignons, 0,1% de germes, c'est-à-dire un microbe pour 1000 de l'inoculum initial (**Rodriquez et al., 2007**). Pour la détermination de la CMB/CMF, la surface de chaque zone d'inhibition obtenue avec les différentes dilutions, (Test de CMI) est raclée à l'aide d'un anse de platine. Ensuite des boites pétri contiennent le milieu nutritif sont ensemencés par les morceaux de gélose raclée. Les boites sont misent à l'incubation. L'absence de croissance dans les boites, indiquant un effet bactéricide/fongicide et la boite avec aucune croissance est déclarée comme celle contenant la CMB/CMF, égale à la concentration qu'on a raclée au départ (**Salama et Marraiki, 2010**) avec quelques modifications.

II.2.7. Analyse statistique

Tous les essais réalisés dans la présente étude ont été répétés au moins trois fois et les résultats ont été exprimés par la moyenne \pm la déviation standard. Les graphes sont mis en forme par EXCEL. L'étude statistique est réalisée à l'aide d'un logiciel statistique (Stat View 5.0). Des comparaisons statistiques ont été effectuées avec le test Student t ou les tests ANOVA. Les différences ont été jugées significatives à $p < 0,05$.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Résultats et discussion de l'étude physicochimique

III.1.1. Teneur en eau

Il est important de déterminer la teneur en eau d'une plante car juste après la récolte de la plante fraîche, certaines enzymes telles que des hydrolases, oxydases, polymérase, ...etc sont activées et causent des réactions modifiant tant l'aspect extérieur des drogues et leurs caractères organoleptiques que leurs activités thérapeutiques, puisque des constituants initiaux sont altérés (Hélène, 2014). Les analyses ont révélé que les feuilles et les tiges de la plante fraîchement récoltée présentent une teneur importante en eau soit $72,66 \pm 2,16\%$ (Fig. 5).

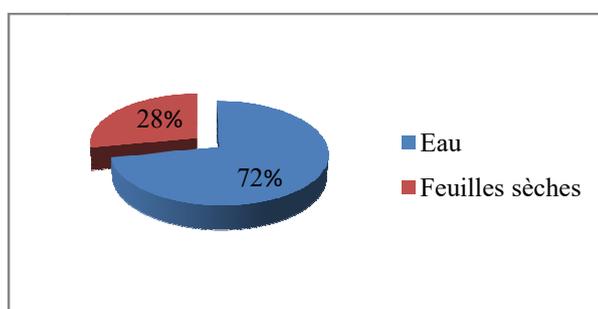


Figure 5. Teneur en eau des feuilles fraîches de *Ruta sp.*

Cette teneur est proche de celle rapporté par Attou (2011), qui a enregistré une teneur de 69,66% dans une espèce de la même famille (*Ruta chalepensis*) dans l'ouest Algérien, région de Sidi Safi, wilaya d'Ain Timouchent.

III.1.2. Taux d'humidité

D'après les résultats obtenus, la plante étudiée présente un taux d'humidité de $6,92 \pm 0,13\%$ (Fig. 6), ce qui est conforme à la norme de la pharmacopée européenne qui est limitée à 10% (Fettah, 2019), cette teneur lui confère une longue durée de conservation de la poudre. Il convient de noter également qu'un taux d'humidité trop élevé favorise le développement de micro-organismes (Hélène, 2014).

III.1.3. Taux de cendre

Dans la présente étude, la plante présente un taux de cendre de $8,18 \pm 0,55\%$ (Fig. 6). Ce résultat est conforme aux normes décrites dans la pharmacopée européenne (14%) (Fettah, 2019).

Une carbonisation de la plante permet l'élimination de toute matière organique et la pesée du résidu obtenu, constitué exclusivement de matières minérales, donne une indication du degré de propreté et de pureté de la plante utilisée ainsi que d'éventuel emploi d'agents de fertilisation lors de la culture de la plante. Ainsi, le taux de cendres est anormalement élevé lorsque le lavage de la matière végétale est insuffisant, ou en cas d'emploi d'engrais à base de nitrates NO_3^- et / ou de sels de potassium qui augmentent la teneur en minéraux. De plus, certaines plantes se caractérisent par leur taux de cendres naturellement élevé ; c'est le cas de certaines Solanacées riches en oxalate de calcium (Hélène, 2014).

III.1.4. Teneur en matière grasse

Les résultats du dosage de la fraction lipidique ont montré une teneur moyenne de $3,55 \pm 0,29\%$ (Fig.6). Ce résultat est en accord avec l'étude de Renugadevi et Meerabai (2016) qui ont révélé la présence de la matière grasse dans *Ruta graveolens*.

III.1.5. Teneur en protéines

Les résultats du dosage de la fraction protéique ont montré une teneur moyenne de $8,64 \pm 0,24\%$ (Fig.6). Ce résultat est également en accord avec celui de Renugadevi et Meerabai (2016).

III.1.6. Teneur en glucides

Les résultats du dosage des glucides de la poudre sèche de *Ruta sp* ont montré une teneur moyenne de $19,89 \pm 0,23\%$ (Fig.6). Renugadevi et Meerabai (2016) rapporte également la présence d'hydrates de carbone dans *Ruta graveolens* en utilisant le test de Fehling et l'acide sulfurique.

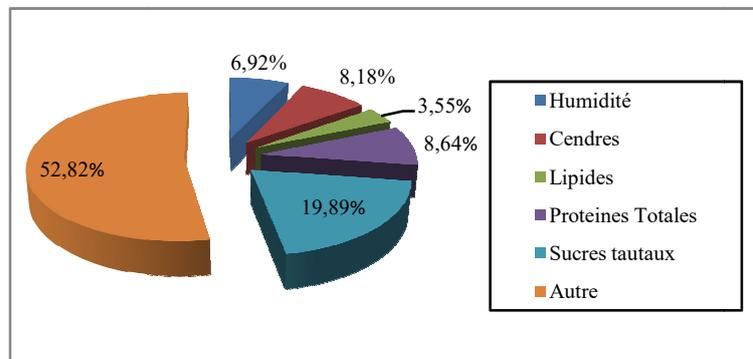


Figure 6. Résultats de l'analyse des paramètres physicochimiques de *Ruta sp*.

III.2. Résultats et discussion de l'étude phytochimique

III.2.1. Rendements d'extraction

Dans la présente étude, quatre solvants ont été utilisés pour l'extraction des composés bioactifs à partir de la partie aérienne de la plante *Ruta sp.* La figure 7 illustre les résultats des rendements d'extraction de cette plante. Les résultats obtenus montrent que le rendement d'extraction varie en fonction du solvant utilisé.

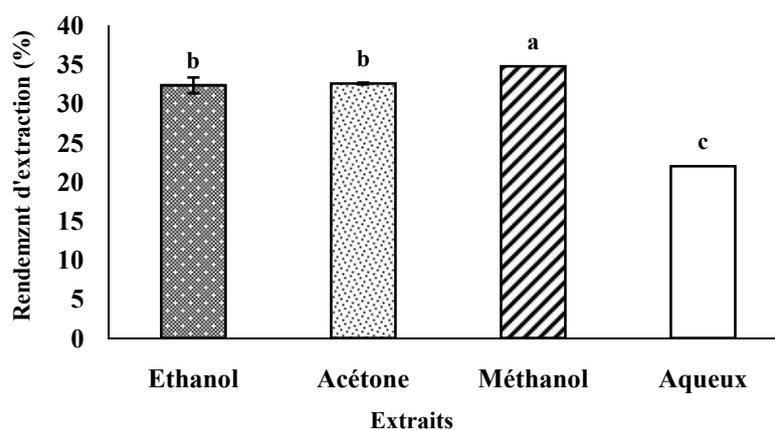


Figure 7. Histogramme montrant le rendement d'extraction de *Ruta sp.*

Les lettres a, b, c signifiant que la différence est statistiquement significative à $p < 0,05$.

En effet, le taux le plus élevé a été détecté dans l'extrait méthanolique ($34,77 \pm 1,01\%$), suivi par l'extrait acétonique ($32,56 \pm 0,24\%$), puis l'éthanol ($32,34 \pm 0,27\%$), et en fin l'extrait aqueux qui a montré le rendement le plus bas ($21,98 \pm 0,84\%$).

Les résultats obtenus sont largement supérieurs à ceux rapportés par **Halouani et al. (2021)** qui ont utilisé la même méthode d'extraction en utilisant différents solvants (méthanol, éthanol, aqueux) avec deux plantes de la même espèce cultivées dans deux régions différentes : *Ruta graveolens* cultivée en Tunisie et *Ruta graveolens* cultivée à Marseille. Leurs rendements d'extraction étaient de l'ordre de 4,94%, 1,04%, 5,22%, respectivement pour *Ruta graveolens* de Tunisie et 2,76%, 5,06%, 1,49%, respectivement pour *Ruta graveolens* de Marseille.

Il importe de noter que le rendement d'extraction dépend de la méthode d'extraction (à chaud ou à froid), des conditions de séchage (lieu, température et durée de séchage), du stade de croissance et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant (**Lee et al., 2003; Fellah, 2006**).

III.2.2. Teneurs en polyphénols totaux

Les résultats du dosage des composés phénoliques montrent que les teneurs en polyphénols varient également en fonction des solvants utilisés (Fig.8).

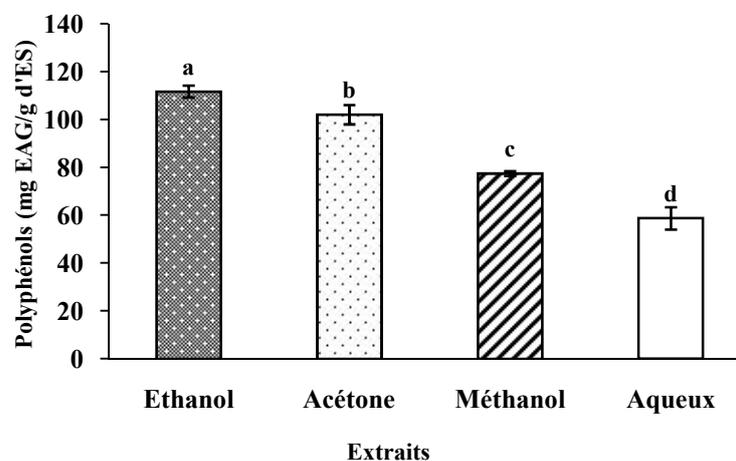


Figure 8. Histogramme montrant les teneurs en polyphénols totaux des différents extraits de *Ruta sp.*

Les lettres a, b, c, d signifiant que la différence est statistiquement significative à $p < 0,05$.

La teneur la plus élevée a été détectée dans l'extrait éthanolique ($111,77 \pm 2,51$ mg EAG/g ES) et l'extrait acétonique ($102,09 \pm 4,04$ mg EAG/g ES), suivi de l'extrait méthanolique ($77,52 \pm 0,98$ mg EAG/g ES), et l'extrait aqueux ($58,76 \pm 4,63$ mg EAG/g ES).

Ces résultats semblent inférieurs à ceux de **Halouani et al. (2021)** qui ont détecté dans l'extrait éthanolique, méthanolique et l'extrait aqueux de *Ruta graveolens* de Tunisie des valeurs de $127 \pm 0,49$ mg EAG/g, 108 mg GAE/g, $85 \pm 0,73$ mg EAG/g d'extrait, respectivement. Alors que les plus grandes teneurs en polyphénols ont été obtenues dans les extraits éthanoliques, méthanoliques, et extrait aqueux de *Ruta graveolens* de Marseille soit $214 \pm 1,23$ mg EAG/g, $194 \pm 0,98$ mg EAG/g, et $96 \pm 0,24$ mg EAG/g d'extrait respectivement.

Les teneurs en composés phénoliques changent de façon considérable d'une espèce à une autre et au sein de la même espèce, à cause des facteurs extrinsèques (température, climat...), génétiques (la variété et l'origine d'espèces), physiologiques (le degré de maturation des plantes, les organes utilisés) et de la durée de stockage (**Ksouri et al., 2009**).

III.2.3. Teneurs en flavonoïdes totaux

Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits de *Ruta sp* sont représentées dans la figure 9.

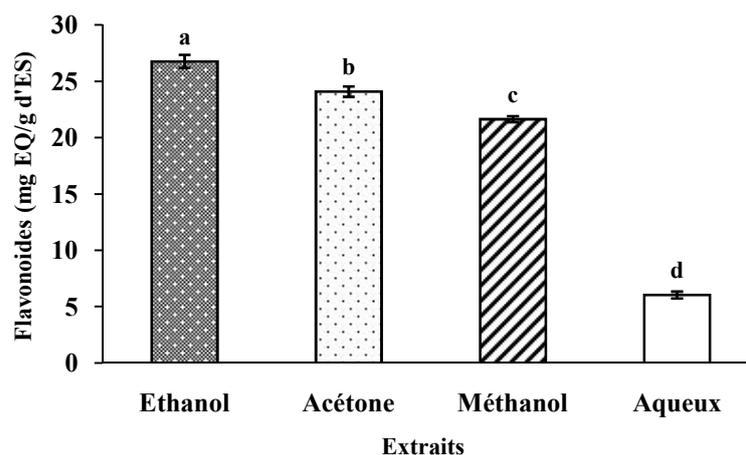


Figure 9. Histogramme montrant les teneurs en flavonoïdes totaux des différents extraits de *Ruta sp.*

Les lettres a, b, c, d signifiant que la différence est statistiquement significative à $p < 0,05$.

D'après les résultats obtenus, il apparaît là aussi que les teneurs en flavonoïdes totaux varient en fonction du solvant utilisé. L'extrait éthanolique et l'extrait acétonique présentent les plus grandes concentrations en flavonoïdes avec des valeurs moyennes de $(26,75 \pm 0,58 \text{ mg EQ/g ES})$ et de $(24,07 \pm 0,46 \text{ mg EQ/g ES})$, respectivement. L'extrait méthanolique montre une teneur moyenne de l'ordre de $(21,63 \pm 0,26 \text{ mg EQ/g ES})$, alors que l'extrait aqueux montre la plus faible teneur en flavonoïdes $(6,02 \pm 0,3 \text{ mg EQ/g d'ES})$.

Ces valeurs sont également inférieures à celles obtenues par **Halouani et al. (2021)** où l'espèce *Ruta graveolens* d'origine de Tunisie a montré des teneurs en flavonoïdes de $145,1 \pm 1,75 \text{ mg EQ/g}$ pour l'extrait éthanolique, $190,90 \pm 5,83 \text{ mg EQ/g}$ pour l'extrait méthanolique et $116,50 \pm 1,17 \text{ mg EQ/g}$ pour l'extrait aqueux, alors que *Ruta graveolens* d'origine de Marseille a montré des teneurs de $122,90 \pm 8,74 \text{ mg EQ/g}$ pour l'extrait éthanolique $174,90 \pm 0,73 \text{ mg EQ/g}$ pour l'extrait méthanolique et $64,70 \pm 0,73 \text{ mg EQ/g}$ pour l'extrait aqueux.

III.2.4. Teneur en tanins condensés

La figure 10 illustre les résultats des teneurs en tanins condensés des différents extraits de *Ruta sp.*

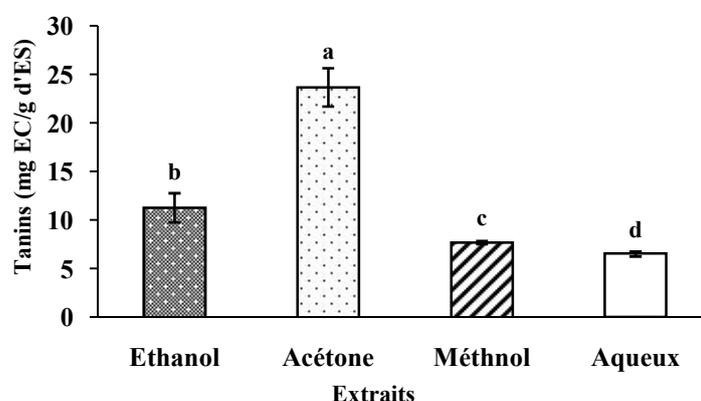


Figure 10. Histogramme montrant les teneurs en tanins condensés des différents extraits de *Ruta sp.*

Les lettres a, b, c, d signifiant que la différence est statistiquement significative à $p < 0,05$.

Le taux le plus élevé a été détecté dans l'extrait acétonique ($23,69 \pm 1,97$ mg EC/g), suivi par l'extrait éthanolique ($11,28 \pm 1,51$ mg EC/g), puis l'extrait méthanolique ($7,71 \pm 0,16$ mg EC/g), et en fin l'extrait aqueux qui a montré le taux le plus bas en tanins condensés ($6,53 \pm 0,26$ mg EC/g). Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues par **Halouani et al. (2021)** qui ont rapporté des teneurs en tanins de $7,33 \pm 5,89$ mg EC/g ES pour l'extrait éthanolique de *Ruta graveolens* d'origine de Tunisie, alors que l'extrait méthanolique montre une teneur moyenne supérieure de $24,33 \pm 1,17$ mg EC/g. Aucune trace de tanins dans l'extrait aqueux n'a été détectée. Dans le cas de *Ruta graveolens* d'origine de Marseille, l'extrait éthanolique a une teneur en tanins de $12,33 \pm 3,53$ mg EC/g alors que celle de l'extrait méthanolique était de $7,33 \pm 1,17$ mg EC/g, et absence de tanins dans l'extrait aqueux.

III.2.5. Teneur en caroténoïdes

La teneur moyenne en caroténoïdes est de 3.94 ± 0.08 $\mu\text{g E}\beta\text{-carotène / mg d'MS}$.

III.2.6. Teneur en pigments liposolubles

Les teneurs en pigments liposolubles des différents extraits du *Ruta sp* sont données dans le tableau I.

Tableau I. Les teneurs en pigments liposolubles des différents extraits du *Ruta sp* en (mg/g d'ES).

Pigments Solvants	Chlorophylle a	Chlorophylle b	Lycopène	β -carotène
Méthanol	24,08	13,81	1,89	2,71
Ethanol	27,31	13,97	1,32	10,36
Acétone	34,52	10,07	3,47	13,29
Aqueux	1,39	1,42	0,18	2,6

D'après ce tableau, on peut voir que tous les extraits présentent des concentrations élevées en chlorophylle a et b. En termes de teneurs en lycopène et β -carotène, les extraits montrent des teneurs variables.

III.3. Résultats et discussion de l'activité antioxydante

Plusieurs études ont montré que l'effet antioxydant des sources naturels est dû à leurs teneurs en composés phénoliques (**Yang *et al.*, 2002**), et que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants (**Heigen *et al.*, 2001**; **Heim *et al.*, 2002**). Pour les flavonoïdes, les formes aglycones sont plus actives que les formes glycosylées (**Shahidi et Nacz, 2004**). Donc y a des relations entre les structures chimiques des composés phénoliques et leur capacités antioxydantes, l'activité de ces molécules à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leur structures, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'- 4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (**Amic *et al.*, 2003** ; **Marfak, 2003** ; **Sokol-Letowska, 2007**).

III.3.1. Activité scavenger à l'égard du radical libre DPPH

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait éthanolique semble être le plus actif avec une IC_{50} de $1,15 \pm 0,02$ mg/ml, suivi de l'extrait acétonique et de l'extrait méthanolique avec des valeurs d' IC_{50} de $1,91 \pm 0,01$ mg/ml, et $2,15 \pm 0,05$ mg/ml, respectivement. L'extrait aqueux a montré la plus faible activité anti-radicalaire ($IC_{50} = 6,79 \pm 0,11$ mg/ml) (**Fig. 11**).

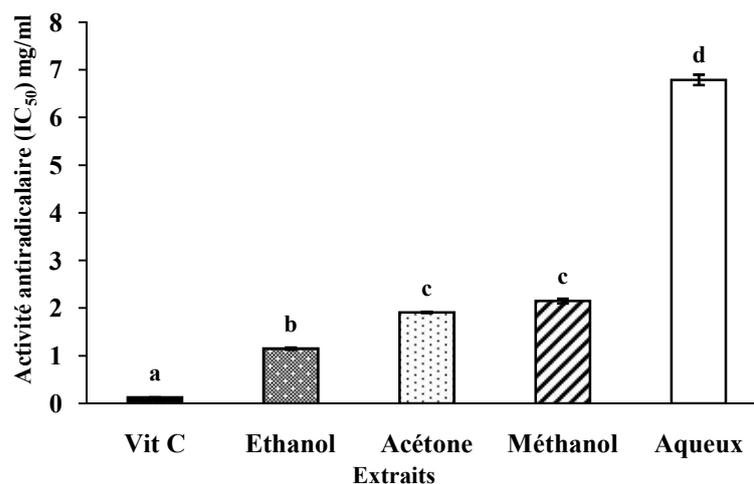


Figure 11. Histogramme montrant l'activité scavenger des différents extraits de *Ruta sp* à l'égard du radical DPPH.

Les lettres a, b, c, d signifiant que la différence est statistiquement significative à $p < 0,05$.

Dans ce test, la vitamine C a été utilisée comme antioxydant standard à des fins comparatives. Elle a montré une très forte activité antiradicalaire avec une IC_{50} de $0,125 \pm 0,004$ mg/ml.

Selon les résultats obtenus de la plante étudiée, l'effet scavenger reste inférieur à ceux de **Halouani et al. (2021)** qui ont montré une capacité importante des extraits de *Ruta graveolens* d'origine Tunisienne avec des valeurs d' IC_{50} de $0,25 \pm 0,01$ mg/ml (extrait éthanolique), $0,12 \pm 0,04$ mg/ml (extrait méthanolique), et $1,55 \pm 0,02$ mg/ml (extrait aqueux). Alors que dans le cas de *Ruta graveolens* d'origine de Marseille, les valeurs d' IC_{50} sont de $0,12 \pm 0,04$ mg/ml (extrait éthanolique), $0,05 \pm 0,01$ mg/ml (extrait méthanolique), et $1,66 \pm 0,07$ mg/ml (extrait aqueux)

III.3.2. Pouvoir réducteur

Les résultats de ce test ont montré que le pouvoir réducteur des extraits étudiés varie en fonction du solvant utilisé.

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait acétonique semble être le plus actif avec une IC_{50} de $7,12 \pm 0,11$ mg/ml, suivi de l'extrait éthanolique et de l'extrait méthanolique avec des valeurs d' IC_{50} de $7,48 \pm 0,03$ mg/ml, et $7,67 \pm 0,03$ mg/ml, respectivement. L'extrait aqueux a montré la plus faible activité anti-radicalaire ($IC_{50} = 11,19 \pm 0,05$ mg/ml) (**Fig. 12**).

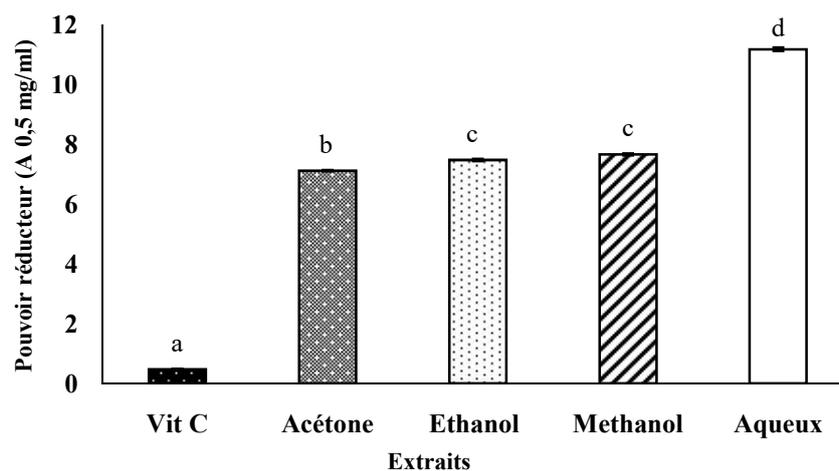


Figure 12. Histogramme montrant le pouvoir réducteur des extraits de *Ruta sp.*

Les lettres a, b, c, d signifiant que la différence est statistiquement significative à $p < 0,05$.

Une activité plus élevée a été rapportée par **Halouani et al. (2021)** avec l'extrait éthanolique et méthanolique de *Ruta graveolens* Tunisienne ($IC_{50} = 1,29 \pm 0,07$ et $2,05 \pm 0,01$ mg/ml, respectivement). Alors que dans l'extrait éthanolique et l'extrait méthanolique de *Ruta graveolens* d'origine de Marseille ($IC_{50} = 1,57 \pm 0,01$ et $0,96 \pm 0,02$ mg/ml, respectivement).

III.3.3. Capacité antioxydante totale

Les résultats obtenus ont montré que l'activité antioxydante totale varie également en fonction des différents extraits de *Ruta sp* (**Fig.13**)

L'extrait le plus actif est l'extrait acétonique ($275,83 \pm 14,26$ $\mu\text{g EAA} / \text{mg}$), suivi par l'extrait éthanolique ($208,81 \pm 8,29$ $\mu\text{g EAA} / \text{mg}$), puis l'extrait méthanolique ($172,42 \pm 11,81$ $\mu\text{g EAA} / \text{mg}$), et en fin l'extrait aqueux ($120,83 \pm 3,20$ $\mu\text{g EAA} / \text{mg}$).

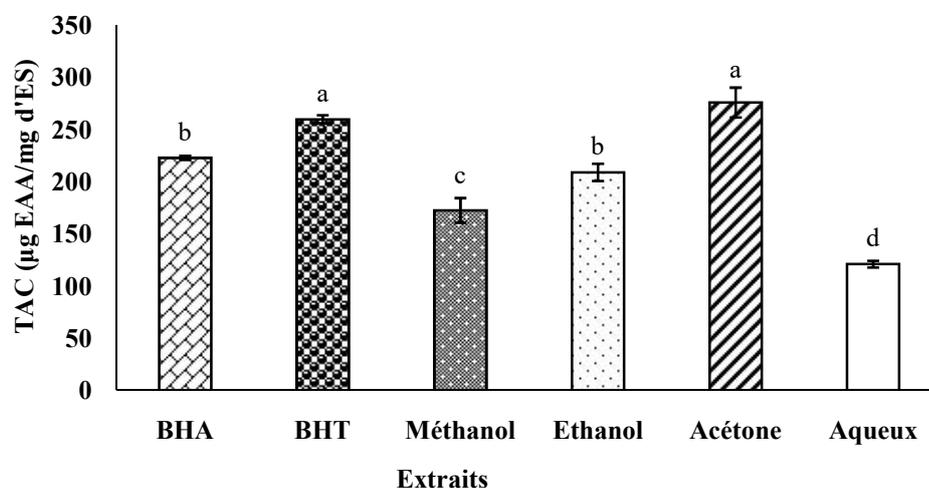


Figure 13. Histogramme montrant l'activité antioxydante totale des extraits de *Ruta sp.*

Les lettres a, b, c, d signifiant que la différence est statistiquement significative à $p < 0,05$.

III.4. Résultats et discussion de l'activité antimicrobienne

III.4.1. Résultats et discussion de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des quatre extraits a été déterminée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des puits contenant les extraits vis-à-vis de trois germes pathogènes de bactéries (Gram + et Gram -) (**Tableau II**).

Tableau II. Diamètres des zones d'inhibition (mm) en présence des différents extraits de *Ruta sp.*

Solvant	Zones d'inhibition en mm		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Méthanol	20,01 ± 0,60	17,97 ± 0,72	25,55 ± 0,56
Ethanol	21,46 ± 0,64	18,10 ± 0,08	29,19 ± 0,91
Acétone	21,65 ± 0,80	17,96 ± 0,09	26,54 ± 1,15
Aqueux	22,01 ± 0,48	Pas d'activité	22,95 ± 0,94
Gentamicine	44,17 ± 1,06	51,18 ± 2,44	51,42 ± 1,12

Dans le présent travail, la concentration maximale des extraits était de 128 mg/ml et de 40 mg/ml pour la gentamicine.

L'évaluation de l'effet antibactérien montre que tous les extraits ont une activité inhibitrice sur presque l'ensemble des souches étudiées avec un important pouvoir sur les bactéries à Gram positif par rapport aux Gram négatif, où la croissance bactérienne décroît d'une manière dose-dépendant (**Annexes 13, 14, 15**).

D'après le **tableau II**, nous pouvons voir que l'extrait éthanolique présente la plus forte activité antibactérienne surtout vis-à-vis de *E. coli* et de *S. aureus* avec des diamètres de 18,10 ± 0,08 mm et 29,19 ± 0,91 mm, respectivement. Alors que l'extrait aqueux exerce une forte activité antibactérienne vis-à-vis de *P. aeruginosa* avec un diamètre de 22,01 ± 0,48 mm.

On peut déduire d'après les diamètres des zones d'inhibition que *S. aureus* et *P. aeruginosa* sont extrêmement sensibles à l'action des extraits de *Ruta sp.*

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des extraits de *Ruta sp.* sont représentées dans le **tableau III**.

Tableau III. Concentrations minimales inhibitrices (CMI), bactéricides (CMB), en mg/ml des différents extraits vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Extraits	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	CMI mg/ml	CMB mg/ml	CMI mg/ml	CMB mg/ml	CMI mg/ml	CMB mg/ml
Méthanol	8	128	16	128	8	64
Ethanol	16	128	32	128	8	64
Acétone	8	128	16	128	4	64
Aqueux	32	128	/	/	32	128

Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides obtenues dans le présent travail pour *E. coli* et *S. aureus* sont supérieures à celles obtenues par **Halouani et al. (2021)** avec l'extrait éthanolique et méthanolique de *Ruta graveolens*, où les CMI pour ces deux bactéries étaient de 2,5 mg/ml, alors que les CMB étaient de 5 mg/ml.

De nombreuses études ont montré que les bactéries à Gram positif sont très sensibles par rapport aux bactéries à Gram négatif. La résistance des bactéries à Gram négatif peut être attribuée à la présence de la membrane externe riche en lipopolysaccharides entourant la paroi de la cellule qui limite l'accès aux agents antimicrobiens, et imperméable aux composés lipophiles grâce aux charges négatives de la surface de son revêtement lipopolysaccharidique, contrairement aux bactéries à Gram positif qui sont moins protégées contre les agents externes (détergents et antibiotiques) (**Brahmi et al., 2016**).

III.4.2. Résultats et discussion de l'activité antifongique

L'activité antifongique des quatre extraits de *Ruta sp* a été déterminée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition en cm, les résultats sont présentés dans le **tableau IV**.

Tableau IV. Diamètres des zones d'inhibition en (cm) et le taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage en présence des différents extraits de *Ruta sp*.

Extraits	Méthanol		Ethanol		Acétone		Aqueux	
	DZI cm	T%						
<i>F. oxysporum</i>	2,96 ± 0,16	59,26 ± 3,36	2,47 ± 0,08	49,53 ± 1,62	3,52 ± 0,10	70,53 ± 2,13	/	/
<i>Penicillium sp</i>	1,76 ± 0,07	58,66 ± 2,33	1,54 ± 0,11	51,44 ± 3,88	1,05 ± 0,06	34,99 ± 2,08	1,17 ± 0,05	38,99 ± 1,66

DZI : Diamètre de zone d'inhibition (cm) / **T%** : taux d'inhibition de la croissance du mycélium.

L'évaluation de l'effet antifongique montre que tous les extraits ont une activité inhibitrice sur les deux champignons étudiés sauf l'extrait aqueux où l'effet est insignifiant notamment vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*, cette activité inhibitrice montre que la croissance fongique décroît d'une manière dose-dépendant (**Annexe 16**).

D'après le **tableau IV**, l'extrait acétonique présente la plus grande activité antifongique vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*, avec un diamètre de zone d'inhibition de $3,52 \pm 0,10$ cm, alors que l'extrait méthanolique présente la plus grande activité antifongique vis-à-vis de *Penicillium sp* avec un diamètre de zone d'inhibition de $1,76 \pm 0,07$ cm.

Le pourcentage d'inhibition obtenu dans le présent travail pour *Fusarium oxysporum* est supérieur à celui rapporté par **Allouni (2018)** qui a travaillé sur l'extrait méthanolique des feuilles de *Ruta montana* et qui a obtenu un pourcentage d'inhibition de 22,22%.

Tableau V. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF), en mg/ml des différents extraits vis-à-vis de *Fusarium oxysporum* et *Penicillium sp*.

Extraits	Méthanol		Ethanol		Acétone		Aqueux	
	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF	CMI	CMF
<i>F. oxysporum</i>	8	16	4	16	16	128	/	/
<i>Penicillium sp</i>	4	16	4	16	16	64	4	16

Les extraits obtenus à partir des parties supérieures de la plante étudiée possèdent la capacité de réduire ou de supprimer la croissance des champignons toxigènes. Cette activité serait liée à l'inhibition de la fonctionnalité et de la structure de la membrane cellulaire (**Thanaboripat et al., 1997 ; Sikkema et al., 1995**). Ces extraits pourraient aussi bloquer entièrement la biosynthèse des mycotoxines (**Bhatnagar et McCormick, 1988**). Cette activité antifongique est généralement attribuée à l'acide p-coumarique, la quercitrine, l'acide rosmarinique, et particulièrement à la quercétine et à l'acide isochlorogénique (**Halouani et al., 2021**).

Conclusion

IV. Conclusion

La phytothérapie représente l'un des domaines les plus importants de la médecine traditionnelle. Les plantes médicinales représentent un réservoir de principes actifs et sont de plus en plus utilisées dans le domaine de la santé publique ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. De plus, les plantes médicinales et aromatiques sont considérées comme une source importante de nouveaux médicaments à cause de leur constitution précieuse en molécules bioactives.

Ce travail a pour but de contribuer à l'étude physicochimique, phytochimique, et évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne de différents extraits (méthanolique, éthanolique, acétonique et aqueux) d'une plante locale *Ruta sp*, qui est une plante médicinale, originaire de la région méditerranéenne, appartenant à la famille des Rutacées.

L'analyse quantitative des extraits étudiés montrent une richesse en polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes, et en tannins. Les résultats de l'activité antioxydante montrent que les extraits exercent une bonne capacité de piégeage des radicaux libres et un bon pouvoir réducteur ainsi qu'une meilleure activité antioxydante totale.

Les résultats de l'étude microbiologique montrent que les extraits de *Ruta sp* exercent une bonne activité inhibitrice à l'égard, notamment, des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) par rapport aux bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) mais aussi vis-à-vis des champignons (*Penicillium sp* et *Fusarium oxysporum*).

Tous ces résultats indiquent bien que les composés phénoliques de l'espèce *Ruta sp* pourraient être utilisés comme des antioxydants ou bien pour la lutte microbienne (champignons et bactéries pathogènes). Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets. Donc il serait intéressant d'explorer d'autres aspects tels que :

- Isolement, caractérisation et identification des différents constituants de chaque extrait de la plante par des techniques d'analyse avancées (HPLC), pour connaître la ou les molécules à l'origine des effets antioxydants, antibactériens et l'éventuelle synergie entre elles afin d'établir une relation structure - activité.
- Elargir le spectre de l'activité antioxydante *in vitro* et *in vivo*.

- Orienter l'étude vers d'autres activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoire, anticancéreuse,...etc. et détermination des mécanismes d'action des composés actifs.
- Réaliser des études sur les autres parties de la plante (les racines de *Ruta sp.*).
- Etude de l'efficacité de ces extraits dans le domaine alimentaire afin d'établir leurs utilités comme agents antioxydants ou antimicrobiens naturels dans la sécurité alimentaire.
- Il est très important d'extraire et de tester les activités biologiques des huiles essentielles de cette plante.
- Envisager la formulation d'un médicament à base de la plante.

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

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

Allouni R. (2018). Etude des aspects morphologiques, phytochimiques et pharmaco-toxicologiques de la plante *Ruta montana*. Thèse de Doctorat. Département de Biochimie. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie. 183p.

Amic D., Davidovic-Amic D., Beslo D., Trinajstić N. (2003). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemical Acta*, 76: 55-61.

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis (13th edn). Association of Official Analytical Chemists: Washington, D C. Agron. Fr (1), p12.

Asgarpanah J., Khoshkam R. (2012). Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. *Journal of medicinal plants research*. 6(23), 3942-3949.

ASPC (Agence de la santé publique Canada). (2010). Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes – *Pseudomonas spp.* Consulté le 24/05/2021. (<https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/pseudomonas.html>)

Attou A. (2011). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. MEMOIRE MAGISTER EN BIOLOGIE, UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN, 119p.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99, 191–2.

Benkiki N. (2006). Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de doctorat en chimie, Université El-Hadj Lakhdar Batna, 198p.

Bhatnagar D., McCormick S.P. (1988). The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of the American Oil Chemical Society* 65: 1166–1168.

BIPEA. (1976). Bureau interprofessionnel d'études analytique, Recueil des Méthodes d'Analyse des Communautés Européennes. BIPEA: Genevilliers; 51-52.

Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, Ed. Masson, Paris

Bouchard. (2019). *Penicillium*- une moisissure utile ou dangereuse ? Décontamination Québec inc, RBQ # 5731-2605-01, 1645, Av. des Affaires Québec, Qc G3J 1Y7

Bousakhraoui M., Zouhair S., Soraa N., Benaouda A., Zerouali K., Mahmoud M. (2017). Le guide pratique des bactéries pathogènes. Société marocaine d'infectiologie pédiatrique et de vaccinologie. 99p.

Brahmi F., Abdenour A., Bruno M., Silvia P., Alessandra P., Danilo F., & Mohamed, C. (2016). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. And *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, 96-105.

Références bibliographiques

Burits M., Bucar F. (2000). Antioxidant Activity of *Nigella Sativa* Essential Oil, *Phytotherapy.Res.*, 5(14), 323-328. [http:// doi.org/ 10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<323: AID-PTR621>3.0.CO; 2-Q](http://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<323:AID-PTR621>3.0.CO;2-Q).

Bush M. (2020 a). développement d'une infection. Manuel MSD.

<https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/infections/biologie-des-maladies-infectieuses/d%C3%A9veloppement-d-une-infection>. Consulter le 11/06/2022.

Bush M. (2020 b). Infection à *Escherichia Coli*. Manuel MSD.

<https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/infections/infections-bact%C3%A9riennes-bact%C3%A9ries-gram-n%C3%A9gatives/infections-%C3%A0-escherichia-coli>. Consulter le 11/06/2022.

Bush M. (2020 c). Infections à *Pseudomonas*. [https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/infections/infections-bactériennes-bactéries-gram négatives/infections-à -pseudomonas](https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/infections/infections-bactériennes-bactéries-gram-négatives/infections-à-pseudomonas). Consulter le 27 Mai 2022.

Bush M.,Vazquez-Pertejo. (2021). Infections staphylococciques. Manuel MSD.

<https://www.msdmanuals.com/fr/professional/maladies-infectieuses/cocci-gram-positifs/infections-staphylococciques>. Consulter le 27 Mai 2022.

CA-SFM. (2013). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Sur le lien : <http://www.sfm.asso.fr>.

Daglia M. (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Cur.Opinion in Biotech.*23(2), 1-8.16- doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007

Doerper S. (2008). Modification de la synthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens L.* par une approche de génie métabolique. Thèse de doctorat En Sciences Agronomiques, Laboratoire Agronomie et environnement. Institut National Polytechnique de Lorraine. p: 39-41.

Dubois M.K.A.,Gilli Y.K., Hamilton P.A. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances *Anal And chem*, 28 :350-356.

Fang Y-Z., Yang S., Wu G. (2002). Free radicals, Antioxydants, and Nutrition. *Nutrition*. 18: 872-879.

Fellah S., Romdhane M., Abderraba M. (2006). Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia Officinalis* cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie, *Journal société algérienne de Chimie*, 16: 193.

Fettah A. (2019). Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante *Teucrium polium L.* sous espèce Thymoïdes de la région Beni Souik, Biskra. Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider, Biskra. 94p.

Haddouchi F., Zerhouni K., Sidi-Yekhelef A., Chaouche T.M. (2016). Evaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas subsp. rupestre*. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de liège*, 85, 152-159.

Halouani A., Abdelli M., Slama I., Aouf I., Mastouri M., Hamdi A., Rhouma M. B. (2021). Evaluation of the Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaves Extracts of *Ruta graveolens*. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*,37(3), 29393-29405.

Références bibliographiques

Hazzit M., Benchabane A., Baaliouamer A., Alloun K., Kaci M. (2015). COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DE L'EXTRAIT NON VOLATIL ET DES HUILES ESSENTIELLES DE LA RUE DES MONTAGNES (*Ruta montana L.*). Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie .N°27.

Heignen C.G.M., Haenonn G.R.M.M., Vekemans J.A.J.M., BAST A. (2001). Peroxy nitrite scavenging of flavonoids: structure activity relation ship; Environ. Toxicol. Pharmacol 10: 199-206.

Heim K.E., Taglia ferro A.R., Bobilya D.J. (2002): Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relation ship; Journal. Nutr. Biochem. 13: 572-584

Hélène L. (2014). Le médicament à base de plantes en Europe : statut, enregistrement, contrôles. THÈSE Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Strasbourg École doctorale : « Sciences de la Vie et de la Santé » Discipline : « Sciences Pharmaceutiques » Spécialité : « Droit Pharmaceutique »,342p .

Hu Q., Luo Y. (2016). Polyphenol-chitosan conjugates :Synthesis, characterization, and applications. Carbohydrate polymers, 151, 624-639.

Jain D.P., Pancholi S.S ., Rakesh Patel R. (2011). Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2, 177–183.

Jean D. (1992). La culture de la Rue. Ecological agriculture projects. Mc Gill University (Macdonald Campus) Ste-Anne-de-Bellevue, QC, H9X 3V9 Canada.

Jean-Yves C. (2010). Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat. Faculté de Pharmacie. Université Henri Poincaré, NANCY 1.184p.

Korra W., Selmi Y. (2020). Activité antioxydant de la plante médicinale *Bunium mauritanicum L.* Mémoire Master. Département des sciences de la nature et de la vie. Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie. Université Mohamed Khider, Biskra, Algérie. 68p.

Ksouri R., Falleh H., Megdiche W., Trabelsi N., Mhamdi B., Chaieb K., Abdelly C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica L.* And related polyphenolic constituents. *Food and Chemical toxicology*, 47(8), 2083-2091.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine.J. Agric. Food Chem, 51: 7292-7295.

Leveau S. B., Bouix M. (1993). Les microorganismes d'intérêt industriel, Lavoisier Apria, p 110-163.

Marfak A. (2003). Radiolyse Gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat, 220.

Min B.R., Pinchak W.E., Merkel R., Walker S., Tomita G., Anderson R.C. (2008). Comparative antimicrobial activity of tannins extracts from perennial plants on mastitis pathogens. *Scientific Research and Essay*, 3(2): 66-73.

MNH and OFB (Ed). 2003-2022. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN): https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/119716/tab/taxo

Références bibliographiques

Motiėjunaitė et Peiculytė. (2004). Fungicidal properties of *Pinussyl vestris L.* for improvement of air quality. *Medicina (Kaunas)*, 40 (8): 787-794

Nagata M., Yamashita I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39(10), 925-928.

Night F., Usman M., Muneer Ahmed Q. (2016). Biological evaluation of endophytic fungus *Chaetomium sp.* NF15 of *Justicia adhatoda L.*: a potential candidate for drug discovery. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(6).

Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307–315.

Parray S. A., Bhat J., Ahmad G., Jahan N., Sofi G., Faisal Iqbal S. M. (2012). *Ruta graveolens*: from Traditional System of Medicine to Modern Pharmacology: an Overview. *American Journal of Pharm Tech Research* [En ligne]. 22 (2). 2249-3387.

Pollio A, De Natale A, Appetiti E, Alliota G, Touwaide A. (2008). Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta spp.* (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *Journal of Ethnopharmacology* 116 (2008) 469–482.

Ponce A. G., Fritz R., Del Valle C., Roura S. I. (2003). *J. Lebensm.-Wiss.u.-Technol*, 36: 679-684.

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

Renugadevi V., Meerabai RS. (2016). PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LEAF EXTRACT OF *Ruta graveolens L.*, JOURNAL OF INTERNATIONAL ACADEMIC RESEARCH FOR MULTIDISCIPLINARY Impact Factor 2.417, ISSN: 2320-5083, Volume 4, Issue 3, 9 pages.

Rérolle F. (2012). Médicament homéopathiques. Docteur clic. Dernière mis à jour le 04/04/2012

Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé. Université Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc.170p.

Rizwan A. (2018). Introductory chapter : basics of free radicals and antioxydants. Free radicals, antioxidants and diseases, 1,18-21.

Rodriguez-Amaya D. B. (2001). A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI Human Nutrition Institute. One Thomas Circle, NW, *Washington DC*, 20005-5802, 64.

Rodriguez-Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca D., Nadra M.C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18: 93-101.

Ruiz G. (2005). Extraction, détermination structurale, et valorisation chimique de phycocolloïdes d'algues rouges. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences et Techniques, discipline: Chimie appliquée, chimie de substances naturelles. Université de Limoges. France. 258p.

Références bibliographiques

- Salama H.M.H., Marraiki N. (2010).** Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (polygonaceae), naturally growing in Egypt, Saudi. *Journal of biological sciences*, 17:57-63.
- Sass-Kiss A., Kiss j., Milotay P., Kerek M. M., Toth-Markus M.(2005).** Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruit and végétebaies. *Food reseach international*, 20:1023-1029.
- Shahidi F., Nacz M. (2004).** Extraction and analysis of phenolics in food; *Journal of Chromatography A* 1054; Ed: ELSEVIER, 95-111.
- Shebis Y., Iluz D., Kinel-Tahan Y., Dubinsky Z., Yehoshua Y. (2013).** Natural antioxidants : function and sources.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B. (1995).** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 59: 201-222.
- Singleton V.L., Rossi J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic phosphotungstic acids reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144–158.
- Sivaraj R., Balakrishnan A., Thenmozhi M., Venckatesh R. (2011).** Antimicrobial activity of *Aegle marmelos*, *Ruta graveolens*, *Opuntia dellini*, *Euphorbia royleena* and *Euphorbia antiquorum*. *Journal of Pharmacy research*, 4(5), 1507-1508
- Sokol-Letowska A., Oszmiansk J., wojdylo A. (2007).** Antioxydant activity of the phenolic compounds of Hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 103: 853-859.
- Sun B., Ricardo-da-Silva J. M., Spranger I. (1998).** Criticalb factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4267-4274.
- Thanaboripat D., Nontabenjawan K., Leesin K., Teerapiannont D., Sukhareon O., Ruangrattanamatee V. (1997).** Inhibitory effects of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Journal of Forestry Research* 8: 39–42.
- Voynaud L. (2020).** Fiche technique pépinière ornementale : fusariose. Réseau d’avertissements phytosanitaires. Canada Québec.
- Yang J.H., Lin H.C., Mau J.L. (2002).** Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 77: 229-235.

Annexes

Annexe 1. Culture de matériel végétal le 18/10/2021.



Annexe 2. Evolution de croissance.



Annexe 3. Protection des échantillons pendant les rigueurs de l'hiver.



Annexe 4. Echantillon prêt pour la récolte.



Annexe 5. Récolte du matériel végétal.



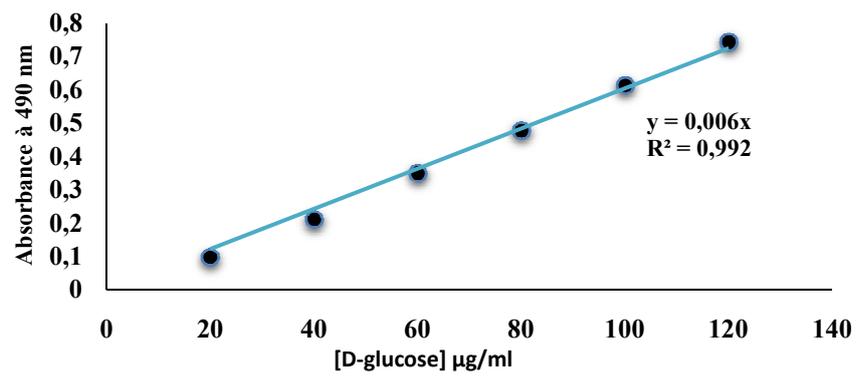
Annexe 6. Séchage à l'air libre, à température ambiante et à l'ombre.



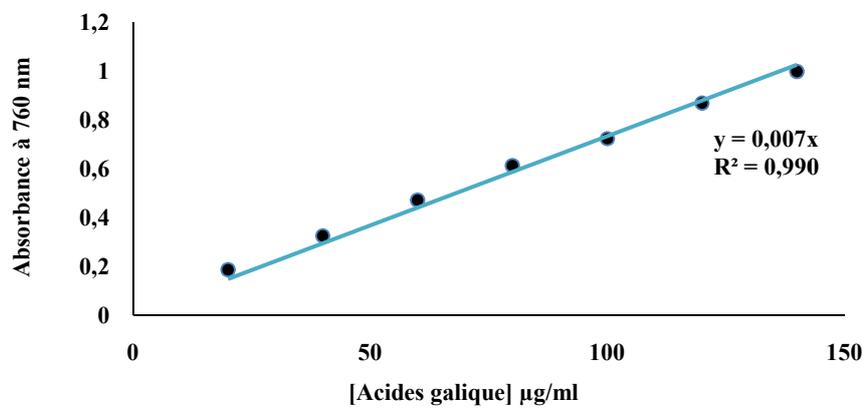
Annexe 7. Teneur en matière grasse et en protéine.



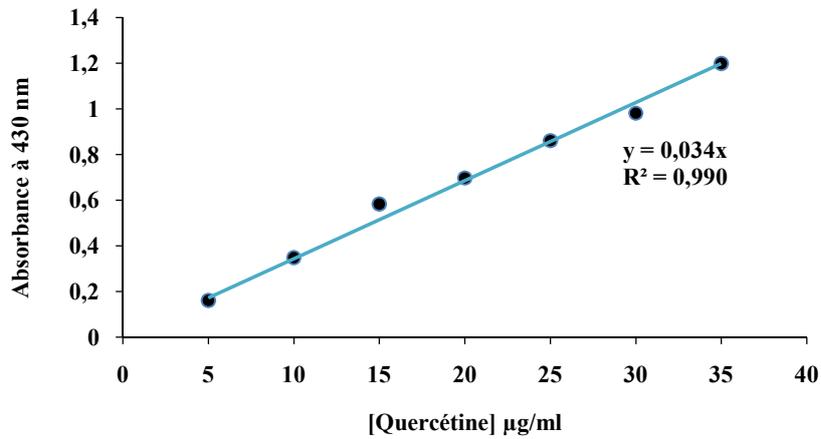
Annexe 8. Courbe d'étalonnage du D-glucose



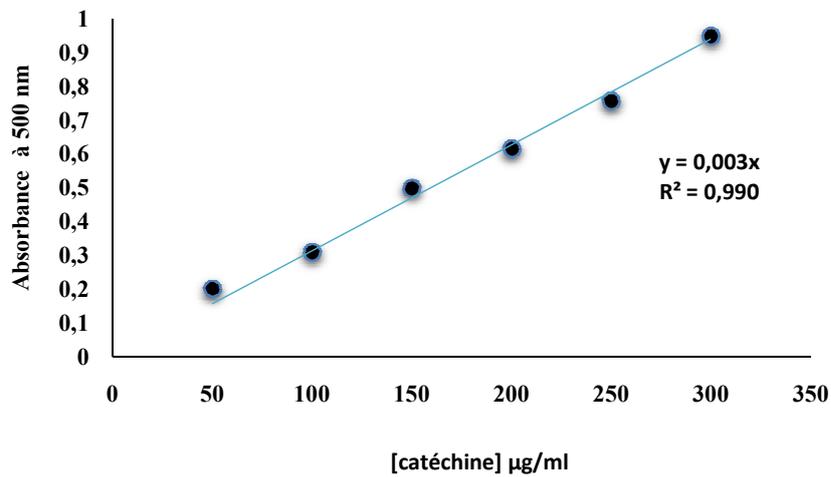
Annexe 9. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



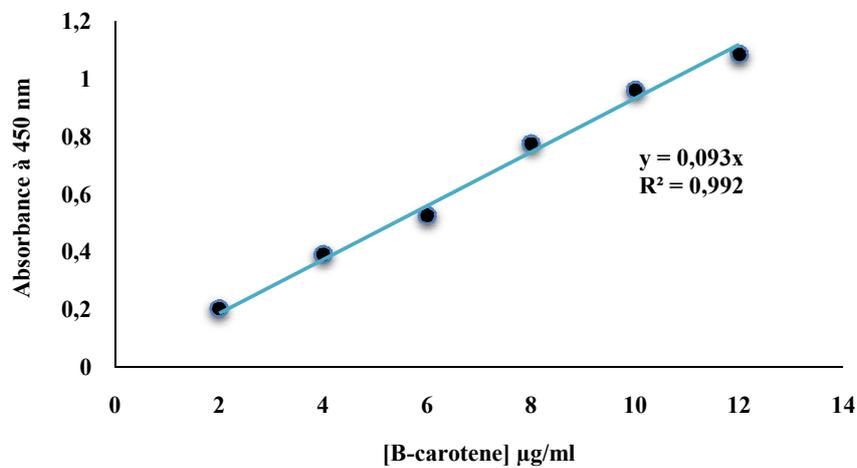
Annexe 10. Courbe d'étalonnage de la quercétine.



Annexe 11. Courbe d'étalonnage de la catéchine.



Annexe 12. Courbe d'étalonnage du β - carotène.



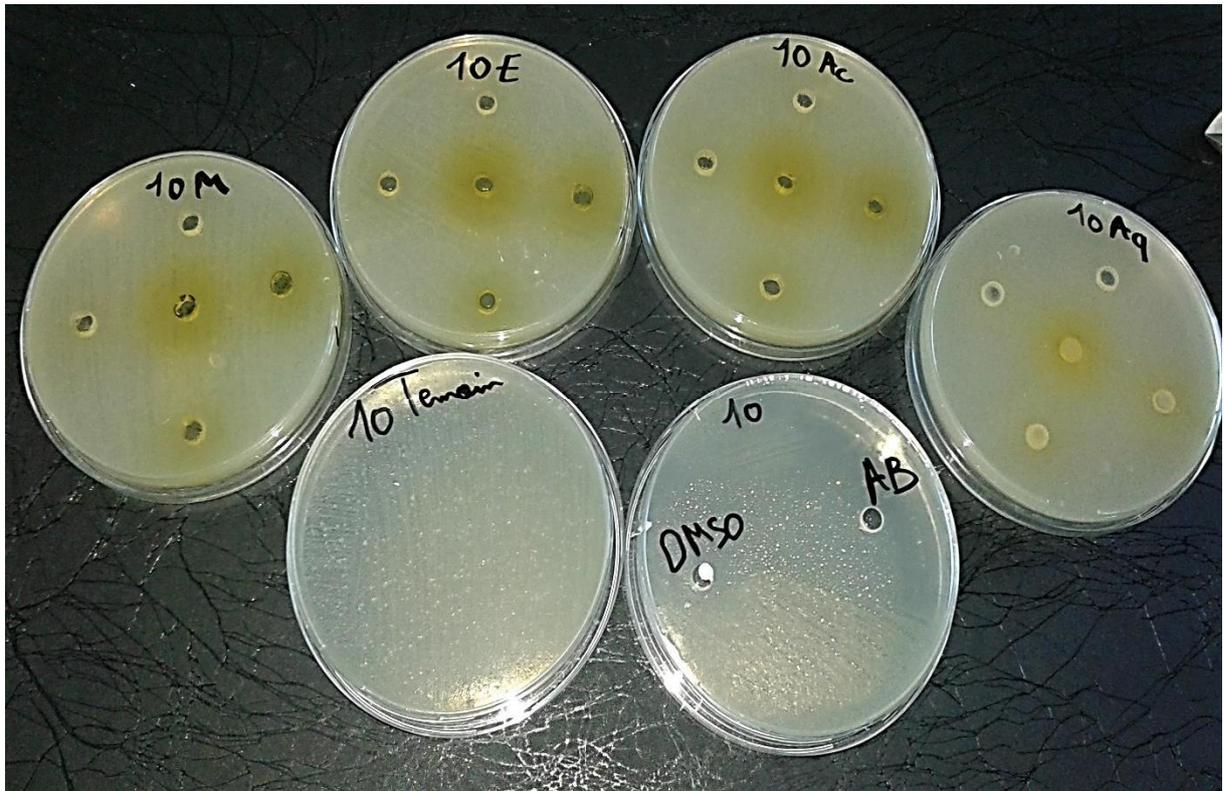
Annexe 13. Image montrant les résultats de l'activité antibactérienne sur des extraits *Pseudomonas aeruginosa*.



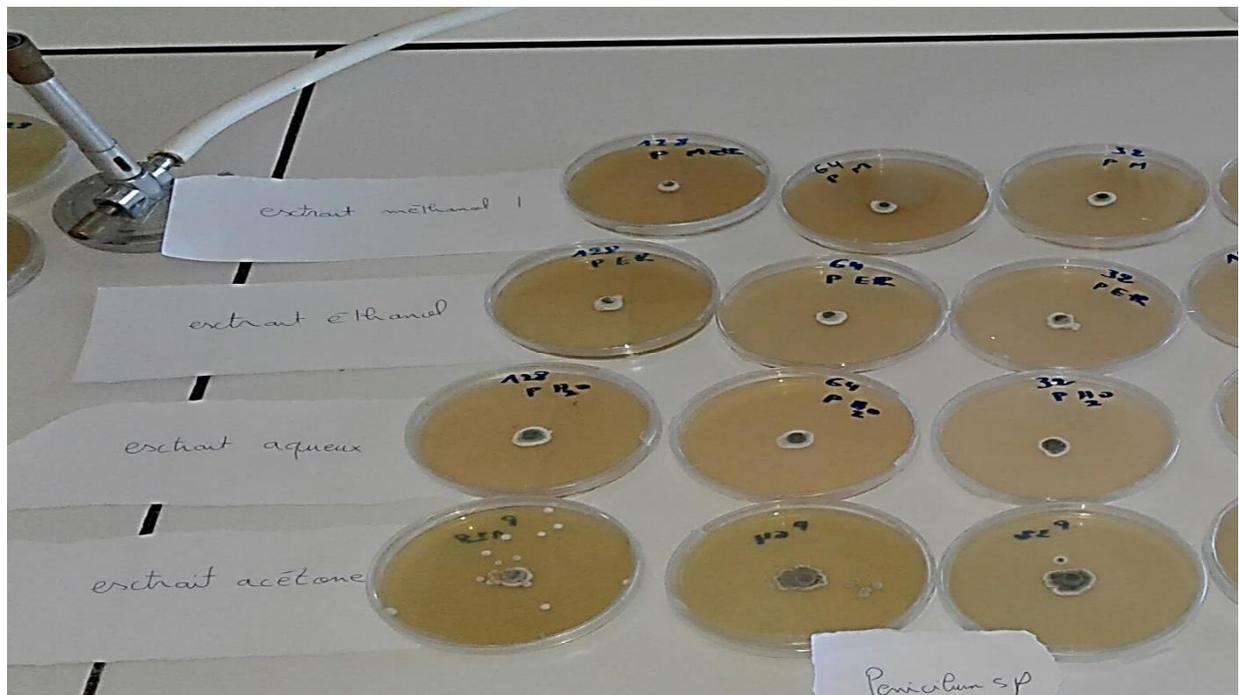
Annexe 14. Image montrant les résultats de l'activité antibactérienne des extraits sur *Escherichia coli*.



Annexe 15. Image montrant les résultats de l'activité antibactérienne des extraits sur *Staphylococcus aureus*.



Annexe 16. Evolution de l'activité antifongique (après 3 jours)



Annexe 17. Présentation de ce travail à la communauté scientifique.

Etude physicochimique et activité antioxydante des extraits d'une plante de la famille des Rutacés



Herem Ibtissem¹, Hanifi Lamia¹, Bellik Yuva¹, Mekhoukh Nasreddine², Sid Nassim¹

¹Laboratoire Santé et Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimî, Bordj Bou Arreridj, 34000, E-mail: Algérie. (y.bellik@univ-bba.dz)

²Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira, Bejaia, 06000, Algérie.



Introduction

Depuis les temps les plus anciens, l'homme s'est habitué à utiliser les plantes pour leurs propriétés médicinales et nutritives afin de traiter et soigner toute sorte de maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de métabolites secondaires qui ont l'avantage d'avoir une grande diversité de structure chimique et de propriétés biologiques.

Parmi les espèces ayant potentiellement un intérêt dans le domaine pharmaceutique et qui ont démontré plusieurs activités biologiques grâce à leur richesse en substances bioactives, les plantes de la famille des Rutacés [1]. La plante étudiée dans le présent travail est une plante vivace herbacée, originaire de la région méditerranéenne. Elle appartient à la famille des Rutacée qui contient environ 160 genre et plus de 1600 espèces. Cette plante est cultivée comme herbe ornementale dans les jardins. En effet, cette plante est une herbe odoriférante et médicinale bien connue dans les civilisations anciennes. En homéopathie, elle est utilisée pour le traitement des douleurs musculaires, des blessures, des douleurs articulaires, arthrite, rhumatismes, maux de dents et de tête.

En effet, plusieurs composés phénoliques extraits à partir de cette plante ont montré un bon pouvoir antioxydant et d'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives [2,3].

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'analyse physicochimique, l'extraction et le dosage des polyphénols en utilisant différents solvants, et l'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro* à travers le test de DPPH et le pouvoir réducteur.

Matériel et Méthodes

I- Matériel végétale

Le matériel végétale utilisé dans cette étude expérimentale est la partie aérienne (feuilles et tige) d'une plante de la famille des Rutacée. Elle a été récoltée le 11 Mars 2022, dans la région d'El Ach, Daira d'El Hammadia, Wilaya de Bordj Bou Arreridj.

II- Analyse physicochimique

- II-1. Teneur en eau.
- II-2. Humidité de la poudre et détermination du taux de cendre [4].
- II-3. Teneur en matière grasse et dosage des protéines [5].
- II-4. Dosage des glucides (Dubois, 1956) [6].

III- Etude phytochimique

- III-1. Extraction et dosage des composés phénoliques [7].

III-2. Evaluation de l'activité antioxydante

- III-2-1. Activité scavenger du radical DPPH[8].
- III-2-2. Pouvoir réducteur[9].



Résultats

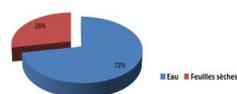


Figure 1. Teneur en eau des feuilles fraîches

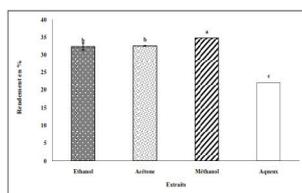


Figure 3. Rendement d'extraction: le taux le plus élevé a été détecté dans l'extrait méthanolique (34,773 ± 1,01%), suivi de l'extrait acétonique (32,565 ± 0,24%), puis l'éthanol (32,346 ± 0,27%). L'extrait aqueux a montré le rendement le plus bas (21,98 ± 0,12%).

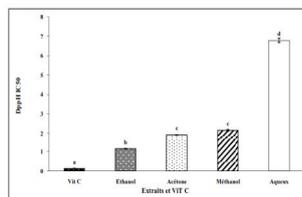


Figure 5. Activité scavenger des différents extraits à l'égard du radical DPPH : l'extrait éthanolique semble être le plus actif avec une IC_{50} de 1,15 ± 0,02 mg/ml, suivi de l'extrait acétonique et de l'extrait méthanolique avec des valeurs de IC_{50} de 1,91 ± 0,01 mg/ml, et 2,15 ± 0,05 mg/ml, respectivement. L'extrait aqueux a montré la plus faible activité antiradiculaire (IC_{50} = 6,79 ± 0,11 mg/ml) alors que la vitamine C qui est utilisée comme antioxydant standard montre une très forte activité antiradiculaire avec une IC_{50} de 0,125 ± 0,004 mg/ml.

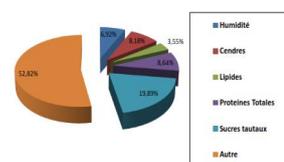


Figure 2. Résultats de l'analyse des paramètres physico-chimiques

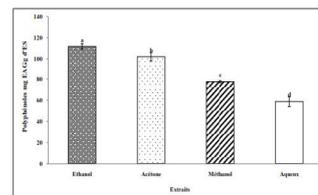


Figure 4. Teneurs en polyphénols totaux des différents extraits: la teneur la plus élevée a été détectée dans l'extrait éthanolique (111,77 ± 2,51 mg EAG/g ES) et l'extrait acétonique (102,09 ± 4,04 mg EAG/g ES), suivi par l'extrait méthanolique (77,52 ± 0,98 mg EAG/g ES), et l'extrait aqueux (58,76 ± 4,63 mg EAG/g ES).

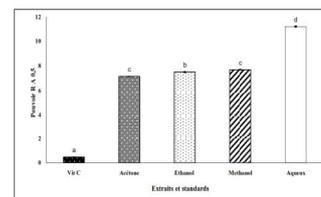


Figure 6. Pouvoir réducteur des différents extraits : l'extrait acétonique semble être le plus actif avec une IC_{50} de 7,12 ± 0,116 mg/ml, suivi de l'extrait éthanolique et de l'extrait méthanolique avec des valeurs de IC_{50} de 7,48 ± 0,037 mg/ml, et 7,67 ± 0,03 mg/ml, respectivement. L'extrait aqueux a montré la plus faible activité antiradiculaire (IC_{50} = 11,19 ± 0,055 mg/ml) alors que la vitamine C montre une très forte activité antiradiculaire avec une IC_{50} de 0,47 ± 0,003 mg/ml.

Conclusion

Le présent travail concerne l'étude physicochimique, phytochimique, et l'activité antioxydante de différents extraits méthanolique, éthanolique, acétonique et aqueux d'une plante de la famille des Rutacées. Tous les extraits montrent une richesse en polyphénols et les résultats de l'activité antioxydante montrent que les extraits exercent une bonne capacité de piégeage des radicaux libres et un bon pouvoir réducteur.

References

- [1] Halouani, A., Abdelli, M., Slama, I., Aouf, I., Mastouri, M., Hamdi, A., Rhouma, M. B. (2021). Evaluation of the Phenolic Contents, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Leaves Extracts of *Ruta graveolens*. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 3(7), 29393-29405.
- [2] Asgarpour, J., Khoshkam, R. (2012). Phytochemistry and pharmacological properties of *Ruta graveolens* L. *Journal of medicinal plants research*, 6(23), 3842-3849.
- [3] Amabye, T.G. (2015). Phytochemical screening and evaluation of antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. a medicinal plant grown around Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Natural Products Chemistry & Research*.
- [4] AOAC. (2000). Official Methods of Analysis (13^eedn). Association of Official Analytical Chemists: Washington, D. C. Agron. Fr (1), p12.
- [5] BIPEA. (1976). Bureau interprofessionnel d'études analytiques, Recueil des Méthodes d'Analyse des Communautés Européennes. BIPEA: Genevilliers; 51-52.
- [6] Dubois, M.K.A., Gilli, Y.K., Hamilton, P.A. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances *Anal And chem*, 28, 350-356.
- [7] Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdenum phosphotungstic acids reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 144-158.
- [8] Burits, M.; Bucar, F. (2000). Antioxidant Activity of *Nigella Sativa* Essential Oil. *Phytotherapy. Res.*, 5(14), 323-328.
- [9] Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44, 307-315.