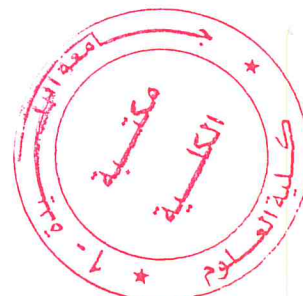


**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**UNIVERSITÉ de SAAD DAHLEB BLIDA 1**

**Faculté des sciences**

**Département de chimie**



## **Mémoire**

**En vue de l'obtention du diplôme de**  
**MASTER EN CHIMIE DES PRODUITS NATURELS**

**Intitulé du mémoire**

**Extraction, modification chimique et  
application antimicrobienne des  
furocoumarines du *Ruta Montana***

**Réalisé par :**

M<sup>me</sup> AIT SI ALI Khadidja

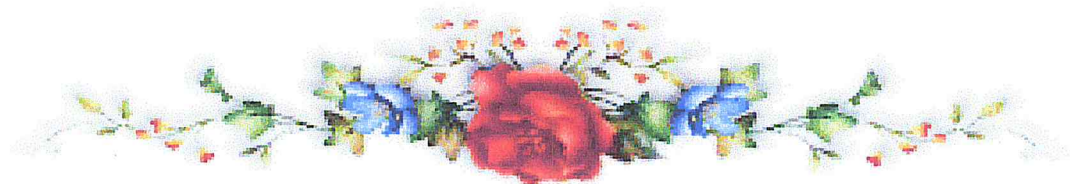
M<sup>me</sup> KADID Sabiha

**Encadré par :**

Pr BOUTOUMI.H

M<sup>me</sup> DRIOUECHE.A

**Année universitaire : 2017/2018**



## ***REMERCIEMENTS***

*En premier lieu nous remercions tout d'abord le bon DIEU «الله» de nous avoir donné le privilège et la chance d'étudier et de suivre le chemin de la science, ainsi que la force et le courage pour réalisation de ce modeste travail.*

*Nous témoignons notre vive reconnaissance à Monsieur H. BOUTOUMI d'avoir accepté d'encadrer notre travail, pour son soutien indéfectible et ses précieux conseils ainsi que ses orientations fructueuses durant l'élaboration de ce projet.*

*Nous tenons à remercier particulièrement Madame A. Deriouche notre co-encadreur pour sa disponibilité, sa gentillesse, sa patience de nous avoir aidé énormément dans laboratoire et encouragé et surtout pour les efforts quelle a déployé.*

*Nous remercions le docteur M<sup>me</sup> O. Touafek, Responsable de master de chimie des produits naturels.*

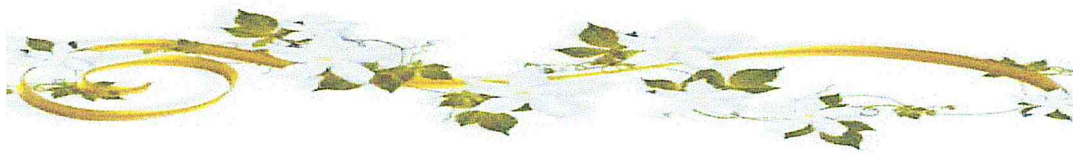
*Nous profitons de l'occasion qui nous 'est ainsi donnée pour exprimer nos sincères remerciements et toute notre gratitude à monsieur le professeur M. EL HATTAB, pour son aide et son soutien à tout les moments. Sa gentillesse et ses grandes qualités humaines ont fait de lui un responsable très spécial.*

*Nous exprimons nos plus sincères remerciements aux membres de jury qui ont accepté la lourde tâche de lire l'intégralité de ce manuscrit et de participer au jury de ma soutenance.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements à l'ensemble du personnel de laboratoire de chimie en particulier Monsieur **A. Chewaki** pour son aide précieuse.*

*Nous remercions infiniment M<sup>r</sup> **D. Toufahi** de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire ainsi que tout le personnel du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida pour les analyses biologiques.*

*Nos emerciements à tous ceux Qui ont participé de prêt ou de Loin à La réalisation de ce modeste mémoire.*



## *Dédicaces*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, A ceux qui me sont les plus chers, a ceux qui m'ont toujours encouragé Aussi, c'est tout simplement que... Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail à tous ceux qui sont chers,*

*A ma chère maman, A mon cher papa*

*Qui sont les meilleurs parents dans ce monde. Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours avec moi. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formules, le fruit de vos innombrables sacrifices puisse dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout a u long de ce projet : mon mari  
Mouhamed.*

*Ames très chers sœurs pour leur affection et leur soutien Elles me sont très chère*

*Ames très chers frères pour leur aide, leur générosité et leur disponibilité.*

*A beaux-parents que j'aime*

*A mes très chères amies Je dédie ce travail à toute notre préparation,. A notre belle amitié.  
Je dédie ce modeste travaille à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.*

*sabiha*





## DÉDICACES

*Je dédie ce modeste travail :*

*A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère  
qui veille à ma réussite et mon bonheur pour son sacrifice et soutien  
qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

*A mon cher père qui a toujours cru en moi et a mis à ma disposition tous les  
moyens nécessaires pour que je réussisse dans mes études.*

*A mon cher mari **said**, merci d'avoir donné un sens à ma vie  
Merci pour ton amour, ton soutien et tes encouragements qui ont toujours été  
pour moi d'un grand réconfort.  
Merci pour ta gentillesse et ton sens du sacrifice*

*A mon cher frère **Ahmed** et mes sœurs **Nesserine** et **Hanane**, pour leurs  
soutiens et leurs encouragements qu'ils m'ont apporté avec toute mon affection et  
ma reconnaissance. C'est grâce à votre encouragement et votre soutien que je  
suis arrivée jusqu'ici.*

*A toute ma famille, Je vous remercie de votre patience vous m'avez aidé  
toujours à avancer, pour le soutien moral au moment difficile, merci d'être  
toujours près de moi, famille avec laquelle je souris.*

*A mes beaux parents vous êtes de seconds parents pour moi, merci pour toute  
votre aide durant ce parcours. Puisse dieu le tout puissant vous garder pour vos  
famille.*

*A mes très chères amies, je dédie ce travail à toute notre préparation, les jours  
et les nuits blanches, nos larmes et nos fous rires, nos déceptions et nos éclats  
de joie. A notre belle amitié.*

*En fin à tous les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à  
un moment ou à un autre et qui ont participé à faire de moi celle que je suis  
aujourd'hui.*

**KHADIDJA**

## Sommaire

Liste des tableaux.	
Liste des figures.	
Introduction.....	01

### ***PARTIE BIBLIOGRAPHIE***

#### **Chapitre I : *Présentation de la plante Ruta Montana***

I.1 La famille des Rutacées .....	03
I.2 Distributions géographique .....	03
I.3 Genre Ruta.....	04
I.3.1 Travaux chimiques antérieurs sur le genre Ruta L.....	04
I.4 Espèce <i>Ruta montana</i> .....	05
I.4.1 Description botanique .....	05
I.4.2 Classification systématique .....	06
I.4.3 Propriétés thérapeutiques .....	06
I.4.4 Généralités et composition de l'HE de Rue de Montagne.....	07
I.4.5 Utilisation et toxicité de l'HE de la rue des montagnes.....	07

#### **Chapitre II : Etude chimique**

II.1 Définition .....	09
II.2 Structures générales .....	09
II.2.1 Série linéaire .....	09
II.2.2 Série angulaire .....	10
II.3 Distribution des furocoumarines dans le règne végétal .....	11

II.4 Localisation des furocoumarines au sein de la plante .....	12
II.5 Propriétés physico-chimiques .....	12
II.6 Méthodes d'extractions .....	13
II.6.1 Extraction au soxhlet.....	13
II.6.2 Extraction par macération .....	13
II.7 Applications thérapeutiques .....	14
II.7.1 Photochimiothérapie.....	14
II.7.2 Photophérese.....	15
II.8 Activités bactériostatiques, fongicides et antimycobactérienne.....	15
II.9 Modification chimique des furocoumarines.....	16
II.9.1 Définition .....	16
II.9.2 Synthèse des hydrazones.....	16
II.9.3 Stabilité des hydrazones.....	17

## ***PARTIE EXPERIMENTAL***

### **Chapitre III: Matériels et méthodes**

III.1 Matériels végétales .....	19
III.1.1 Rue de montagne .....	19
III.1.2 Matériels biologiques.....	19
III.1.2.1 Souches bactériennes et fongiques .....	19
III.1.2.2 Milieux de culture.....	20
III.1.3 Produits chimiques utilisés .....	20
III.1.4 Appareil de mesures .....	21
III.1.4.1 Point de fusion .....	21
III.1.4.2 Spectrophotométrie infrarouge .....	21



III.1.4.3 Spectrophotomètre UV-visible .....	22
III.1.4.4 Chromatographie liquide sur couche mince (CCM) .....	22
III.2 Méthode d'extraction .....	23
III.2.1 Extraction des furocoumarines .....	23
III.2.1.1 Procédé d'extraction .....	23
III.2.1.2 Rendement d'extraction .....	24
III.2.2 Méthode de purification .....	24
III.2.3 Modification chimique avec l'hydrazine.....	25
III.2.3.1 Mode opératoire .....	25
III.2.4 Etude de l'activité antimicrobienne de l'espèce <i>Ruta Montana</i> .....	25
III.2.4.1 Introduction.....	25
III.2.4.2 Antibiogramme .....	25
III.2.4.3 Principe.....	26
III.2.4.4 Microorganismes utilisés.....	26
III.2.4.5 Antibiotique et antifongique utilisés.....	27
III.2.4.6 Protocole expérimental.....	27

## **Chapitre IV : Résultats et discussion**

IV.1 Extraction et caractérisation des furocoumarines.....	30
IV.1.1 Extrait apolaire .....	30
IV.1.1.1 Spectre FTIR d'extrait apolaire en transmittance .....	30
IV.1.1.2 Spectre UV-visible .....	31
IV.1.2 Modification de l'extrait apolaire.....	32
IV.1.2.1 Spectre FTIR .....	33
IV.1.2.2 Spectre UV .....	34
IV.2.1 Extrait polaire (hamamelouane) .....	35

IV.2.1.1 Spectre FTIR .....	35
IV.2.1.2 SpectreUV .....	36
IV.2.2 Modificationde l'extrait polaire.....	37
IV.2.2.1 Spectre FTIR .....	37
IV.2.2.2 Spectre UV .....	38
IV.3.1 Extrait polaire (de Sétif).....	39
IV.3.1.1 Spectre FTIR.....	39
IV.3.1.2 Spectre UV.....	40
IV.3.2 Modification de l'extrait polaire .....	41
IV.3.2.1 Spectre FTIR.....	41
IV.3.2.2 Spectre UV.....	42
IV.2 Résultats de l'évaluation et discussion de l'activité antimicrobienne	43
Conclusion générale .....	47
Références bibliographiques.	
Liste des abréviations	
Annexes	

## Liste de tableaux

<b>Tableau I.1</b> : Classification de la Rue .....	06
<b>Tableau I.2</b> : Quelques usages traditionnels de <i>Ruta montana</i> .....	08
<b>Tableau III.1</b> : Produits chimiques .....	20
<b>Tableau III.2</b> : Microorganismes utilisés .....	26
<b>Tableau IV.1</b> : Propriétés de l'extrait apolaire .....	30
<b>Tableau IV.2</b> : les bandes d'absorbance de l'extrait apolaire .....	32
<b>Tableau IV.3</b> : Propriété d'extrait apolaire modifiée .....	32
<b>Tableau IV.4</b> : Spectre UV-visible de l'extrait apolaire modifié .....	35
<b>Tableau IV.5</b> : Propriété de l'extrait polaire.....	35
<b>Tableau IV.6</b> : Les bandes d'absorbance de l'extrait polaire .....	36
<b>Tableau IV.7</b> : Propriété de l'extrait polaire modifié .....	37
<b>Tableau IV.8</b> : Bandes d'absorbance de l'extrait polaire modifié .....	38
<b>Tableau IV.9</b> : Propriété de l'extrait polaire de Sétif .....	39
<b>Tableau IV.10</b> : Bandes d'absorbance de l'extrait polaire de Sétif .....	41
<b>Tableau IV.11</b> : Propriété de l'extrait polaire modifié de Sétif .....	41
<b>Tableau IV.12</b> : Bandes d'absorbance de l'extrait polaire modifié de Sétif .....	43

**Tableau IV.13 :** Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches bactériennes (en mm) méthode de disques des extraits par la à différentes concentrations ..... 44

**Tableau IV.14:** Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches champignons (en mm) ..... 45

## Liste des figures

<b>Figure I.1:</b> Répartition géographique de la famille de Rutacées .....	03
<b>Figure I.2 :</b> Photo représente la <i>Ruta montana</i> .....	05
<b>Figure II.1 :</b> Structure chimique des furocoumarines linéaires .....	10
<b>Figure II.2 :</b> Structure chimique des furocoumarines angulaires .....	11
<b>Figure II.3 :</b> Présentation de montage soxhlet .....	13
<b>Figure II.4 :</b> La maladie de psoriasis .....	14
<b>Figure II.5 :</b> Amélioration de l'aspect visuel de la peau après un traitement UV-Visible chez des patients atteints de vitiligo .....	15
<b>Figure II.6 :</b> Synthèse conventionnelle d'hydrazones .....	16
<b>Figure II.7 :</b> Réaction de Japp-Klingemann .....	17
<b>Figure II.8 :</b> Principales formes de résonance .....	17
<b>Figure III.1 :</b> Présentation de la partie aérienne .....	19
<b>Figure III.2 :</b> Présentation de l'appareil de point de fusion .....	21
<b>Figure III.3 :</b> Spectrophotomètre transformée de fourrier (IR.) .....	22
<b>Figure III.4 :</b> Présentation de l'appareil de Spectrophotomètre UV-visible .....	22
<b>Figure III.5 :</b> Présentation de la plaque CCM .....	23
<b>Figure III.6 :</b> Présentation de la procède de soxhlet .....	24
<b>Figure III.7 :</b> Représentation de la méthode de diffusion de disque .....	26
<b>Figure III.8 :</b> Les milieux de culture dans les boites pétris .....	27

<b>Figure III.9 :</b> Les extraits dans le DMSO .....	28
<b>Figure III.10 :</b> La zone d'inhibition de deux souches antimicrobiennes .....	29
<b>Figure IV.1 :</b> Spectre représenter FTIR d'extrait apolaire .....	30
<b>Figure IV.2 :</b> Spectre UV-visible de l'extrait apolaire .....	31
<b>Figure IV.3 :</b> Spectre représente FTIR de l'extrait apolaire modifié .....	33
<b>Figure IV.4 :</b> Spectre UV-visible de l'extrait apolaire modifié .....	34
<b>Figure IV.5 :</b> Propriété de l'extrait polaire.....	35
<b>Figure IV.6 :</b> Spectre UV-visible de l'extrait polaire .....	36
<b>Figure IV.7 :</b> Spectre représente FTIR de l'extrait polaire modifié .....	37
<b>Figure IV.8 :</b> Spectre UV-visible de l'extrait polaire modifié .....	38
<b>Figure IV.9 :</b> Spectre représente FTIR de l'extrait polaire de Sétif .....	39
<b>Figure IV.10 :</b> Spectre UV-visible de l'extrait polaire de Sétif .....	40
<b>Figure IV.11 :</b> Spectre représente FTIR de l'extrait de polaire modifié de Sétif .....	41
<b>Figure IV.12 :</b> Spectre UV-visible de l'extrait polaire modifier de Sétif .....	42
<b>Figure IV.13 :</b> Les diamètres des zones d'inhibition d'extrait methanolique et des extraits modifie relatives aux différentes souches bactérienne .....	44
<b>Figure IV.14 :</b> Les diamètres des zones d'inhibition d'extrait méthanolique et des extraits modifie relatives aux différentes souches bactérienne .....	45

## Résumé

Les molécules d'origine naturelles sont très appréciées pour leur activités thérapeutiques dépourvus d'effets secondaires.

Les plantes sont une sources inestimables de molécules biologiquement actives.

Dans cette optique que le travail entrepris se focalise sur l'extraction des furocoumarines

Caractéristiques du genre ruta .

L'extraction par soxhlet avec des solvants différentes polarités à permet d'obtenir des extraits polaires et apolaires avec des rendements appréciables ().

Les extraits obtenus après modifications avec l'hydrazines monohydrate et identifiés par leurs points de fusion , mesure des rapports frontaux , caractéristique UV-Visible , spectrométrie IFTR , ont montre des activités antibactériennes et antifongiques plus importantes que les extraits de départs .

## Summary

Naturally generated molecules are very appreciated for their therapeutic activities lacking side effects.

Plants are an invaluable source of biologically active molecules. In this effect, the work focuses on the extraction of the furocoumarin characteristics of the *Ruta* type.

Soxhlet extraction by means of solvents with different polarities allows the obtaining of polar and nonpolar extracts with significant yields (0, 1. 0,17. 0, 29).

Extracts obtained after changes with hydrazine monohydrate and identified by melting points, measure the front-end reports, UV-Vis and IFTR spectrometry, showed antibacterial activity (*Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) and antifungal activity (*Aspergillus Brasiliensis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus negeria* and *Candida albicans*) activities that are more important than the initial extracts.

**Key words:** furocoumarin, *Ruta*, extraction, antibacterial activity, antifungal activity



## ملخص

تعتبر النباتات الطبيعية ذات أهمية كبيرة وخواص علاجية خالية من الآثار الجانبية بحيث تعتبر مصدر هام للجزيئات النشطة من الناحية البيولوجية.

وفي هذا الصدد يتركز هذا العمل على استخراج مستخلصات السذاب الجبلي (*Ruta montana*) و بالأخص الفيروكومارين عن طريق سوكليت بمحاليل مختلفة القطبية التي تسمح لنا بالحصول على مستخلصات قطبية وغير قطبية بمرود (0.1 0.17 0.29) .

المركبات التي تم الحصول عليها بعد التعديلات و التحسينات للمستخلصات بالهيدرازين المونوهيدرات والتي تم تحديدها من خلال نقاط انصهارها ، خاصية الأشعة فوق البنفسجية المرئية ، مطياف FTIR ، أظهرت أنشطة مضادة للجراثيم (*Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*) وفطريات (*Aspergillus Brasiliensis Aspergillus flavus, Aspergillus negeria*) *Candida albicans* أكثر أهمية من المستخلصات الأولية.

الكلمات المفتاحية : السذاب الجبلي, أنشطة مضادة للجراثيم, أنشطة مضادة فطريات, استخلاص, التعديل الكيميائي .

# *Introduction générale*

## Introduction générale

Autrefois, les plantes médicinales étaient l'une des seules sources de remède. Leurs histoires sont associées sur tous les continents, à l'évolution des civilisations. L'usage des remèdes naturels constitue une thérapeutique basée sur un savoir médical accumulé au cours de plusieurs millénaires d'expérimentations [1], même l'homme apprécie les vertus apaisantes et analgésiques des plantes.

Aujourd'hui encore, les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leurs propriétés curatives.

L'Algérie recèle d'un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes : on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines : industrie alimentaire, conserverie, pharmaceutique, et phytothérapie [2].

Les plantes contenant des furocoumarines ont été découvertes et utilisées dans le cadre de la médecine populaire dans l'ancien temps pour soigner des maladies de la peau telles que le Vitiligo.

Etant produites naturellement par les plantes, les furocoumarines ont fait l'objet de nombreuses études notamment à cause de leur propriétés de photosensibilisation. Au cours de ces 50 dernières années, ces molécules ont été décrites essentiellement dans 4 familles de plantes : les Rutaceae, Moraceae, Apiaceae et Leguminosae. Bien que d'autres plantes plus anecdotiques aient également été décrites comme productrices et possèdent une activité biologique [3].

Au cours de ces dernières années, la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine naturelle a connu un regain d'intérêt dans la plupart des recherches scientifiques.

Le présent travail rentre dans le cadre de la recherche de nouvelles substances naturelles extraites du règne végétal, vise à évaluer les activités biologiques, anti-oxydantes et antimicrobiennes.

C'est dans ce cadre, que nous nous sommes intéressés à l'extraction et la modification des furocoumarines à partir d'une plante très utilisée par la pharmacopée

traditionnelle algérienne appelée la *Ruta Montana* et déterminer leurs activités biologiques.

Pour cela notre travail porte quatre chapitres :

**Chapitre 1** : est une synthèse bibliographique sur la famille des rutacées, la description botanique et la systématique.

**Chapitre 2** : l'étude de la composition chimique de l'espèce *Ruta montana* Plus particulièrement les métabolites secondaire (les furocoumarines), ainsi que la modification chimique.

**Chapitre 3** : nous nous somme intéressés à :

- ❖ L'extraction des furocoumarines et la modification chimique.
- ❖ L'identification des produits séparés par des méthodes chromatographiques et spectroscopiques.
- ❖ L'étude l'activité antimicrobienne des extraits bruts et des extraits modifiés.

**Chapitre 4** : résultat et discussion.

On finalise ce travaille par une conclusion générale.

*Partie*

*Bibliographique*

*Chapitre I*

*Présentation de la*

*plante Ruta Montana*

# Chapitre I : présentation de la plante *Ruta Montana*

## I.1 La famille des Rutacées

Les Rutacées comprennent plus de 700 espèces en grand partie arborescentes appartenant aux pays chaud.

C'est une famille par enchainement et n'offrant qu'un petit nombre de caractères constants. Une Rutacées s'identifie cependant avec netteté par son appareil sécréteur constitué de poche sécrétrices d'un type particulier et qui ne sont rencontrées dans aucunes autre famille dites schizolysigènes. Ces poches, toujours très superficielles, sont d'origine épidermique, c'est ce qui explique qu'il suffit d'écraser légèrement une partie molle d'une Rutacées pour qu'une forte odeur d'essence s'en dégage. Très abondantes sur les feuilles, elles apparaissent sous forme de points transparents. Les fleurs possèdent un disque nectarifère intra staminal, c'est-à-dire situé à l'intérieur des étamines sur le réceptacle [4].

## I.2 Distributions géographique

La famille des Rutacées a une origine les régions tropicales et tempérées notamment Afrique du sud et Australie [5]. En plus ont montré que les Rutacées sont presque cosmopolites mais surtout tropicales et subtropicales [6].

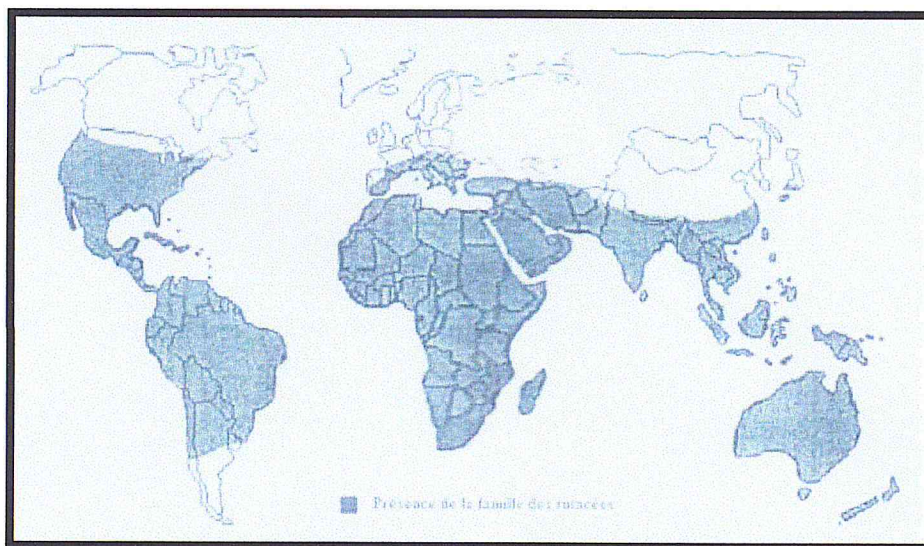


Figure I.1: Répartition géographique de la famille de Rutacées [5].

### **I.3 Genre Ruta**

*Ruta* vient du grec «rhyté» qui signifie sauvé, prévenir, ou de «reô» qui signifie qui coule faisant certainement référence à ses vertus emménagogues [7].

Ce genre comprend 8 espèces d'arbustes, de sous-arbrisseaux et de vivaces herbacées à souche ligneuse, caducs ou persistants, vivants dans les lieux secs et rocailloux, de la région méditerranéenne, et du nord-est de l'Afrique jusqu'au sud-ouest de l'Asie. Les fleurs et le feuillage aromatiques, sont le principal attrait des rues. Les feuilles sont alternes, parfois opposées, ovales, larges, arrondies et pennatiséquées ou pennées. Les fleurs, jaunes, fimbriées ou dentées, à quatre ou cinq pétales, s'épanouissent en cymes terminales [8]. Le feuillage a parfois un usage médicinal. Ne consommer aucune partie de la rue, la plante entière étant toxique. Eviter de toucher le feuillage, sous peine de provoquer une réaction cutanée, se traduisant par des taches brunes (indolores) qui foncent au soleil [9].

- Rusticité: variable selon les espèces [8].
- Culture: en plein soleil ou à l'ombre partielle, de même au sec, dans un sol assez riche, de préférence très bien drainé, mais la rue accepte bien les terres argileuses, fortes. La multiplication se fait par semi ou bouturage [7].
- Ennemis et maladies: pourriture des racines (*Phytophthora*) [8].

#### **I.3.1 Travaux chimiques antérieurs sur le genre *Ruta L.***

De nombreux travaux ont été réalisés sur le genre *Ruta L.*, aboutissant à l'identification de la structure d'un nombre considérable de métabolites secondaires, appartenant à des séries chimiques extrêmement variées. En effet, pratiquement tous les types de composés caractéristiques de la famille des Rutaceae ont pu être mis en évidence dans le genre *Ruta L.* à l'exception notable des substances amères de type tétranotriterpénoïde. La diversité des voies du métabolisme secondaire des Rutaceae se reflète donc dans la chimie des espèces du genre *Ruta L.* à partir desquelles ont été isolés notamment des alcaloïdes, des amides, des coumarines, des lignanes, des flavonoïdes et des triterpénoïdes.



## I.4 Espèce *Ruta Montana*

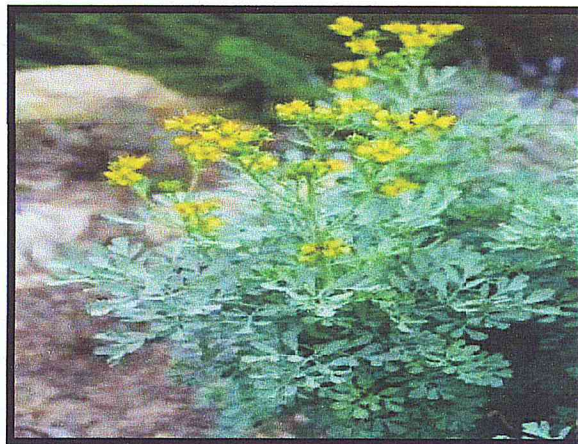
### I.4.1 Description botanique

La plante *Ruta Montana* c'est un sous-arbrisseau vivace de 30 à 60 cm de hauteur à tige rameuse dans sa partie supérieure, semi-ligneux. Les feuilles, glauques finement découpées en segments linéaires, lancéolées ou souvent très allongées, enroulées en dessous par leur bord, leurs faces supérieures sont couvertes de pustules sécrétant une essence extrêmement malodorante. Les fleurs, petites de 4 à 5 mm, de couleur jaune, sont groupées par 5 à 6 en cyme composée ordinairement de 4 divisions, pétales concaves, denticulés sur les marges, calice persistant. Elles comportent 4 à 5 carpelles libres, multi ovulés, à style soudé. A maturité, le fruit est une capsule globuleuse, s'ouvrant en deux valves et laissant apparaître une graine globuleuse, noire et brillante.

**Nom français :** Rue de montagne.

**Nom latin :** *Ruta Montana*

**Nom populaire :** Fidjel el djebel( فيجل الجبل ) [10]



**Figure I.2 :** *Ruta Montana*.

#### I.4.2 Classification systématique

La classification qu'occupe l'espèce *Ruta Montana* dans la systématique est la suivante:

**Tableau I.1:** Classification de la Rue

Classement	Nom
Règne	Végétal
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Série	Disciflores
Sous série	Diplostémones
Ordre	Sapindales (Rutales)
Famille	<i>Rutacées</i>
Sous famille	<i>Rutoïdées</i>
Genre	<i>Ruta</i>
Espèce	<i>RutaMontana L</i>

#### I.4.3 Propriétés thérapeutiques

La rue été introduite en médecine chinoise, il y a près de deux siècles, elle est très connue par la population.

Utilisée pour des usages thérapeutiques et culinaires (épice), la rue présente un usage traditionnel très vaste.

Elle est considérée comme une des plantes qui présentent le plus de vertus médicamenteuses.

Stimulante, antiseptique, emménagogue, abortive, antiparasitaire et antirhumatismale elle est également utilisée chez les malades sujets aux attaques de l'épilepsie et l'hystérie.

Dans l'antiquité en Grèce et en Egypte, la rue été employée pour provoquer des avortements et pour améliorer l'activité visuelle.

Sa tisane est consommée pour soulager les coliques, le mal au ventre, la fièvre, les problèmes cardiaques dus à une colère ou une frayeur, les maux d'oreilles (faire une boulette avec la plante verte et la placée dans le conduit auditif).

Dans le Guatemala sa principale indication est le mal d'oyo, c'est une maladie qui touche les personnes fragiles tels que les enfants, la plante entre dans la composition de l'eau de bain qui sert à baigner l'enfant afin de lutter contre cette maladie.

D'autre part, il est reconnu depuis longtemps que le jus des feuilles de la rue sert comme antidote contre les morsures de serpent et les piqûres d'insectes.

L'une des propriétés reconnues par l'USDA (United States Département of Agriculture) est de sa capacité pour abaisser la pression artérielle comme hypotenseur, ce qui en fait une plante utile pour le traitement des vaisseaux sanguins [11].

#### **I.4.4 Généralités et composition de l'HE de Rue de Montagne**

Les huiles essentielles sont le produit de la distillation d'une plante ou d'une partie de plante. Ce sont des substances de consistance huileuse mais sans corps gras, plus ou moins fluides, voire résinoïdes, très odorantes, volatiles, souvent colorées[12].

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes des composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses [13].

L'huiles essentielle de la rue, très concentrée et forte est utilisée en parfumerie. La posologie conseillée, sur avis d'un praticien, ne doit pas dépasser 2g d'huile essentielle ou 5g de feuilles séchées en infusion. Elle ne peut être délivrée en herboristerie que sur prescription médicale. Mise en garde la rue est une plante très puissante, elle ne doit jamais consommée par les femmes enceintes, car elle est toxique. L'essence de rue contient principalement des composés cétoniques.

#### **I.4.5 Utilisation et toxicité de l'HE de la rue des montagnes**

L'essence de rue possède des propriétés abortives. Selon certains auteurs, les propriétés pharmacologiques de l'essence de rue sont liées à la présence des furocoumarines : éther méthylique de l'ombelliférone, xanthotoxine.

La rue est antispasmodique, elle calme les douleurs, les spasmes ainsi que les troubles d'origine nerveuse. Traditionnellement, la rue était utilisée dans les cas d'épilepsie et de convulsions. Elle est sédative et intervient en cas de nervosisme et d'hystérie. Les feuilles fraîches écrasées en application externe soulagent la sciatique.

Le feuillage a parfois un usage médicinal. Ne consommer aucune partie de la rue, la plante entière étant toxique. Eviter de toucher le feuillage, sous peine de provoquer une réaction cutanée, se traduisant par des taches brunes (indolores) qui foncent au soleil [9].

Les feuilles, utilisées à petites doses, sont vermifuges. Aussi, elles ont des vertus toniques et stimulantes, elles sont souvent utilisées comme sternutatoires (provoquent des éternuements).

L'essence de rue est utilisée en parfumerie, en pharmacie, dans la préparation des aromes. On sépare le méthyle n-nonylcétone par distillation fractionnée. Cette cétone sert à la préparation du méthyle-nonylacétaldéhyde.

Le tableau I.2 récapitule les utilisations de *Ruta Montana* en médecine traditionnelle :

**Tableau I.2 : Quelques usages traditionnels de *Ruta Montana* [14] [15]**

Espèce	Pays	Partie utilisée	Voie	Usage
<i>Ruta Montana L.</i>	Espagne	Plante entière	Orale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fièvre</li> <li>- emménagogue</li> <li>- abortive</li> <li>- antispasmodique</li> <li>- contre les vers intestinaux</li> </ul>
	Algérie	Partie aérienne		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Emménagogue</li> <li>- Antispasmodique</li> <li>- Rubéfiant, poudre</li> <li>- Echarrotique</li> </ul>

*Chapitre II*

*ETUDE CHIMIQUE*

## Chapitre II : Etude chimique

### II.1 Définition

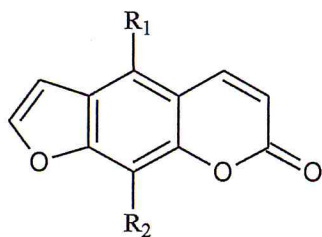
Les furocoumarines, appelées encore furanocoumarines, désignent un ensemble de substances toxiques sensibles à la lumière. Elles sont obtenues à partir de la fusion du noyau d'un composé chimique (furane) et d'une substance organique aromatique (coumarine). Elles incluent notamment le psoralène, un composé utilisé pour traiter certaines affections de la peau telles que l'eczéma, le vitiligo ou le psoriasis. Les pamplemousses, les mandarines et les citrons contiennent des furocoumarines dans leur zeste. C'est pourquoi les agrumes sont contre-indiqués en association avec certains médicaments [16].

### II.2 Structures générales

Les furocoumarines sont des métabolites secondaires appartenant à la grande famille des phénylpropanoïdes. Ce sont des molécules tricycliques, ces molécules sont caractérisées par un squelette de base formé d'un noyau coumarine sur lequel est condensé un noyau furane. Selon la position du noyau furane, on distingue les furanocoumarines linéaires dérivant de la molécule de psoralène et les furanocoumarines angulaires, basées sur la structure de l'angélicine [17].

#### II.2.1 Série linéaire

La série linéaire constitue le groupe très important des psoralènes, molécules hautement photosensibilisantes. Le noyau furane est en position 6-7. Les deux substituants R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> sont en position 5 et 8 ou encore en 2' et 3'. Le psoralène a été isolé pour la première fois de *Psoralea corylifolia* [18].



Nom	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Psoralène	H	H
Bergaptène (5-MOP)	OCH <sub>3</sub>	H
Xanthotoxine (8-MOP)	H	OCH <sub>3</sub>
Bergaptol	OH	H
Xanthotoxol	H	OH
Isopimpinelline	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

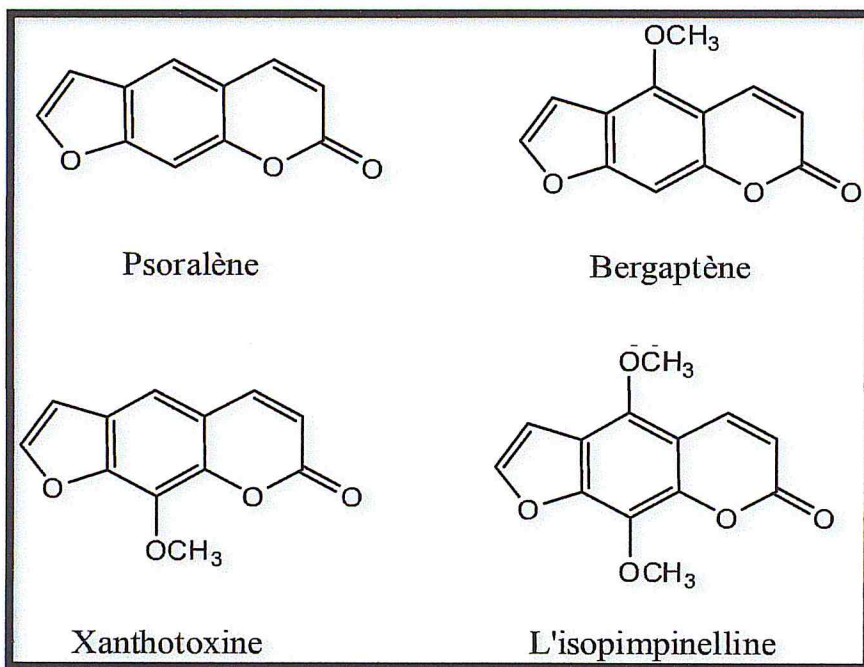
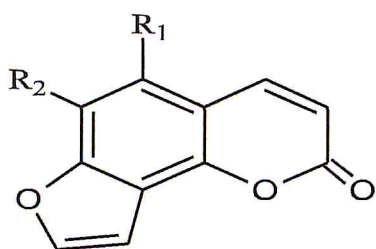


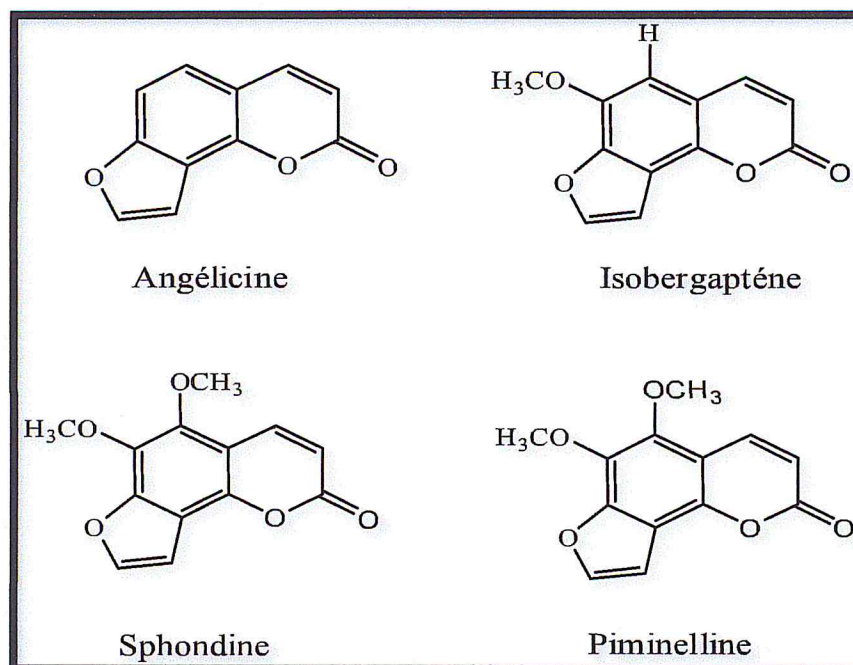
Figure II.1 : Structure chimique des furocoumarines linéaires.

### II.2.2 Série angulaire

Les molécules appartenant à ce groupe sont en général très peu photosensibilisantes. Le noyau furane est en position 7-8 et les deux substituants sont en position 5 et 6 ou encore en 2' et 3' [18].



NOM	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Angélicine	H	H
Isobergaptène	H	OCH <sub>3</sub>
Sphondine	OCH <sub>3</sub>	OH
Pimpinelline	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>



**Figure II.2 :** Structure chimique des furocoumarines angulaires.

### II.3 Distribution des furocoumarines dans le règne végétal

Les furocoumarines sont présentes dans quatre grandes familles taxonomiques : les légumineuses (*Ex : Psoraleasp. et Coronillasp.*), les moracées (*Ex : Ficus carica*), les apiacées (*Ex : Ammi majus, Pastinacasativa, Apiumgraveolens, Petroselinumcrispum...*) et les rutacées (*Ex : Rutagraveolens, Citrus lemon, Citrus paradisi, Citrus bergamia*) [19].

La répartition tissulaire en furocoumarines et le type de furocoumarine (linéaire ou angulaire) varient d'une famille à l'autre. Toutes ces familles contiennent des furocoumarines linéaires, alors que l'ensemble des légumineuses et quelques apiacées contiennent également des formes angulaires. Ainsi, l'apparition des formes angulaires serait postérieure aux linéaires dans le mécanisme évolutif. Les rutacées et surtout les apiacées synthétisent un large éventail de furocoumarines. Le bergaptène, la xanthotoxine et l'isopimpinelline constituent néanmoins les formes principales de furocoumarines rencontrées dans ces deux familles. Alors que les moracées et les légumineuses ne synthétisent principalement que deux types de molécules (psoralène et bergaptène pour les moracées, psoralène et angélicine pour les légumineuses) [20].



## II.4 Localisation des furocoumarines au sein de la plante

Les furocoumarines sont présentes dans toute la plante, mais certains compartiments en contiennent plus que d'autres. Les organes ou tissus comportant le plus de composés sont : *les fruits (ex : myrtille ; agrumes), les graines (ex : fève tonka, graines de psoralée), les racines (ex : racines d'angélique) et les feuilles (ex : feuilles de pois ; feuilles d'angélique)*. Les huiles essentielles obtenues à partir de tissus de plantes peuvent contenir de grandes quantités des furocoumarines (*ex : cannelle ; agrumes*). Chez les agrumes, ces huiles essentielles sont obtenues par pressage à froid de la peau des fruits, qui contient des glandes schizolysigènes sécrétant ces molécules. La plupart de ces tissus ou organes fortement producteurs de furocoumarines sont exposés aux prédateurs (*ex : feuilles, racines*) ou voués à la survie de l'espèce (*ex : fruits contenant les graines*). Mais la localisation des furocoumarines au sein des plantes est aussi soumise aux conditions environnementales et peut donc varier au cours du temps [21].

La localisation des furocoumarines varie en fonction de l'âge des plantes. La montre l'évolution de la présence de psoralène au sein de *Psoraleacineria*. L'étude a été réalisée au travers de récoltes faites à 5 stades différents. Quand la plante est jeune (4 feuilles) le psoralène est principalement localisé au niveau des feuilles et des racines. Chez les plantes plus âgées, on observe une concentration plus élevée de psoralène dans les fruits au détriment des feuilles et des racines.

## II.5 Propriétés physico-chimiques

De par leur structure chimique, les furocoumarines présentent une bonne solubilité dans les solvants aprotiques polaires comme l'acétonitrile et le chloroforme, mais également dans certains solvants protiques polaires tels que le méthanol et l'éthanol, mais sont peu solubles dans l'eau. Ce sont des molécules relativement stables qui résistent bien aux températures élevées. Toutefois, cette stabilité diminue lorsqu'on les soumet à un rayonnement UV. Les substituants présents sur le noyau coumarine, qui varient selon les furocoumarines, leur confèrent différentes propriétés physico-chimiques. L'ensemble de ces propriétés fait des furocoumarines des molécules qu'il est possible de séparer et de caractériser par les techniques de chromatographie sur couche mince (CCM), de chromatographie gazeuse (GC), et de chromatographie liquide haute performance (HPLC). De plus, les spectres d'absorption peuvent être caractérisés avec

un détecteur à barrette de diodes car le noyau lactone des furocoumarines absorbe les rayonnements UVA (320-340 nm) [22].

## II.6 Méthodes d'extractions

### II.6.1 Extraction au soxhlet

L'extraction solide - liquide est un procédé semi-continu, couplant une distillation avec une cartouche de type « SOXHLET » contenant le produit solide imprégné d'un principe actif (soluté) à extraire par dissolution dans un solvant chaud.

La colonne de distillation génère des vapeurs de solvant qui sont condensées; ce solvant pur et chaud alimente la cartouche contenant le solide inerte et le soluté.

Lorsque la cartouche est pleine, la solution obtenue (solvant et soluté) se vide automatiquement par siphonage (lixiviation) puis retourne dans le bouilleur où le solvant est de nouveau porté

à l'ébullition. La lixiviation peut également être opérée par passage continu du solvant ou par vidanges manuelles successives.

Le solvant peut être également alimenté en une seule « passe » pour l'infusion puis l'extrait obtenu est soutiré manuellement.

Le solvant contenant l'huile végétale retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. La matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'éther de pétrole est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif.

### II.6.2 Extraction par macération

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante [23].

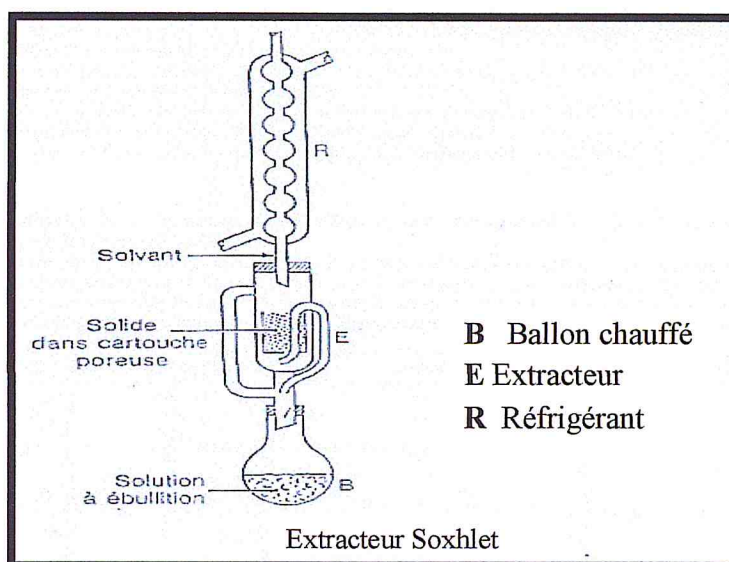


Figure II.3 : Présentation de montage soxhlet.

## II.7 Applications thérapeutiques

### II.7.1 Photochimiothérapie

Les furocoumarines ont à une capacité de se fixer sur l'ADN en présence d'un rayonnement UV [24], modifiant alors sa structure, ce qui empêche sa réplication et donc la prolifération des cellules [25]. Ce phénomène a été détourné dans le but de traiter des maladies de peau comme le psoriasis et le vitiligo [26][27], qui se caractérisent par des lésions rouges et une dépigmentation de la peau respectivement. Le traitement combine ainsi l'application de furocoumarines et d'un rayonnement UVA sur la peau et porte le nom de P-UVA thérapie, le P venant à l'origine du psoralène.

Concernant le psoriasis, une étude récente a montré que la combinaison de xanthotoxine et d'UVA provenant du soleil permettait d'améliorer l'apparence physique des patients atteints de cette maladie, tout comme leur qualité de vie [28].

Pour le vitiligo, une autre étude visait à comparer l'usage de la P-UVA thérapie avec la photothérapie UVB à bande étroite, n'utilisant pas de furocoumarines[29]. Il s'avère que les deux thérapies présentent des résultats similaires en termes de repigmentation de la peau (**figure II.5**). Cependant, les effets secondaires sont beaucoup plus fréquents chez les patients ayant suivi une P-UVA thérapie, qui se plaignaient de démangeaisons, d'hyperpigmentation de la peau, de vertiges, d'érythèmes ou épaissements cutanés ou encore de nausées. Par ailleurs, à long terme, la P-UVA thérapie peut aussi engendrer des problèmes oculaires ou même des cancers de la peau [30].



Figure II.4: La maladie de psoriasis



**Figure II.5:** Amélioration de l'aspect visuel de la peau après un traitement UV chez des patients atteints de vitiligo [27].

(A) Après un traitement de 6 mois de P-UVA thérapie ; (B) Après un traitement de 6 mois de photothérapie UVB à bande étroite.

### II.7.2 Photophérèse

La PUVA thérapie est aussi utilisée pour le traitement des affections de lymphomes cutanés. Il s'agit d'un cancer des globules blancs (lymphocytes) se localisant d'abord dans la peau et dont l'issue est souvent fatale. Dans ce cas, une forme extracorporelle de cette thérapie a été mise au point: la photophérèse[31]. Dans cette méthode, le patient reçoit oralement de la xanthotoxine. Les globules blancs sont prélevés puis exposés aux UVA et ensuite réinjectés dans le sang.

Dans le cas de ce traitement, la PUVA thérapie semble engendrer un mécanisme immunologique puisque les lymphocytes T anormaux deviennent des cibles pour le système immunitaire. Les furocoumarines ont des effets directs sur les cellules T malignes, via des interactions avec leur ADN nucléaire et membranaire, avec les protéines et avec les lipides [32]. Les lymphocytes T endommagés par le traitement furocoumarines UVA sont réinjectés chez le patient [31].

## II.8 Activités bactériostatiques, fongicides et antimycobactérienne

Les furocoumarines sont capables d'inhiber l'activité des molécules impliquées dans la communication intra et interspécifique (N-acylhomoserine lactones, diester de boronate) entre bactéries Gram positif et Gram négatif et dans l'expression de gènes

pathogènes. De plus, les furocoumarines inhibent la formation de biofilms synthétisés par les bactéries telles qu'*E. Coli* et *Pseudomonas aeruginosa* impliqué dans la protection des bactéries [33]. Elles sont donc bactériostatiques et 54 peuvent présenter un intérêt dans la course au développement de nouvelles molécules thérapeutiques contre les infections bactériennes. De plus, les furocoumarines telles que l'angélicine et ses dérivés, possèdent aussi des activités antifongiques. Elles révèlent une toxicité sur *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus niger*[34] pouvant montrer un intérêt sur la prise en charge de nombreuses mycoses.

## II.9 Modification chimique des furocoumarines

### II.9.1 Définition

Les hydrazones sont des composés très faciles d'accès et très utiles en synthèse organique.

Elles permettent et peuvent participer à un grand nombre de réactions, notamment des réactions d'addition radicalaire, nucléophile ou électrophile. Elles ont un rôle important en synthèse hétérocyclique comme précurseurs de nombreux hétérocycles azotés (on peut citer la synthèse de Fischer-indole), mais sont également très utiles pour l'interconversion de groupes fonctionnels, en particulier pour la conversion d'aldéhydes en hydrazines, amines, ou nitriles [35][36]. De plus, les hydrazones présentent un intérêt biologique certain puisqu'elles ont montré des activités biologiques en tant qu'antimicrobiens, anti-inflammatoires, anti-cancéreux, etc [37].

### II.9.2 Synthèse des hydrazones

#### ➤ Condensation entre une hydrazine et un composé carbonylé

La méthode de synthèse la plus simple et la plus utilisée pour former une hydrazone consiste à condenser une hydrazine sur un aldéhyde ou une cétone (figure II.6). L'hydrazine peut subir une double condensation du composé carbonylé. De plus, l'utilisation d'hydrazines mono- ou N,N-disubstituées permet d'éviter cette double condensation et de synthétiser facilement les hydrazones correspondantes.

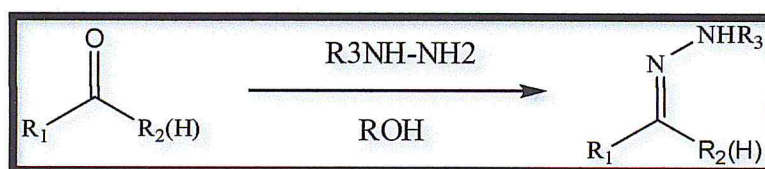


Figure II.6 : Synthèse conventionnelle d'hydrazones.

### ➤ Couplage de Japp-Klingemann

Cette deuxième méthode est particulièrement adaptée à la synthèse des  $\alpha$ -cétohydrazones, pour lesquelles les rendements sont médiocres par la voie classique du fait de la compétition entre les deux groupes carbonyles lors de la condensation de l'hydrazine.

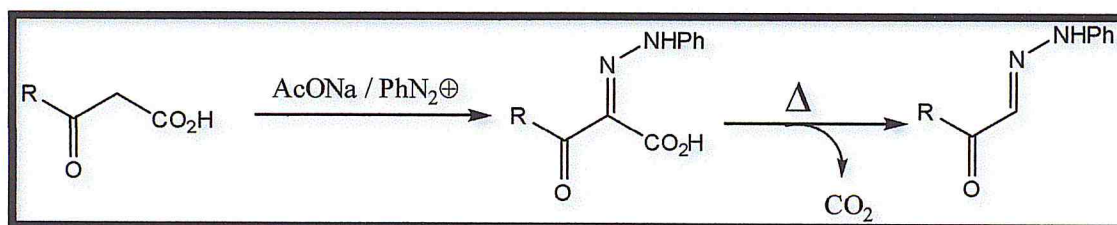


Figure II.7 : Réaction de Japp-Klingemann.

### II.9.3 Stabilité des hydrazones

Les molécules possédant une double liaison carbone-azote sont d'une importance capitale tant dans un contexte purement chimique que biologique. Les fondations de nos connaissances sur la formation et l'hydrolyse des liaisons C=N se trouvent dans les travaux de Bartlett, Westheimer Rutherford entre autres [38]. Les études et les analyses cinétiques approfondies de Jencks[39] ont également impacté la connaissance des mécanismes mis en jeu lors de la formation et de l'hydrolyse de composés possédant des liaisons C=N. Les hydrazones, tout comme les oximes possèdent une plus grande stabilité intrinsèque que les imines qui pourrait être expliquée par une participation de X (=O ou N-R<sub>3</sub>) dans la délocalisation électronique (Figure II.8).

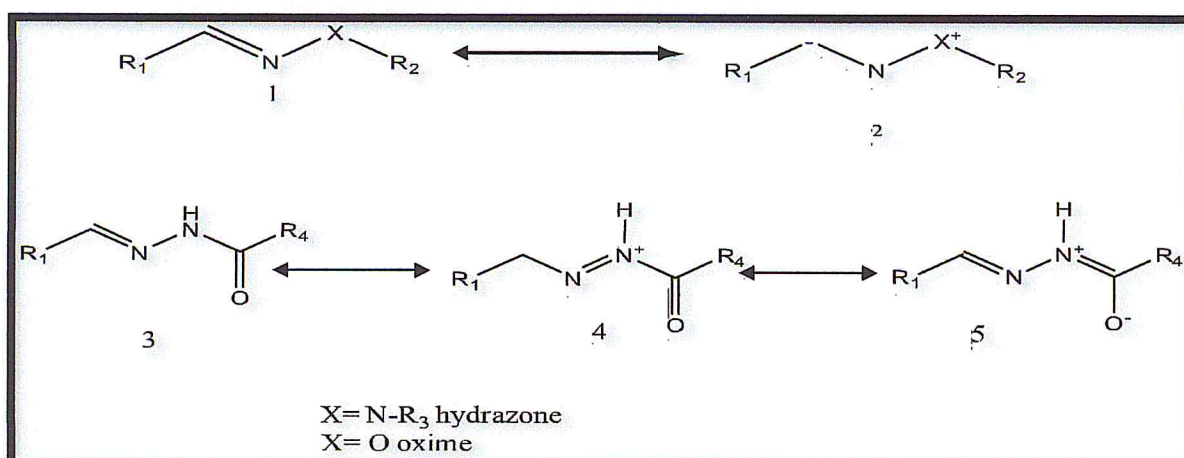


Figure II.8 : Principales formes de résonance.

La contribution de la forme de résonance 2 pour les alkylhydrazones et de la forme 4 pour les acylhydrazones augmente la densité de charge négative sur l'atome de carbone, réduisant ainsi son électrophilie et par conséquent sa sensibilité à l'hydrolyse. Les hydrazones sont ainsi plus stables en général que les imines.

*Partie*

*Expérimentale*



# *Chapitre III*

## *Matériels et méthodes*

## CHAPITRE III : Matériels et méthodes

### III.1 Matériels végétales

#### III.1.1 Rue de montagne

La plante *Ruta Montana* a été récoltée dans les deux régions suivantes :

- Megutaa elazregue, Hammam Melouane(W.Blida), La cueillette des fleurs, tiges et feuilles à été effectuée au mois de mars 2018.
- Sétif à été effectuée au mois de septembre 2017.



Figure III.1 : Présentation de la partie aérienne.

La partie aérienne, fraîchement récoltée, est laissée sécher à l'ombre dans un endroit sec et aéré, puis conservée dans des boîtes jusqu'à l'utilisation au laboratoire pour faire l'extraction.

#### III.1.2 Matériels biologiques

##### III.1.2.1 Souches bactériennes et fongiques

- Les bactéries retenues pour cette étude sont:

*Staphylococcus aureus* (G<sup>+</sup>)

*Pseudomonas aeruginosa* (G<sup>-</sup>)

- Les champignons pour cette activité sont:

*Candida albicans*,

*Aspergillus Braziliensis*,

*Aspergillus Flavus*,

*Aspergillus Nigéria*,

### III.1.2.2 Milieux de culture

#### ➤ Gélose nutritive

Biologie, la gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (*GNO*) ou encore gélose ordinaire est un milieu d'isolement non-sélectif. L'isolement est réalisé dans le but de contrôler la pureté d'une souche bactérienne (pur s'il y a un type de colonie sur la gélose) ou de purifier la souche bactérienne si elle est contaminée.

L'isolement permet de séparer des micro-organismes différents dans un mélange qui pourront être ainsi étudiés individuellement.

Sur cette gélose nutritive on observe le nombre de colonies différentes (nombre de type de colonies) et on fait une description des colonies isolées.

#### ➤ Muller Hinton (MH)

La gélose Muller-Hinton est un milieu riche, standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens (la réalisation de l'antibiogramme).

#### ➤ Sabouraud

Le milieu de Sabouraud (ou gélose de Sabouraud) est un milieu de culture acide favorisant la culture et l'isolement des champignons et des moisissures.

### III.1.3 Produits chimiques utilisés

Tableau III.1 : Produits chimiques.

Réactifs	M (g/mol)	Pureté (%)	Marque
$C_2H_5OH$	46,07	98	Sigma-Aldrich
$CH_3OH$	32,04	99,7	Sigma-Aldrich
$CH_3(CH_2)_n-CH_3$ de 40 à 60 °C	/	95	Sigma-Aldrich
$NH_4OH$	17,03	98	Sigma-Aldrich
$C_2H_6OS$	78,13	99	Panreac
$CH_2Cl_2$	84,933	99,9	Honeywell

Réactifs	M (g/mol)	Pureté (%)	Marque
$\text{H}_2\text{N-NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	50,06	98	Sigma –Aldrich
HCl/ $\text{H}_2\text{O}$	36	36,5-38	Sigma –Aldrich
$\text{CH}_3\text{COOH}$	60,05	98	Sigma –Aldrich
NaOH	39,99	95	Sigma –Aldrich

### III.1.4 Appareil de mesure

#### III.1.4.1 Point de fusion

A l'aide d'une fusion mètre de marque fisher- jones on à mesurerle point de fusion de nos produits extraire .La température de fusion d'un corps représente la température à

une pression donnée, à laquelle un élément pur ou un composé chimique fond c'est-à-dire passe de l'état solide à l'état liquide.

Il est possible de déterminer la nature d'une substance (identification) par la mesure de sa température de fusion. C'est pourquoi la température de fusion est une propriété caractéristique de la matière. Toutefois, cette information n'est pas suffisante pour permettre une identification formelle, plusieurs molécules pouvant avoir une température de fusion très proche. Elle permet par contre d'éliminer du champ du possible des molécules ayant une température de fusion différente de celle mesurée.



Figure III.2 : Présentation de l'appareil de point de fusion.

#### III.1.4.2 Spectrophotométrie infrarouge

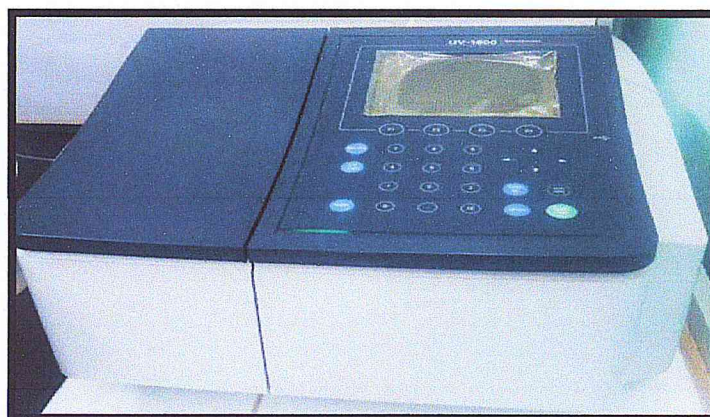
On a utilisée une spectrophotométrie IR à transformée de fourrier de marque jasco-4100, a température ambiante, On a utilise des pastilles KBr(1mg d'échantillon avec 100mg de KBr)



**Figure III.3 :** Spectrophotomètre transformée de fourrier (FTIR.)

#### **III.1.4.3 Spectrophotomètre UV-visible**

La spectrophotométrie UV-Visible de marque SHIMADZU UV spectrophotomètre repose sur l'interaction du rayonnement électromagnétique et de la matière. L'absorbance de notre molécule est mesurée dans le méthanol, en utilisant un spectrophotomètre de type UV-Vis Biowave DNA. Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz, le balayage de l'absorbance se fait entre 220 nm et 400nm



**Figure III.4 :** Présentation de l'appareil de Spectrophotomètre UV-visible.

#### **III.1.4.4 Chromatographie liquide sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince s'effectue généralement sur une fine couche de silice (phase stationnaire) déposée sur un support. Le mélange à étudié est ensuite posé à l'aide d'un capillaire à environ 1 cm du bord puis placé dans une cuve

contenant l'éluant. Le niveau de l'éluant devant être en dessous du produit déposé. La cuve de chromatographie est ensuite refermée par un couvercle. L'éluant migre sur la plaque de silice par capillarité et entraîne les composés du mélange étudié. Si les vitesses de migration des composés sont différentes, ils seront séparés, Il y a plusieurs façons d'identifier les endroits où se trouvent les produits ainsi séparés : La plaque de chromatographie est lue directement si les composés sont visibles (colorés), ou placée sous une lumière UV si ils sont fluorescents.



**Figure III.5 :** Présentation de la plaque CCM.

Sur une plaque CCM de marque FLUKA analytical SIGMA-ALODRICH(2×10 cm), On met un spot de notre produit solubilise dans le méthanol et on immerge dans une phase mobile de différents solvant (polaire/apolaire) et on mesure le rapport frontal.

## **III.2 Méthode d'extraction**

### **III.2.1 Extraction des furocoumarines**

#### **III.2.1.1 Procédé d'extraction**

L'extraction des furocoumarines de l'espèce *Ruta Montana* a été réalisée par un système conventionnel de soxhlet comme montré dans la figure III.6.

La matière végétale est introduit dans la cartouche en papier filtre cette dernière sera placée dans le soxhlet sur morte d'un réfrigérant.

Dans ce type d'extraction le solvant condense s'accumule dans réservoir à siphon ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire, Quand le solvant atteint un certain niveau, Le siphon et retourne dans le ballon en entrainant la substance dissoute.

L'extraction dégraissée par l'éther de pétrole est reprise par le méthanol selon le même protocole pour la récupération de la fraction polaire. Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des fractions.



Figure III.6 : Présentation de soxhlet.

### III.2.1.2 Rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, Il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Le pourcentage en extraits de la plante est calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{m}{m_0} * 100$$

R(%) : Rendement exprimé en %.

m : Masse en gramme de l'extraction sec résultant.

m<sub>0</sub> : Masse en gramme du matériel végétale à traiter.

### III.2.2 Méthode de purification

Dans un bécher de 150ml qui contient l'extrait, On ajoute 25mL de HCl 1M et on laisse le mélange avec agitation magnétique pendant 1h, puis on ajoute l'ammoniac jusqu'à la neutralisation (pH=7), a la fin on filtré la solution et on fait lavage avec l'éthanol jusqu'à l'obtention des cristaux.

### **III.2.3 Modification chimique avec l'hydrazine monohydrate**

#### **III.2.3.1 Mode opératoire**

Dans un ballon de 100ml muni d'un réfrigérant et d'une agitation magnétique, On met 12mmolesd'hydrazine sont dessous dans 20 mL d'éthanol ensuite on ajoute 10mmoles de notre produit et 1ml d'acide acétique le tout est porté dans un bain marié pendant 9h.

Le solvant est chassé par un évaporateur rotatif.

### **III.2.4 Etude de l'activité antimicrobienne de l'espèce *Ruta Montana***

#### **III.2.4.1 Introduction**

Les tests antibactériens et antifongiques ont pour but de rechercher l'activité biologique des feuilles de *Ruta Montana* vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries, moisissure et levure. Les extraits actifs pourraient ainsi justifier l'usage en médecine traditionnelle des plantes dont ils sont extraits.

Dans ce chapitre nous allons étudier in vitro le pouvoir antimicrobien des extraits préparé à partir de l'espèce *Ruta Montana* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons.

L'activité antimicrobienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis sept germes pathogènes d'origine hospitalière dont deux souches bactériennes contient de( G + et G - ) et quatre souche fongique.

#### **III.2.4.2 Antibiogramme**

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongigramme), repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide.

L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante.

Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester [40].



### III.2.4.3 Principe

La technique consiste à déposer des disques de papier buvard stérile de 6 mm de diamètre imprégnés d'une concentration connue de la substance chimique testée sur une gélose dans des boîtes de pétrie inoculées et uniformémentensemencées au préalable par la suspension bactérienne à étudier, puis incuber.

À la fin de la période d'incubation et si la substance est efficace, une zone pâle apparaît autour du disque, là où la croissance microbienne a été inhibée, cette région s'appelle « zone d'inhibition » ou « halo d'inhibition » (figure III.7). Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à la substance chimique testée. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

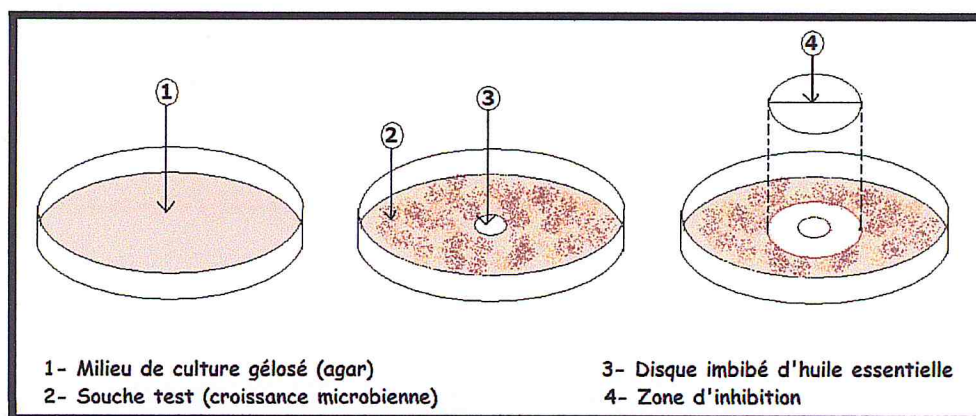


Figure III.7 : Représentation de la méthode de diffusion de disque [41].

### III.2.4.4 Microorganismes utilisés

Les souches microbiennes utilisées dans notre étude sont de référence ATCC provenant du laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida. En effet, six souches microbiennes sont utilisées dans notre étude, à savoir, deux bactéries et quatre champignons.

Tableau III.2 : Microorganismes utilisés

Souches	Nature de souches	Gram	Références (ATCC)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bactérie	+	ATCC 6538
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bactérie	-	ATCC 2785

Souches	Nature de souches	Gram	Références (ATCC)
<i>Aspergillusnegeria</i>	Champignon	/	ATCC 1015
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Champignon	/	ATCC 16404
<i>Candida albicans</i>	Champignon	/	ATCC 10231
<i>Aspergillus flavus</i>	Champignon	/	ATCC 9643

### III.2.4.5 Antibiotiques et antifongique utilisés

La sensibilité des souches microbiennes a été testée vis-à-vis des antibiotiques (céphalixine) et des antifongiques (Flazol 0.25 mg/disque) par la méthode de diffusion sur disque.

### III.2.4.6 Protocole expérimental

L'activité antimicrobienne a été déterminée par le protocole adaptée par la pharmacopée européenne [42].

#### A. Préparation de l'inoculum

Cette méthode consiste à préparer une suspension microbienne en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques à partir d'une culture microbienne de 18-24h et les introduire dans des tubes à essais avec 9 ml d'eau physiologique stérile, puis agiter au vortex pendant quelques secondes.

#### B. Préparation de milieu de culture

- Faire fondre les milieux gélosés (Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures et moisissures) dans un bain marie réglé à 95°C.
- Couler aseptiquement les milieux de culture dans des boites de Pétri de 90mm de diamètre à raison de 15ml par boite.
- Laisser refroidir et solidifier sur la pailleasse

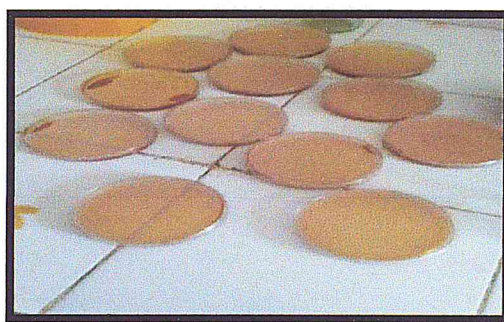


Figure III.8 : Les milieux de culture dans les boites pétris.

### **C. Ensemencement**

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries séries.
- Répéter l'opération trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

### **D. Séchage**

Laisser sécher les boîtes de Pétri pendant quelques minutes à température ambiante. Les couvercles des boîtes doivent être fermés.

### **E. Préparation de la solution à tester**

- Faire dissoudre une quantité de l'extrait dans le DMSO pour avoir la concentration désirée (100 mg/ml) et (150 mg/ml).
- Agiter pendant quelques secondes à l'aide d'un vortex.



**Figure III.9 :** Les extraits dans le DMSO.

### **F. Déposition des disques**

- Une fois les milieux sont solidifiés, prélever aseptiquement à l'aide d'une pince un disque buvard imprégné dans la solution d'extrait, ensuite les déposer à la surface des milieux de culture préalablement coulés. Appuyer doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu.

- Laisser les boîtes pendant 30 minutes sur la palliasse à température ambiante pour permettre une bonne diffusion des produit étudiés.

### G. Incubation

- Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 48h à 3 jours pour les levures et moisissures.

### H. Lecture des résultats

La sensibilité des germes au produit est déterminée après incubation, par mesure de diamètre des zones claires autour des disques (zone d'inhibition en mm) à l'aide d'un pied à coulisse.

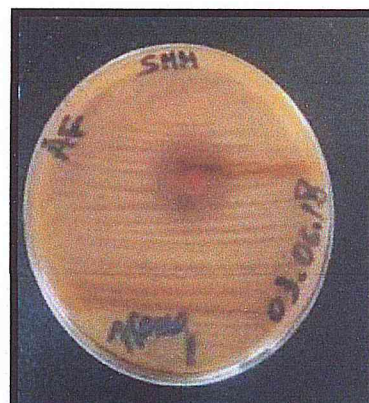
Suivant le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en (mm) autour de chaque disque, la lecture des résultats est faite comme suit [43].

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur ou égale à 28mm.
- Modérément inhibitrice lorsque :  $16\text{mm} \leq \text{diamètre de la zone} < 28\text{mm}$ .
- Légèrement inhibitrice lorsque :  $10\text{mm} \leq \text{diamètre de la zone} < 16\text{mm}$ .
- Non inhibitrice lorsque : diamètre de la zone  $< 10$  mm.

**NB :** Pour le témoin négatif, nous déposons des disques imbibés du solvant (DMSO), pour confirmer que l'apparition des zones d'inhibition est due à la présence de nos échantillons.



**Souche bactérienne**  
*Aspergillus flavus*



**Souche fongique**  
*Staphylococcus aureus*

**Figure III.10 :** Zone d'inhibition de deux souches antimicrobiennes.

# *Chapitre IV*

## *Résultats et discussions*

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### IV.1 Extraction et caractérisation des furocoumarines

Pour l'obtention des différents extraits de la rue de montagne, nous avons réalisé des extractions par le procédé de soxhlet (avec deux solvants de polarité différente : EP et MeOH)

#### IV.1.1 Extrait apolaire

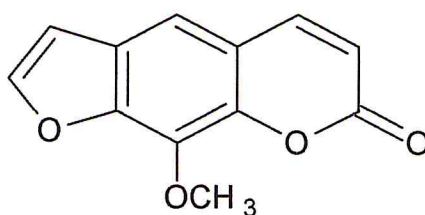


Tableau IV.1: Propriétés de l'extrait apolaire

Solvant de l'extraction	Produit	Aspect	Couleur	Rendement %	Point de fusion °C	R <sub>f</sub>
éther de pétrole	Extrait apolaire	Poudre	Jaune claire	0.1	140	0,86

#### IV.1.1.1 Spectre FTIR d'extrait apolaire en transmittance

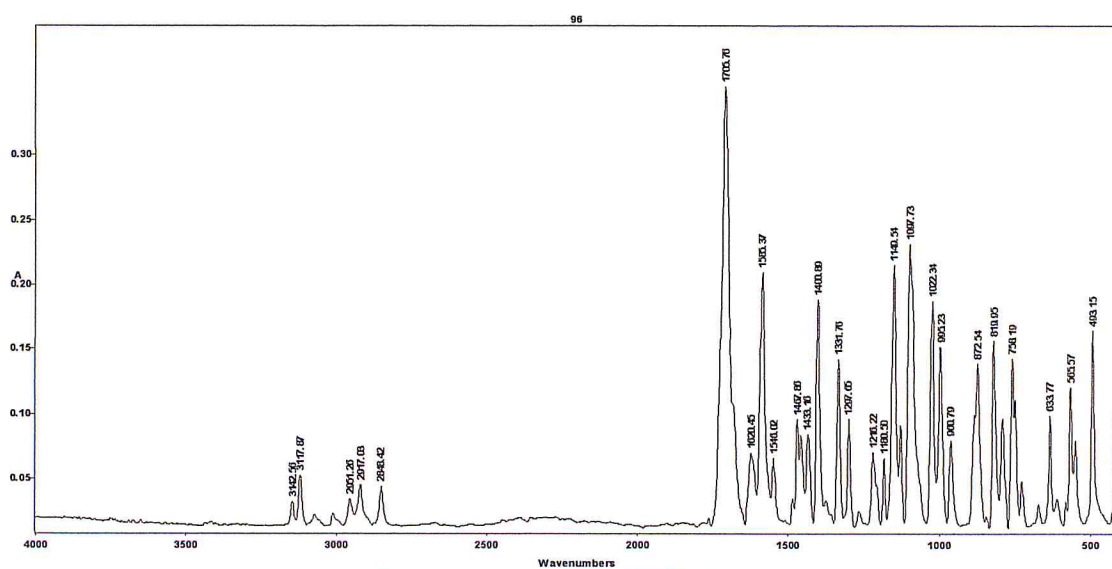
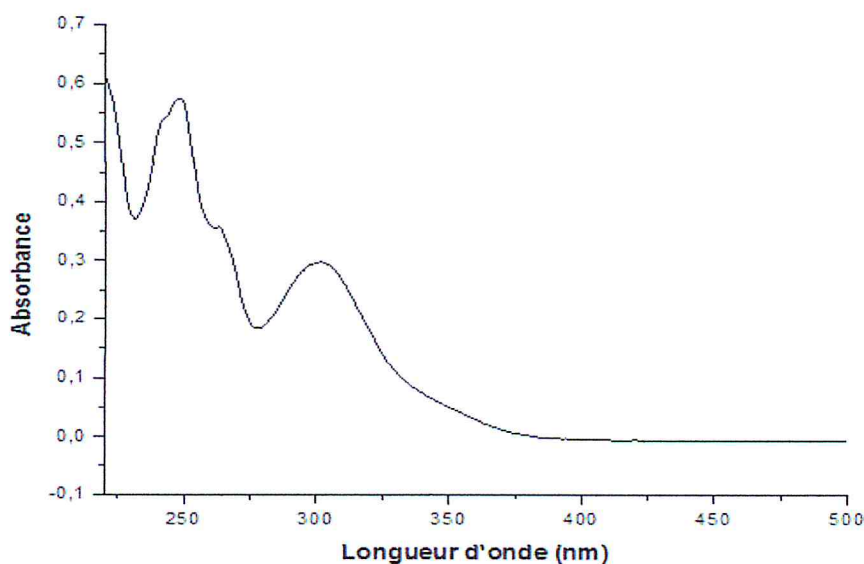


Figure IV.1 : Spectre représentatif FTIR d'extrait apolaire.

- ❖ Le spectre FTIR de l'extrait apolaire de la rue récolté dans la région de Sétif caractérisé par la présence d'un ensemble de pic répartie en deux régions :
- ❖ La première région concerne des vibrations des liaisons CH avec des intensités faibles.
- ❖ Le pic situé à  $3117\text{ cm}^{-1}$  est attribué à la vibration de la liaison CH d'un alcène présenté au sein de la structure d'un noyau furane et coumarine.
- ❖ Un pic d'intensité plus faible  $3200\text{ cm}^{-1}$  spécifique à la liaison CH d'un noyau aromatique.
- ❖ Les vibrations CH du groupement méthyle située entre  $2917\text{ cm}^{-1}$ ,  $2951\text{ cm}^{-1}$ .
- ❖ Le groupement méthoxy et localiser par un pic à  $2848\text{ cm}^{-1}$  d'après la littérature.
- ❖ La deuxième région qui permet d'identifier exactement les furocoumarines se trouve dans la vibration de liaison carbonyle C=O à  $1705\text{ cm}^{-1}$ .
- ❖ Les autres pics sont spécifiques à différentes déformations des liaisons de la molécule étudiée.

#### IV.2.4.6 Spectre UV-visible



**Figure IV.2:** Spectre UV-visible de l'extrait apolaire.

Le spectre UV-visible de produit obtenu de l'extraction de la rue (région sétif) avec l'éther de pétrole et purifié par recristallisation avec de l'éthanol absolue est caractérisé par la présence de trois bandes d'intensité importante et un épaulement situé entre deux bandes :

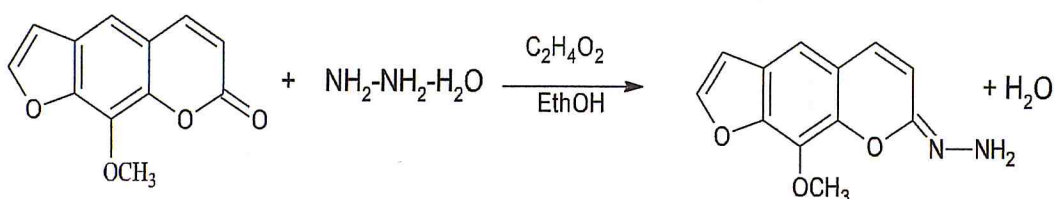
- ❖ La première bande plus large localisé à 331 nm attribuée a la transition électronique  $n \rightarrow \pi^*$  de la fonction carbonyle (C=O).
- ❖ Le seconde pic plus ou moins large situé à 273 nm ainsi que le troisième pic localisé aussi à 242 nm Sant caractéristique de la transition électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$  de la double liaison (alcène) contenue dans le noyau coumarine dans le noyau aromatique et dans le noyau furane.

**Tableau IV.2 :** les bandes d'absorbance de l'extrait apolaire

Absorbance	0,1383	0,2757
$\lambda_{\max}$	273	331

#### IV.1.2 Modification d'extrait apolaire

##### ➤ Réaction



**Tableau IV.3 :** Propriétés d'extraits apolaire modifiée

Solvant de modification	Produit	Aspect	Couleur	Rendement %	Point de fusion °C	R <sub>f</sub>
Ethanol	Extrait apolaire modifié	Poudre	Jaune	19,28	110	0,17



### IV.2.1.1 Spectre FTIR

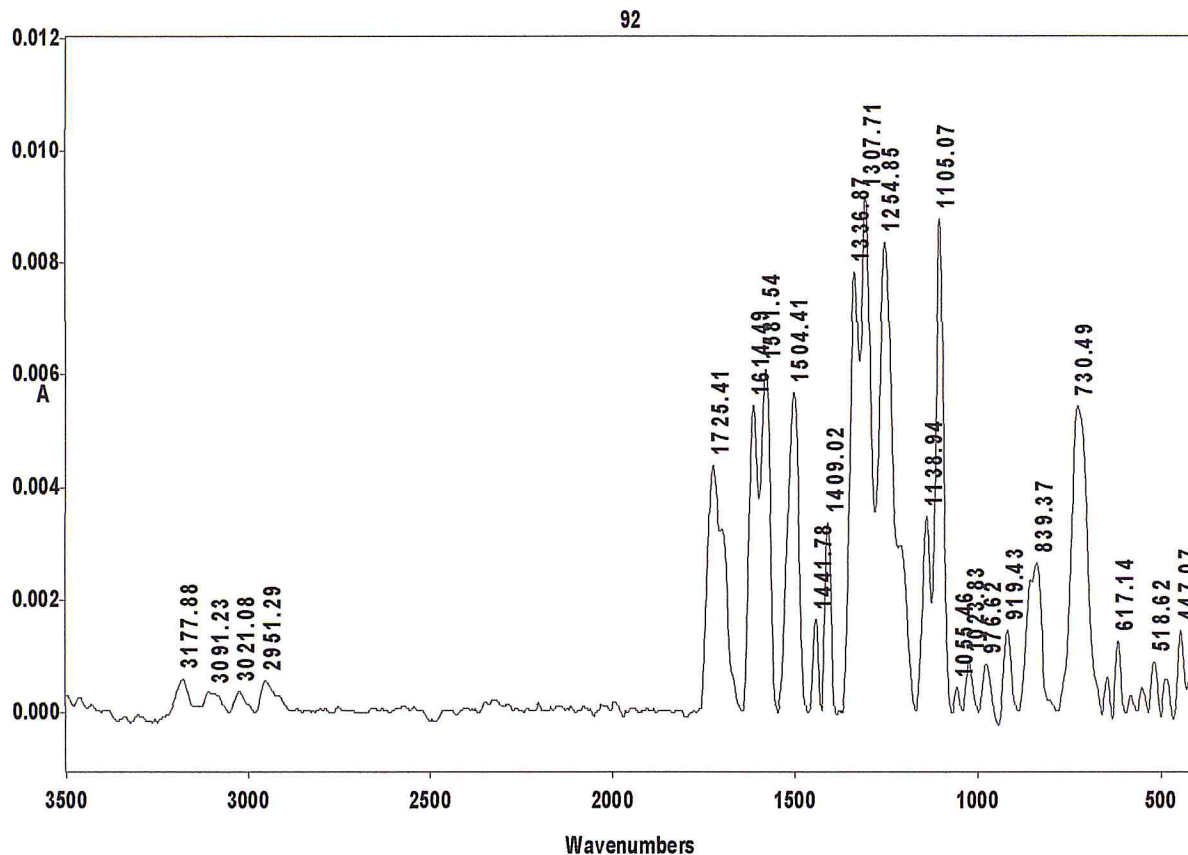
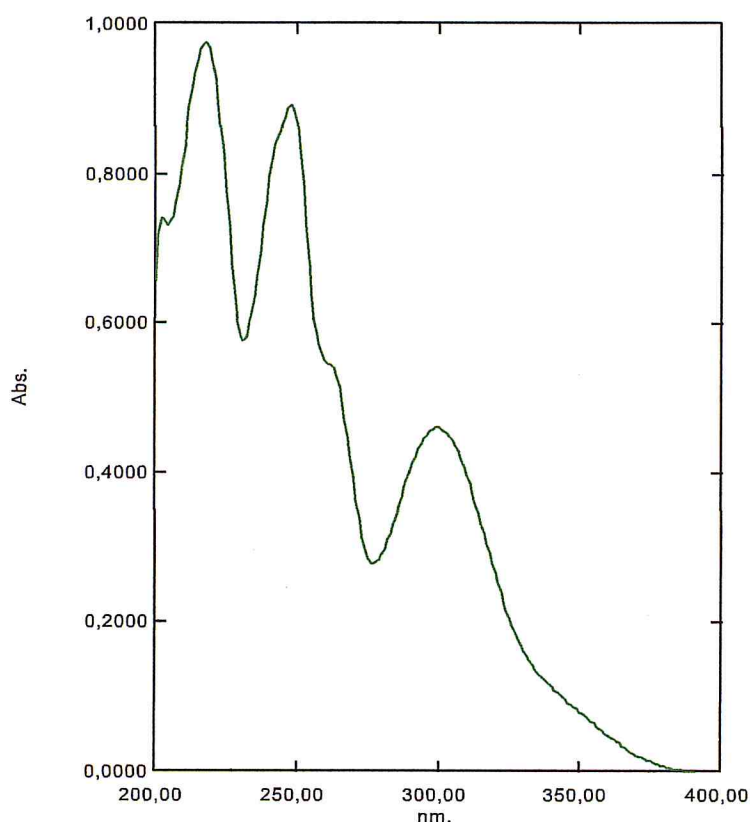


Figure IV.3 : Spectre représente FTIR de l'extrait apolaire modifié

Le spectre FTIR de la xanthotoxine obtenu après la modification montre l'apparition d'un nouveau pic situé à 3177 cm<sup>-1</sup> responsable de la vibration du groupement NH<sub>2</sub> avec la diminution de l'intensité du pic du carbonyle situé à 1710 cm<sup>-1</sup>. 3 pics de vibration caractéristiques des liaisons C-H sont situés à 2951,24 cm<sup>-1</sup> relative au groupement méthyle (CH<sub>3</sub>), un pic de groupement méthylène (CH<sub>2</sub>) situé à 2917,02 cm<sup>-1</sup> et un pic à 3091,81 cm<sup>-1</sup> correspondant à la liaison C-H.

#### IV.1.2.2 Spectre UV



**Figure IV.4:** Spectre UV-visible de l'extrait apolaire modifié.

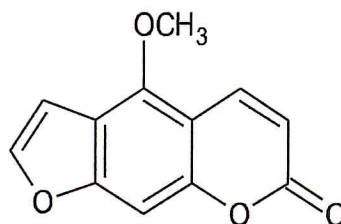
Ce pendant la réaction du produit identifié comme étant xanthotoxine avec l'hydrazine monohydrate a permis d'obtenir un spectre UV-vis caractériser par un seul bande et deux pics avec grande intensité et un épaulement situé entre deux bandes.

- ❖ La 1<sup>er</sup> bande la plus large localisé à 300 nm attribuée à la transition  $n \rightarrow \pi^*$  qui indique l'apparition de l'function imine  $C=N$ .
- ❖ Le 2<sup>ème</sup> pic et 3<sup>ème</sup> pic et l'épaulement les plus ou moins large situé à 272 nm, 248 nm et 218 nm respectivement sont caractéristiques de la transition électronique  $\pi^* \rightarrow \pi^*$  de l'alcène et l'alternance contenu le noyau coumarine, aromatique et furane.
- ❖ Cette modification permet déclarer le changement de l'extraction initial par insertion d'un groupement imine nouveaux.

**Tableau IV.4 : Spectre UV-visible de l'extrait apolaire modifié**

Absorbance	0,4594	0,8934	0,9762	0,2778	0,5756
$\lambda_{\max}$	300	248	218	277	231

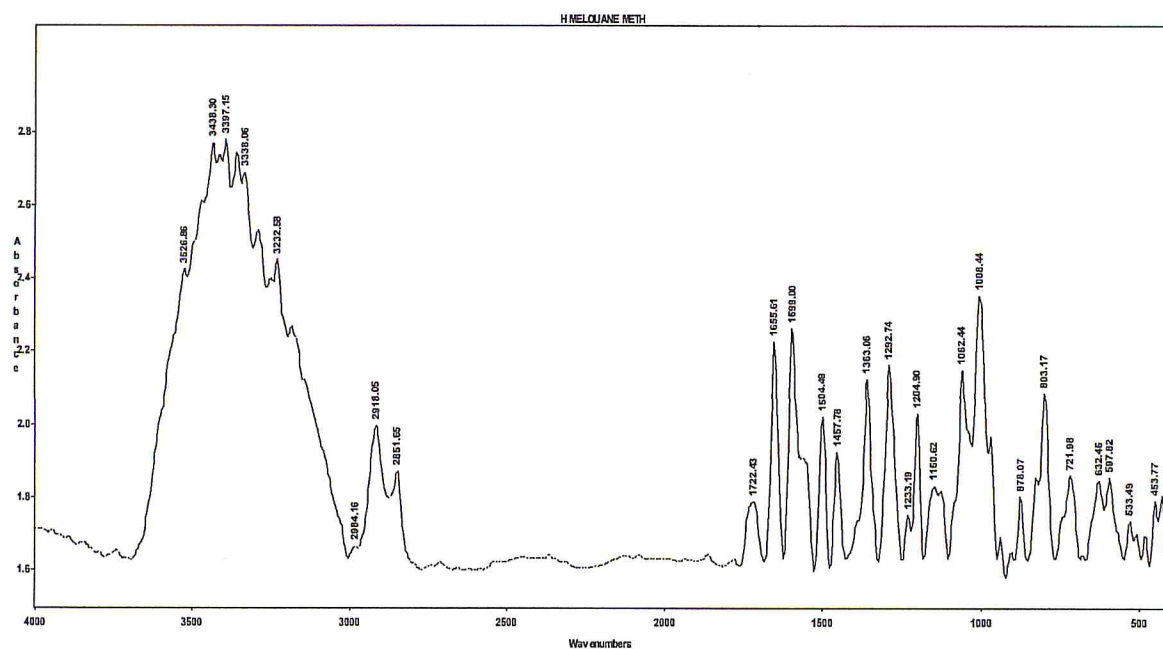
### IV.2.1 Extrait polaire (Hammam melouane)



**Tableau IV.5 : Propriété de l'extrait polaire.**

Solvant de l'extraction	Produit	Aspect	Couleur	Rendement %	Point de fusion °C	R <sub>f</sub>
Méthanol	Extrait polaire	Poudre	Verte	1,71	180	0.60

#### IV.2.1.1 Spectre FTIR



**Figure IV.5 : Spectre représente FTIR de l'extrait polaire.**

- ❖ L'analyse du spectre FTIR de l'extrait polaire obtenu est représenté sur la figure permet de distinguer la présence d'un pic faible relative aux vibrations de groupement carbonyle C=O situé a  $1722\text{ cm}^{-1}$ .
- ❖ La présence de deux pics relative aux vibrations de liaison CH, CH<sub>3</sub> a  $2800$  et  $2900\text{ cm}^{-1}$ .
- ❖ Un pic intense situé à  $3397\text{ cm}^{-1}$  correspond un groupement hydroxyl liée.
- ❖ Situé un pic d'un groupement alcène C=C a  $2884\text{ cm}^{-1}$ .

#### IV.2.1.2 Spectre UV

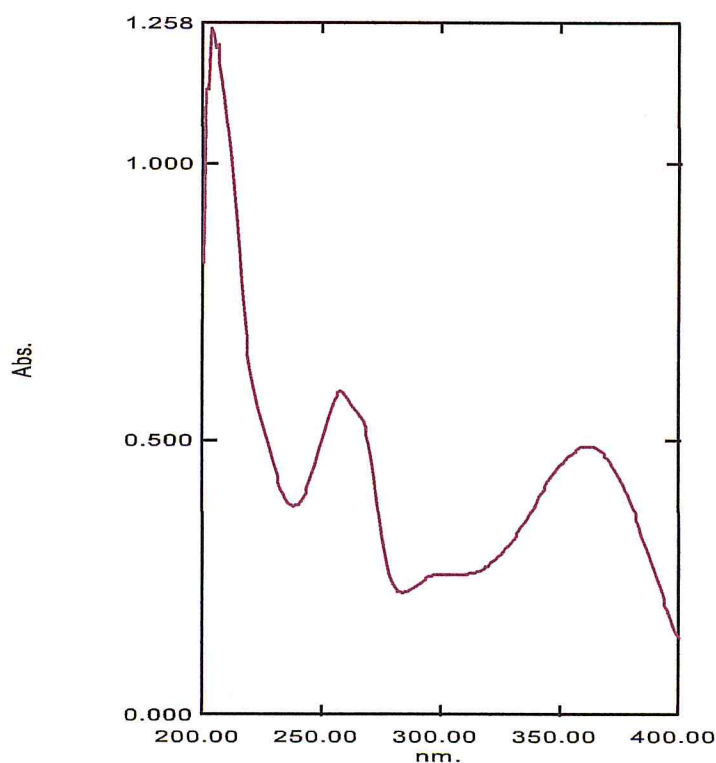


Figure IV.6: Spectre UV-visible de l'extrait polaire.

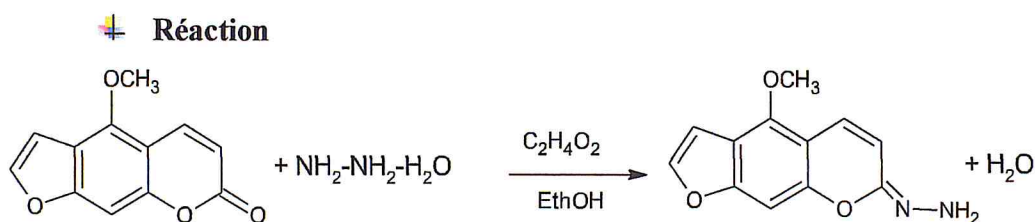
Tableau IV.6 : Les bandes d'absorbance de l'extrait polaire

Absorbance	1,213	0,588	0,487
$\lambda_{\text{max}}$	205	258	361

Le spectre UV-Vis de l'extrait méthanolique de la rue de la région de Hammam melouane est caractérisé par une absorption dans la région UV avec une bande large située à 361 nm relative à la transition électronique  $n \rightarrow \pi^*$  d'une fonction carbonyle importante, une bande moins large et plus intense localisée à 258 nm spécifique d'excitations électronique.

$\pi \rightarrow \pi^*$ , En conjugaison dans un noyau aromatique. Cependant, à 205 nm un pic intense est identifié pour la transition  $n \rightarrow \pi^*$ .

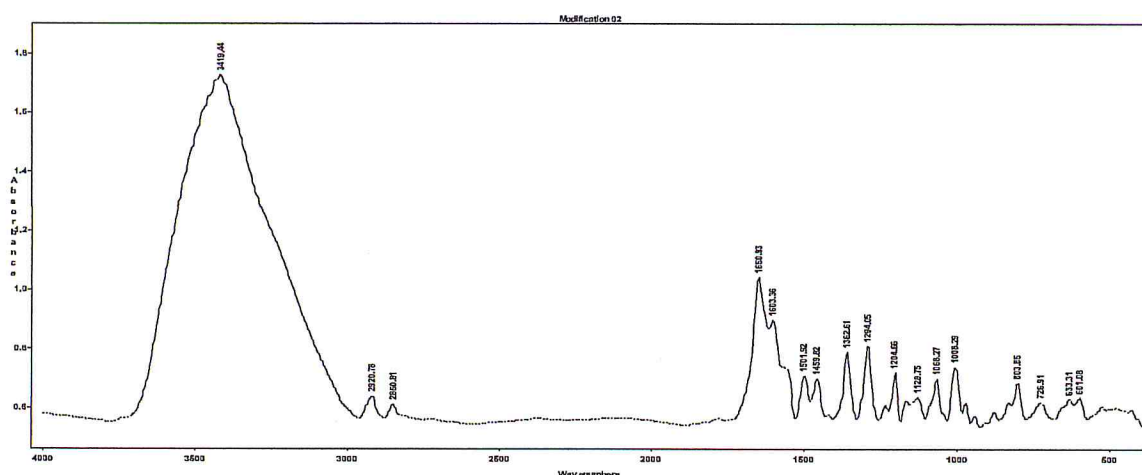
#### IV.2.2 Modification de l'extrait polaire



**Tableau IV.7:** Propriété de l'extrait polaire modifié.

Solvant de modification	Produit	Aspect	Couleur	Rendement %	Point de fusion °C	R <sub>f</sub>
Ethanol	Extrait modifié polaire	Poudre	Vert claire	78.95	>245	0.80

##### IV.2.2.1 Le spectre FTIR



**Figure IV.7 :** Spectre représente FTIR de l'extrait polaire modifié.

- ❖ A partir de spectre IR de produit modifié de Bergaptène représenté sur la figure on situé une bande instance et fine d'un groupement OH libre a  $3419.44\text{ cm}^{-1}$ .
- ❖ Bande d'absorption de deux pics faible de CH et  $\text{CH}_3$  a  $2860.81$  et  $2920.78\text{ cm}^{-1}$
- ❖ Un pic moyen présent à  $1660,93\text{ cm}^{-1}$  indique la double liaison C=C d'alcène de cette molécule.
- ❖ Le spectre IR de Bergaptène et le modifiée de Bergaptène sont caractérisés par la disparation de groupement carbonyle C=O.

#### IV.2.2.2 Le spectre UV

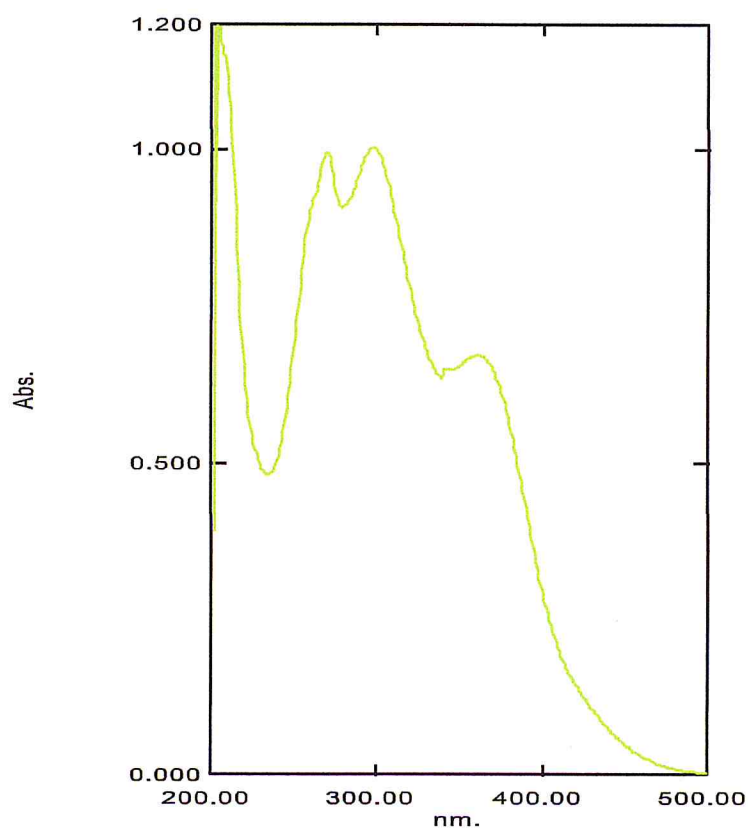


Figure IV.8: Spectre UV-visible de l'extrait polaire modifié.

Tableau IV.8 : Bandes d'absorbance de l'extrait polaire modifié

Absorbance	1,227	0,995	1,003	0,670
$\lambda_{\text{max}}$	205	270	298	361

La réaction de l'extrait méthanolique de la rue de Hammam Melouane avec l'hydrazine a permis la modification de la structure chimique du produit cible par un changement important sur le spectre UV-Vis ou un nouveau pic est apparu en plus des pics existants. La bande située à 361 nm et le pic de 205 nm ont été conservé par contre le nouveau pic localisée attribué à la transition électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$  identique à celle de 258 nm identifié dans l'extrait de départ et qui subit un déplacement bathochrome vers 270 nm.

### IV.3.1 Extrait polaire (de Sétif)

Tableau IV.9 : Propriété de l'extrait polaire de Sétif.

Solvant de l'extraction	Produit	Aspect	Couleur	Rendement %	Point de fusion °C	R <sub>f</sub>
Ethanol	Extrait polaire	Poudre	Noire	0.29	192	0.76

#### IV.3.1.1 Spectre FTIR

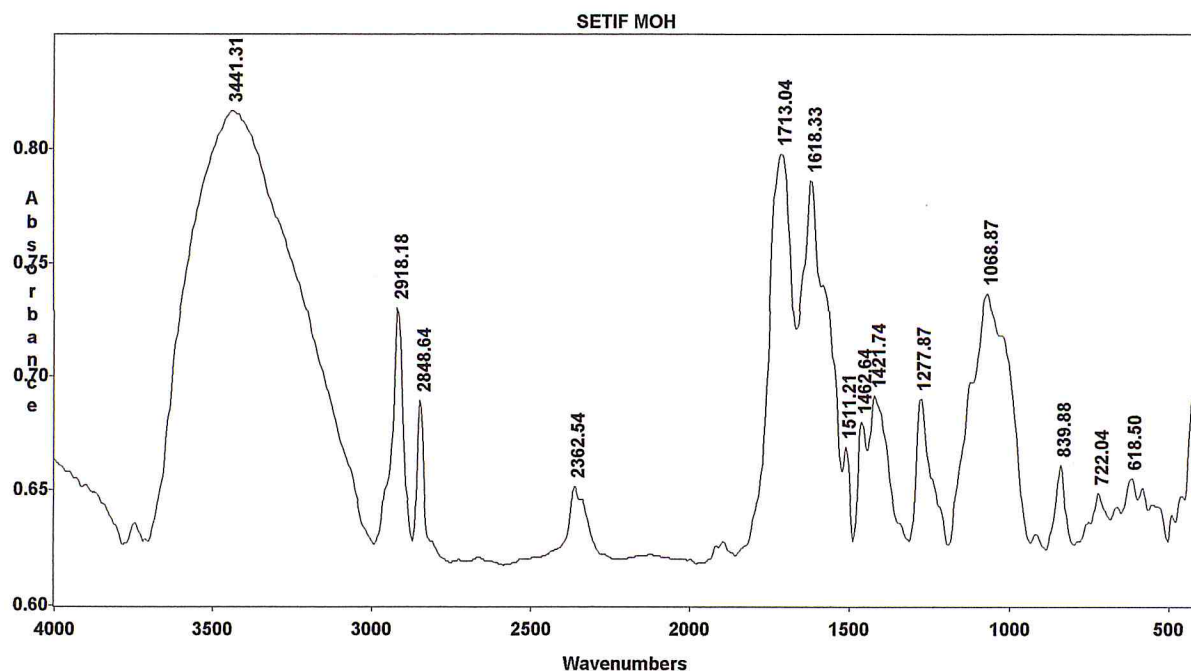


Figure IV.9 : Spectre représente FTIR de l'extrait polaire de Sétif.

- ❖ Les spectres IR de l'extrait de sétif est caractérisé par des bandes d'élongation indique comme suivant :
- ❖ Elongation des liaisons OH apparaissant sous format d'une bande large à  $3441.31\text{cm}^{-1}$ .
- ❖ Bande d'absorption du groupement carbonyle C=O située à  $1713.04\text{cm}^{-1}$ .
- ❖ Elongation des liaisons C=C aromatique à  $1618.33\text{cm}^{-1}$ .
- ❖ Vibration des liaisons des groupements méthylique ( $-\text{CH}_3$ ) et méthylène ( $-\text{CH}_2-$ ) située à  $2848.64$  et  $2918.18\text{cm}^{-1}$ .

#### IV.3.1.2 Le spectre UV

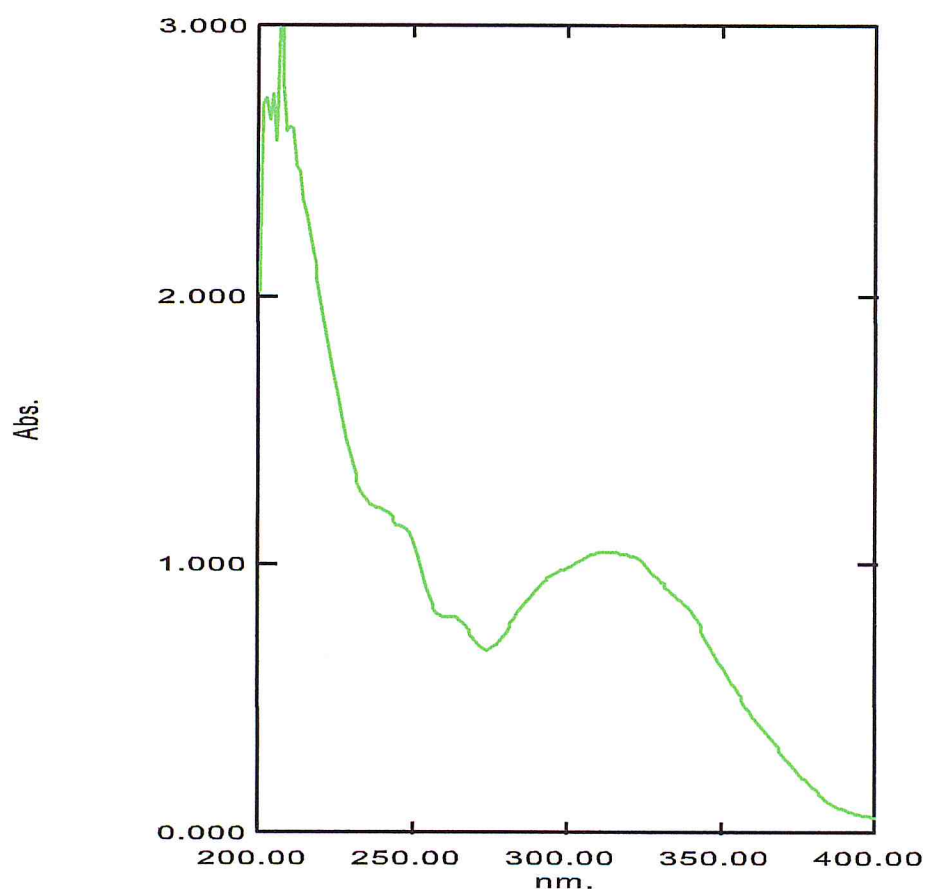


Figure IV.10: Spectre UV-visible de l'extrait polaire de sétif.

L'extraction de la rue (région sétif) par méthanol à permet d'obtenir un produit dans le spectre UV-vis est composé du deux bandes larges et un seul pic.



La bande est localisé à 315 nm attribuée à la transition électronique de la fonction carbonyle C=O et un pic à 205 nm caractéristique de la transition électronique  $\pi \rightarrow \pi^*$

**Tableau IV.10 :** Les bandes d'absorbance de l'extrait polaire de Sétif

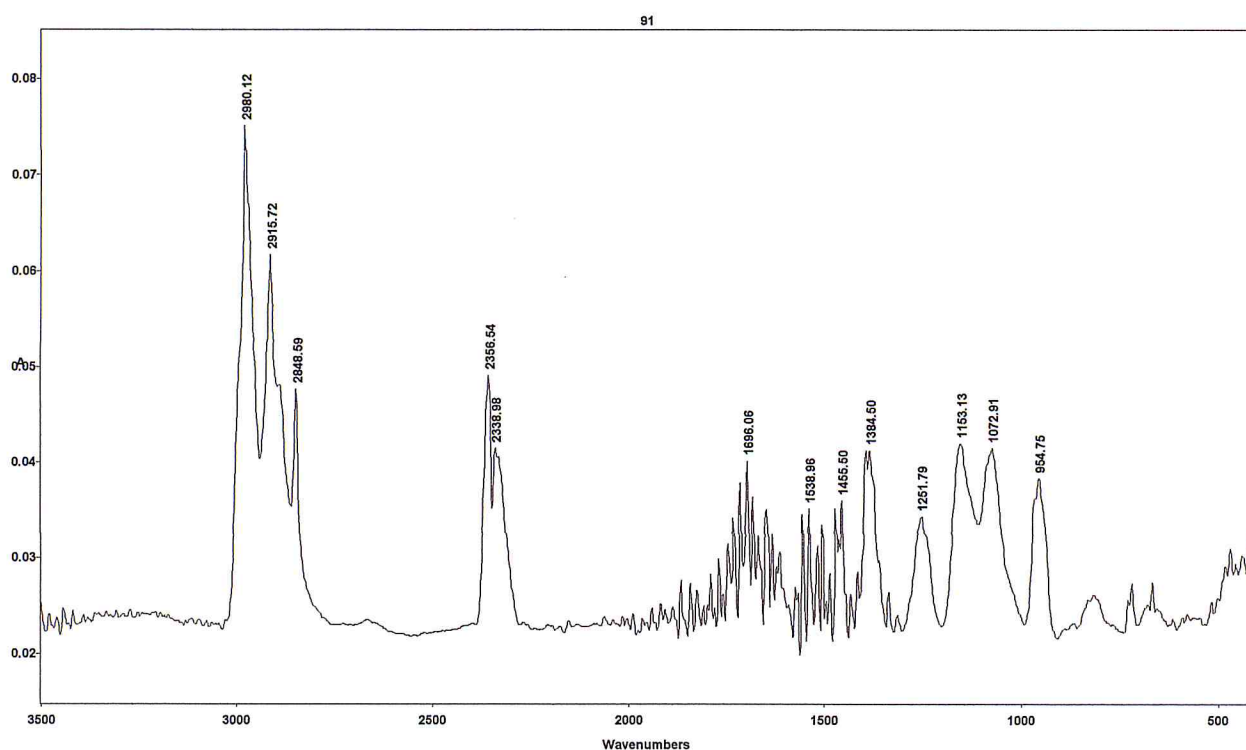
Absorbance	1,042	0,004	1,150	2,577
$\lambda_{\max}$	315	265	245	205

### IV.3.2 Modification de l'extrait polaire

**Tableau IV.11:** Propriété de l'extrait polaire modifié de Sétif.

Solvant de modification	Produit	Aspect	Couleur	Rendement %	Point de fusion °C	R <sub>f</sub>
Ethanol	Extrait polaire modifié	Poudre	Vert foncé	55,55	>245	0.44

#### IV.3.2.1 Spectre FTIR



**Figure IV.11 :** Spectre représente FTIR de l'extrait de polaire modifié de Sétif.

La modification chimique du produit obtenu par l'extraction avec le solvant polaire de la région de Sétif permis d'obtenir le spectre FTIR qui contient plusieurs pics caractéristique subdivise en deux parties.

La première partie concerne des vibrations du groupement  $\text{NH}_2$  à  $3200 \text{ cm}^{-1}$ , des pics situés à  $2980,12$  et  $2915,12$  avec une forte intensité spécifique à la vibration C-H du groupement méthyle et méthylène.

Elongation situés à  $2848,59 \text{ cm}^{-1}$  correspondent à un groupement méthoxy et 2 pics d'un groupement de cyclation sont localisés à  $2356,54 \text{ cm}^{-1}$  et  $2338,98$ .

Dans la deuxième partie on remarque un pic de la fonction C=N à  $1696,06 \text{ cm}^{-1}$

Les autres pics sont spécifiques à des déformations de la molécule.

#### IV.3.2.2 Spectre UV

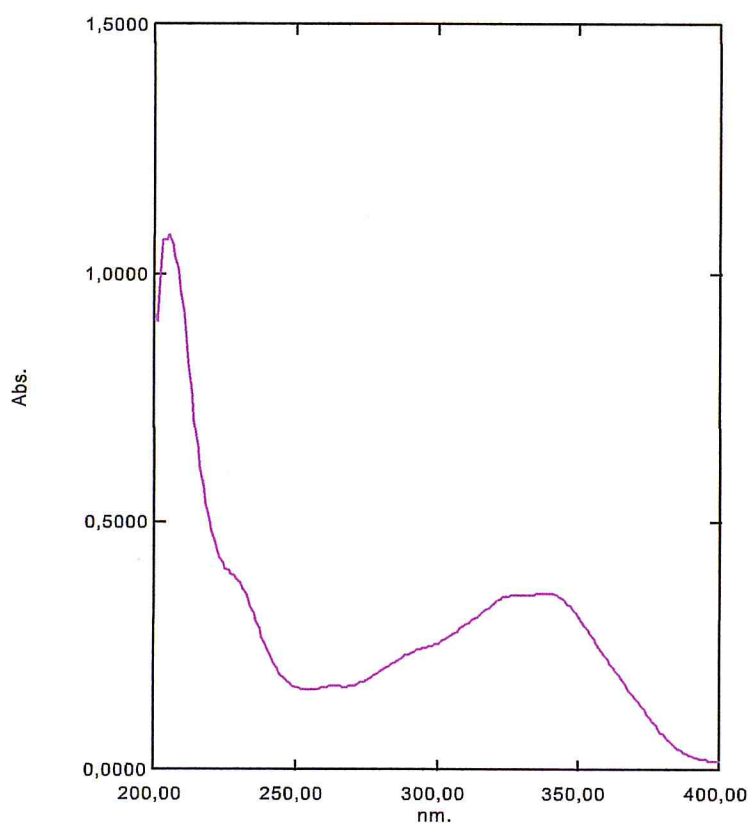


Figure IV.12 : Spectre UV-visible de l'extrait polaire modifié de sétif.

**Tableau IV.12:** Les bandes d'absorbance de l'extrait polaire modifié de Sétif

Absorbance	0,353	1,0774	0,391
$\lambda_{\max}$	333	205	228

La réaction du produit obtenue par l'extrait de Sétif méthanol avec l'hydrazine a conduit à la formation d'un nouveau produit de condensation dans le spectre UV-vis montre le déplacement bathochrome de l'absorption à nouvelle longueur d'onde localisé à 333 nm, cette bande est attribuée à transition électronique  $n \rightarrow \pi^*$  d'une fonction imine.

Parmi les changements intervenus pour le spectre UV-vis de produit de condensation et disparition de l'épaule à 245 nm.

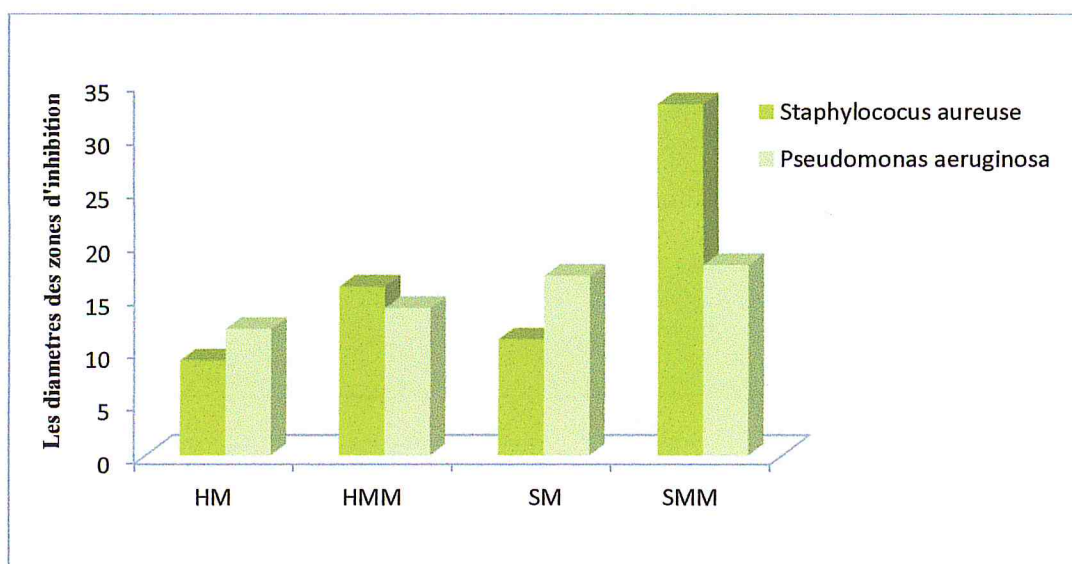
Permettant ainsi de confirmer la modification de la structure chimique du produit isolé avec le méthanol de la rue de Sétif vis-à-vis de l'interaction de l'hydrazine avec le produit de question.

#### **IV.2 Résultats de l'évaluation et discussion de l'activité antimicrobienne.**

Nous avons testé l'effet antimicrobien des deux extraits méthanoliques (EM) et leurs extraits modifiés de deux régions différentes vis-à-vis de six souches microbiennes. Le tableau IV.13 et IV.14 rapporte les résultats du pourcentage d'inhibition déterminés à partir des diamètres des zones d'inhibition. Après 24h d'incubation à 37°C pour les souches bactériennes et après 48h d'incubation à 37°C pour les souches fongiques, nous avons observé l'apparition des zones d'inhibition autour des disques. Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux suivants.

**Tableau IV.13:** Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches bactériennes (en mm) méthode de disques des extraits par différentes concentrations.

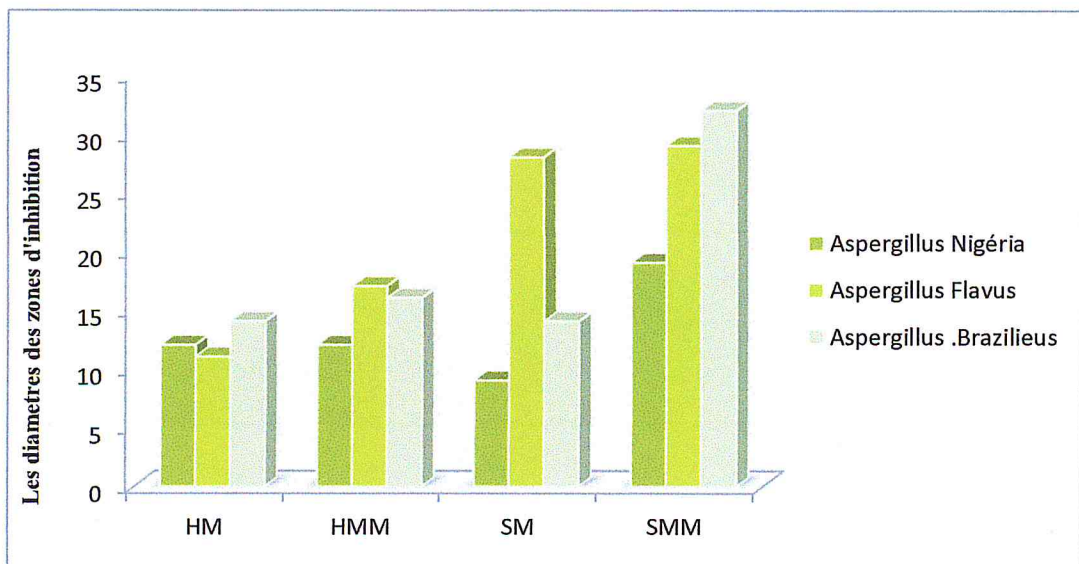
La concentration en mg/mL	Pseudomonas aeruginosa		Staphylococusaureuse	
	100	150	100	150
HM	8	12	7	9
HMM	12	14	15	16
SM	9	17	9	11
SMM	15	18	11	33
ATB(20mg)	16		10	
ATF(20mg)	7		12	



**Figure IV.13 :** les diamètres des zones d'inhibition d'extrait methanolique et des extraits modifie relatives aux différentes souches bactérienne.

**Tableau IV.14:** Les diamètres des zones d'inhibition des différentes souches fongiques (en mm) .

La concentration en mg/mL	Aspergillus Flavus		Aspergillus .Brazilieus		Candidaalbicans		Aspergillus Nigéria	
	100	150	100	150	100	150	100	150
HM	8	11	10	14	-	-	10	12
HMM	15	17	15	16	-	-	10	12
SM	12	28	12	14	-	-	7	9
SMM	13	29	29	32	-	-	9	19
ATB(20mg)	12		14		-		15	
ATF(20mg)	15		10		7		10	



**Figure IV.14 :** Les diamètres des zones d'inhibition d'extrait méthanolique et des extraits modifiés relatives aux différentes souches fongiques.

L'activité antibactérienne et antifongique des produits isolés et modifiés ont été testé et les résultats ont été regroupé dans les tableaux II.13 et II. 14 et dans les figures II.13 et II.14.

En général il y avait une différence entre les zones d'inhibition des bactéries G(+), G(-) et les champignons. Le produit HM montre une meilleur activité antibactérienne contre la bactérie G(-) *Pseudomonas aeruginosa* qu'avec la G(+) , ces activités ont été amélioré après la modification de ce produit et on remarque l'augmentation des diamètres d'inhibition de 9mm contre *staphylococcus aureus* jusqu'à 16mm et de 12 jusqu'à 14mm pour la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, d'où o remarque que les produits modifié ont été plus efficace contre la bactérie G+ le même phénomène a été observé avec le produit SM qui montre une forte activité 17mm contre *Pseudomonas aeruginosa*, cette activité augmente toujours avec le produit modifié jusqu'à 33mm contre *staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus pour les souches fongiques montrent que l'extrait modifié de HM exerce une importante activité inhibitrice sur les souches *Aspergillus flavus* et *Aspergillus Brasiliensis* avec des zones d'inhibition de 17 mm et 16 mm respectivement, ces derniers produits ont des zones d'inhibition plus grandes que les extraits bruts avec des zones d'inhibition de 11mm et 14mm respectivement, pour la souche *Aspergillus nigéria* une sensibilité de zone d'inhibition constante de 12 mm a été remarqué part rapport à l'extrait modifie et l'extrait brut de la plante.

Nous avons remarqué que les souches *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Brasiliensis* et *Aspergillus nigéria* présentent une sensibilité très puissantes vis-à-vis de l'extrait modifié de Sétif (150mg) avec des zones d'inhibition de 29 mm 32mm et 19mm respectivement. Le champignon *Candida albicans* montre une résistance contre tous les produits testés.

Les extraits modifiés de *Ruta Montana* ont fournit des zones d'inhibition plus grandes que les extraits bruts ceci est du à la présence de l'azote dans les molécules des produits modifiés qui possèdent une forte activité antimicrobienne.

# ***Conclusion générale***

## Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons étudié une plante médicinale et aromatique appelée *Ruta montana* qui appartient à la famille de Rutacées, une des familles les plus importantes dans la flore algérienne et les plus utilisées par les thérapeutes traditionnels, après étude de la plante citée nous sommes arrivés aux résultats qui nous ont permis l'identification des composés de types furocoumarines.

L'extraction des furocoumarines de la *Ruta montana* par deux solvants de polarité différents a été réalisée, trois produits ont été séparés et identifiés par différentes méthodes : spectrophotométrie IRTF, spectrophotométrie UV-Visible dont on a obtenu les résultats suivants : extrait apolaire (xanthotoxine, et deux extraits polaires) avec différents rendements en fonction des solvants utilisés et des régions étudiées.

La modification chimique des produits extraits par l'hydrazine mono-hydrate a fourni de nouveaux produits, leurs structures chimiques ont été confirmées par la disparition du groupement carbonyle C=O situé environ 1705 cm<sup>-1</sup> dans l'IR et l'absence de l'excitation  $n \rightarrow \pi^*$  démontrée par l'UV-Visible et l'apparition de groupement NH.

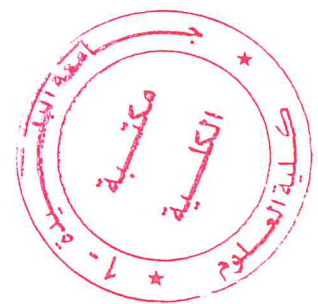
Les résultats des tests de l'activité antimicrobienne des produits bruts et modifiés testés sur deux souches bactériennes gram<sup>+</sup> et gram<sup>-</sup> (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) et quatre souches fongiques (*Aspergillus Braziliensis*, *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*), montrent que les extraits modifiés exercent une importante activité inhibitrice et mieux que de l'extrait brut du fait de la présence de l'azote qui possède une bonne activité bactérienne.

À la lumière de ces résultats encourageants, l'utilisation des méthodes spectroscopiques plus développées comme la RMN H1 et C13 souhaitable pour l'identification de la structure exacte des molécules,

L'amélioration des rendements et du temps des réactions en utilisant de nouvelles méthodes de chauffage, d'autres applications peuvent être étudiées pour la valorisation de ces produits.



Une étude plus avancé de l'activité antimicrobienne peut être effectuée on étudiant la CMI et la CMB de ces produits



*Références*  
*bibliographiques*

## *Référence Bibliographique*

- [1] Benziane Maatallah.M. (2007). Screening phytochimique de la plante *Ruta montana* Extraction de l'huile essentielle et de la rutine Activité antioxydante de la plante. ORON.
- [2] Duraffourd C., Lapraz J-C., Chemli R., 1997. La plante médicinale de la tradition à la science, 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.
- [3] Bourgaud, F (2005) influence de l'environnement sur les teneurs en composés phénoliques chez la tomate. université de lorraine.
- [4] Bourgaud, F, 2003 Laboratoire Agronomie et Environnement, université de lorraine.
- [5] Gaussen H., Ozenda P. et Leroy J.F.(1982). Précis de botanique, végétaux supérieurs. Tome II, Ed. Masson, Paris, 600p.
- [6] Judd W.S., Cambeil C.S., Kellogg E.A. et Stevens P. (2002), Botanique systématique une perspective phylogénétique 1<sup>ère</sup> édition. Ed De Boeck, Paris, 540 p.
- [7] DOERPER S.; 2008; Modification de la synthèse des furo-Coumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique; Thèse de Nancy –Université, INRA; p: 12 -34
- [8] MIOULANE P.; 2004; Encyclopédie Universelle des 15000 plantes et fleurs de jardins; Larousse; Ed: PROTEA; p: 7-50
- [9] DODT K. C.; 1996; The Essential Oils Book (Creating Personal Blends For Mind and Body); Ed: STOREY BOOKS; p: 21 -52.
- [10] Fournier, P, 1948, le livre des plantes médicinales et vénéneuses en France .ED Paul lechevallier, tome III, paris p356-361
- [11] Rubin,M , 1988, que sais, je ? Phytothérapie .Presses universitaire de France .1<sup>ère</sup>Ed .
- [12] .Solène Joualt., 2012- La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de lorraine.
- [13] J. Garnero., 2003-Les huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur, K345.
- [14] Forment M.,Roques H., 1941. Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie, Ed. OFALAC,59p.
- [15] Frontquer P., 1962. Plantes médicinales et discorides renovado, Ed Hebon S.A Barcelona, 426p.

- [16] Gravot, A, Etude de P450 impliqués dans la biosynthèse des furocoumarine chez *Ruta graveolens*. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de lorraine (INPL). 2002.
- [17] Bourgaud, F., Allard, N., Gucken, A., et Forlot, P. (1989). Natural sources of furocoumarins (*psoralens*). Ed Paris, pp 219-230. 1989.
- [18] Bouderdara, N, Séparation et détermination de structures des métabolites secondaires de *Cachrys libanotis* L. Thèse de doctorat. Université MENTOURI de Constantine. 2013
- [19] Pathak M.A., Farrington D.J. and Fitzpatrick T.B. 1962. " The presently known distribution of furocoumarins (*psoralens*) in plants." *Journal of investigative Dermatology* 39: 225-299.
- [20] Bourgaud, F., Allard N., Guckert A. and Forlot P. (1989). Natural sources of furocoumarins (*psoralens*). *Psoralens: Past, Present and Future of Photochemoprotection and other biological activities*.
- [21] Durgand, J. Thèse de doctorat, 2015. contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines .
- [22] DOERPER S.; 2008; Modification de la synthèse des furo-Coumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique; Thèse de Nancy –Université, INRA; p: 16.
- [23] Djabou, N., "Sambucus nigra L., une plante de la pharmacopée traditionnelle du nord africaine", Thèse de magister en chimie organique appliquée, Faculté des Sciences - Département de Chimie, université Abou Bakr Belkaid - Tlemcen, (2006), 123p.
- [24] Kitamura, N., Kohtani, S. and Nakagaki, R. (2005) Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis. *J. Photochem. Photobiol. C*, 6, 168–185.
- [25] Sasaki, M., Meguro, F., Kumazawa, E., Fujita, H., Kakishima, H. and Sakata, T. (1988) Evidence for uptake of 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen by cellular nuclei. *Mutat. Res.*, 197, 51–58.
- [26] Parrish, J.A., Fitzpatrick, T.B., Tanenbaum, L. and Pathak, M.A. (1974) Photochemotherapy of Psoriasis with Oral Methoxsalen and Longwave Ultraviolet Light. *N. Engl. J. Med.*, 291, 1207–1211.
- [27] Pathak, M.A. and Fitzpatrick, T.B. (1992) The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J. Photochem. Photobiol. B*, 14, 3–22.

- [28]Gahalaut, P., Mishra, N., Soodan, P.S. and Rastogi, M.K. (2014) Effect of Oral PUVA on the Quality of Life in Indian Patients Having Chronic Plaque Psoriasis. *Dermatol. Res. Pract.*, 2014, 291586.
- [29]Sapam, R., Agrawal, S. and Dhali, T.K. (2012) Systemic PUVA vs. narrowband UVB in the treatment of vitiligo: a randomized controlled study. *Int. J. Dermatol.*, 51, 1107–1115.
- [30]Momtaz, K. and Fitzpatrick, T.B. (1998) The benefits and risks of long-term PUVA photochemotherapy. *Dermatol. Clin.*, 16, 227–234.
- [31]Edelson R. 1988. Les médicaments photoactivés. *Pour la Science* 132: 64-72.
- [32]Malane MS, Gasparre FP. 1991. T cell molecular targets for psoralen. *Annals New York Academy of sciences*: 196-208.
- [33]. Girenavar, B., Cepeda, M.L., Soni, K.A., Vikram, A., Jesudhasan, P., Jayaprakasha, G.K., Pillai, S.D., and Patil, B.S. (2008b). Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 125, 204-208.
- [34]. Sardari, S., Mori, Y., Horita, K., Micetich, R.G., Nishibe, S., and Daneshtalab, M. (1999). Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 7, 1933-1940.
- [35]R. Brehme, D. Enders, R. Fernandez, J. M. Lassaletta, *Eur. J. Org. Chem.* 2007, 5629.
- [36]R. Lazny, A. Nodzevska, *Chem. Rev.* 2010, 110, 1386.
- [37]G. Verma, A. Marella, M. Shaquiquzzaman, M. Akhtar, M. R. Ali, M. M. Alam, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2014, 6, 69. b) V. J. Negi, A. K. Sharma, J. S. Negi, V. Ram, *Int. J. Pharm. Chem.* 2012, 4, 100.
- [38] (a) J. B. Conant, P.D. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.*, 1932, 54, 2881-2899. (b) F.H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, 56, 1962-1965. (c) E.G.R. Ardagh, F.C. Rutherford, *J. Am. Chem. Soc.*, 1935, 57, 1085-1088.
- [39] E.H. Cordes, W.P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, 2843-2848.
- [40] Broadasky T. F., Lewis C., Eble T.E., 1976. Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr.*, 123, 33-44.

[41] M. Jacob, J. Pellecier, R. Tomei, 1979. ; «Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique". *Rivista Italiana E.P.P.O.S.*, 11: 26-30.

[42] Pharmacopée européenne., 2002. Direction de la qualité du médicament, Council of Europe, 2623p.

[43] C. Mutai., C. Vafias., D. Abatis., V. Roussis., 2009. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extract and lupine triterpenes, *Journal of Ethnopharmacology*, 10, 1016-1050.

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ATB** : Antibiotique.

**ATCC**: American Type Culture Collection.

**ATF**: Antifongique.

**CCM** : Chromatographie sur couche mince.

**DMSO**: Diméthylsulfoxyde.

**EP** : Ether de pétrole.

**EM** : extrait méthanolique.

**G<sup>+</sup>**: gram (+).

**G<sup>-</sup>**: gram (-).

**GC**: Chromatographie gazeuse.

**GNO** : Gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire.

**Hcl** : acide chlorhydrique.

**HPLC** : Chromatographie liquide haute performance.

**FTIR** : Infrarouge à transformée de fourier.

**LT** : Lymphocytes T.

**M** : Masse molaire.

**MeOH** : Méthanol.

**mg** : milligramme.

**MH** : Muller Hinton.

**mm** : millimètre.

**HM** : Hammame melouane.

**HMM** : Hammame melouane modifiée.

**pH** : potentiel hydrogène.

**P-UVA thérapie** : psoréline ultra violet thérapie.

**UV** : Ultra-Violet.

**UVA** : Ultra-Violet 400-320 nm.

**UVB** : Ultra-Violet 320-280 nm.

**USDA** : United States Département of Agriculture.

**SM** : Sétif méthanol.

**SMM** : Sétif méthanol modifiée.

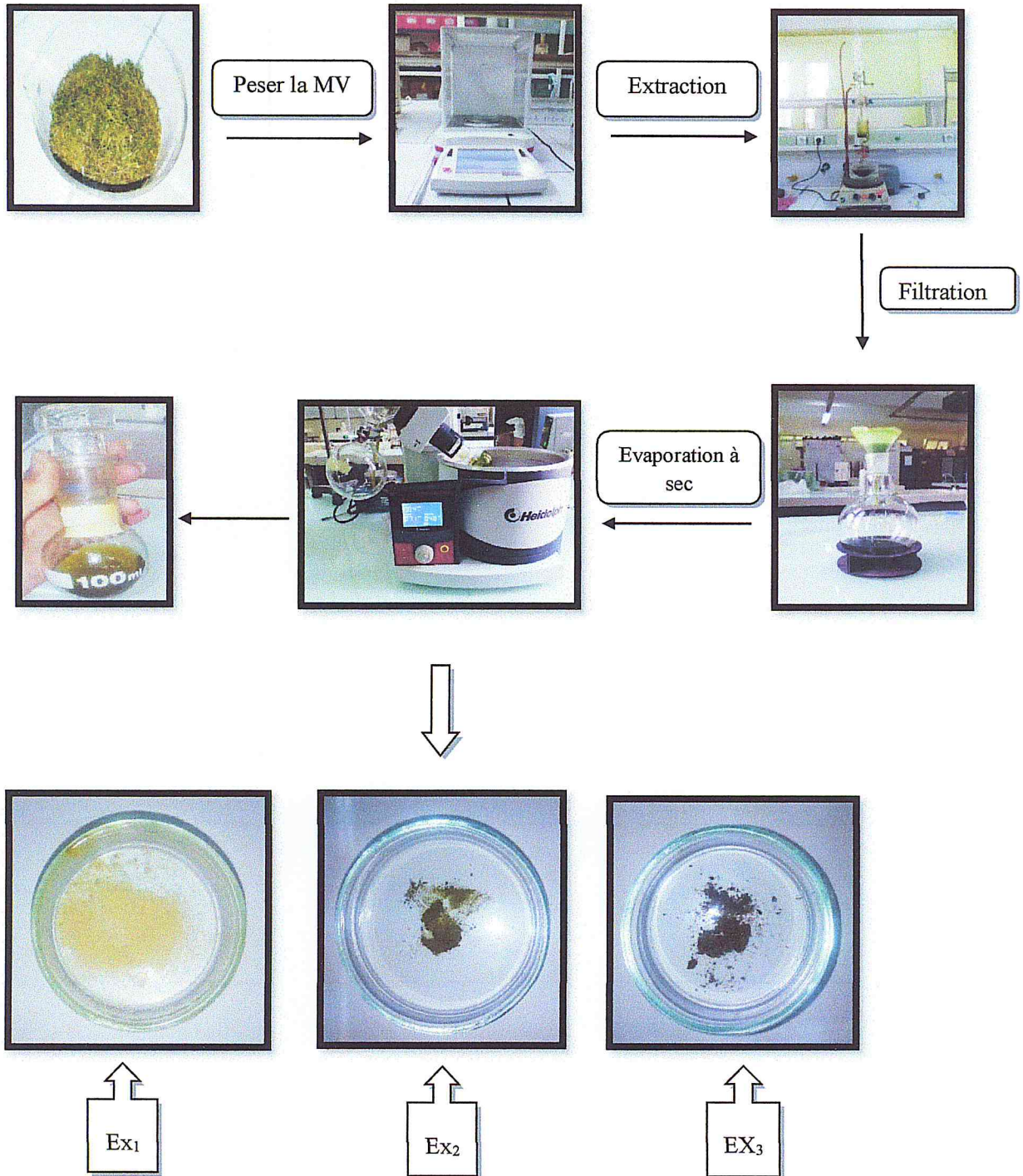
**Rf** : Rapport frontal.



# ***Annexes***

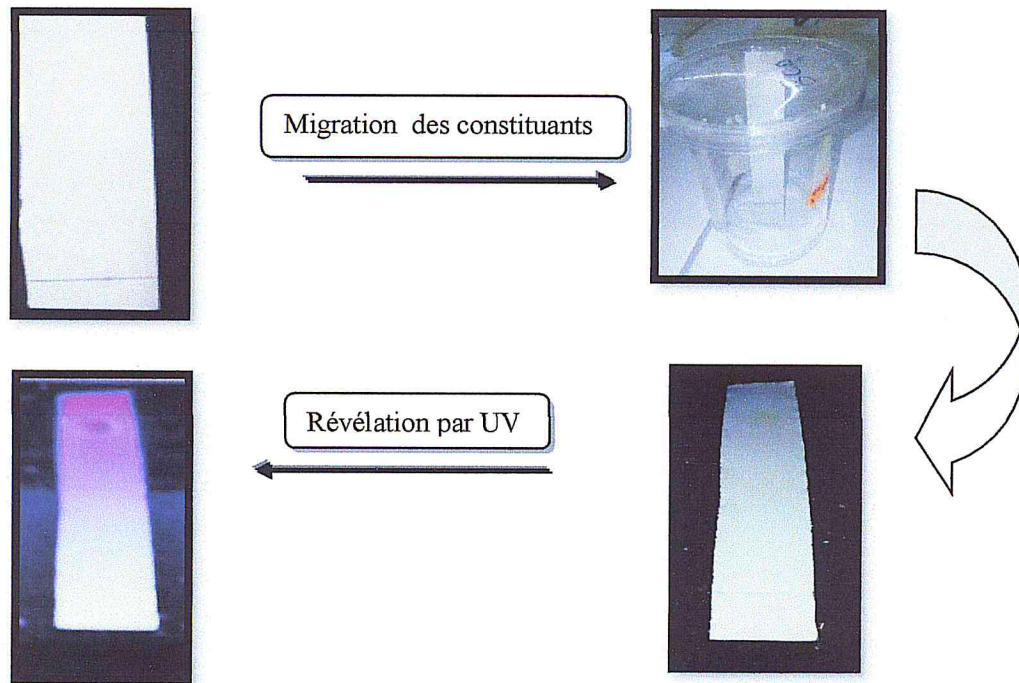
# Annexes

## 1- Protocole d'extraction des extraits

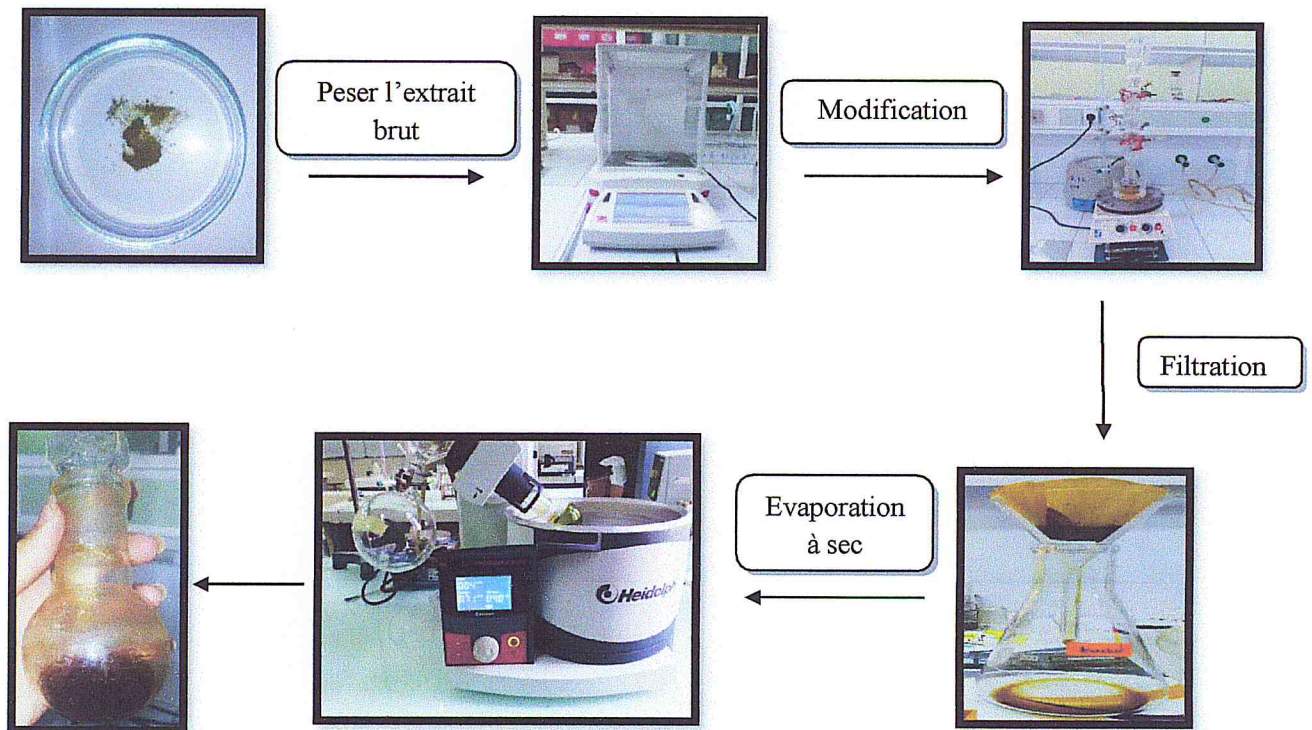


Ex<sub>1</sub> : Extrait de Xanthotoxine.  
Ex<sub>2</sub> : Extrait de bergaptène.  
Ex<sub>3</sub> : Extrait de Sétif.

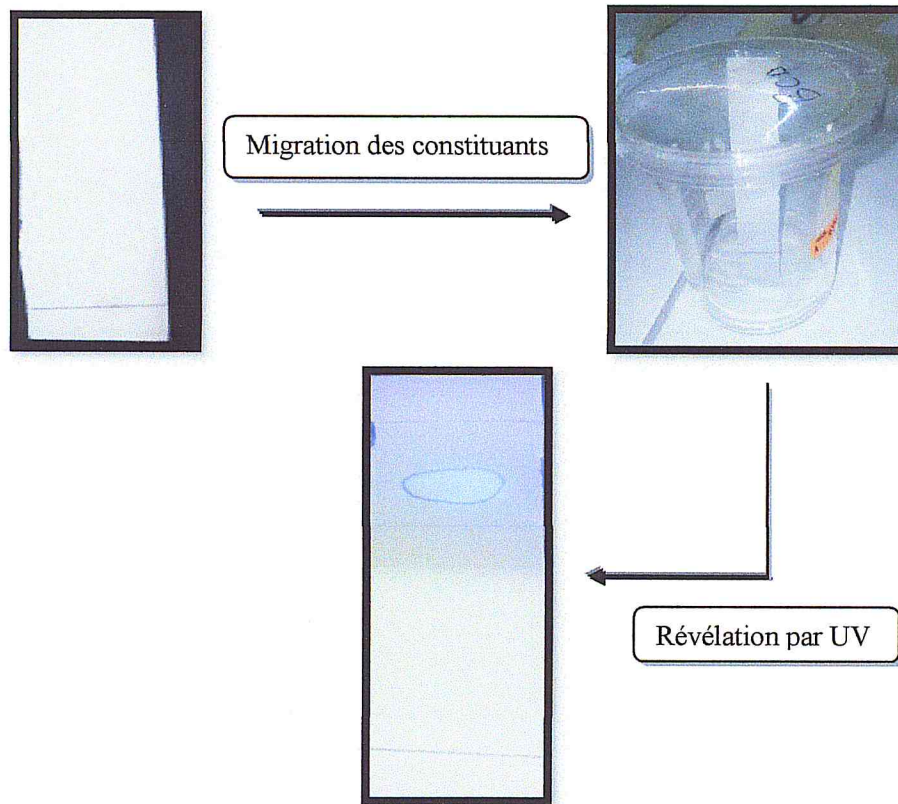
## 2- Analyse des extraits par CCM



## 3- Protocol de modification

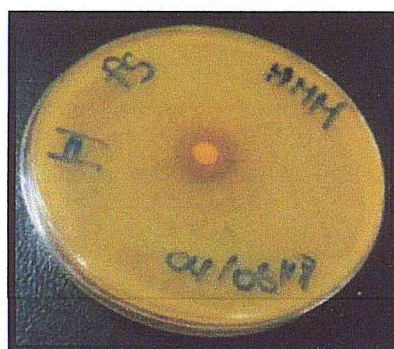
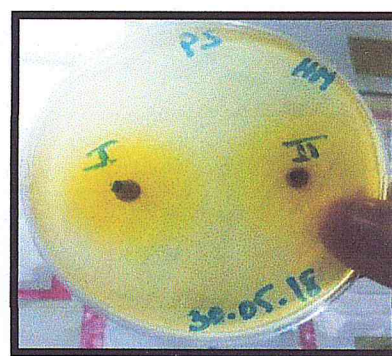
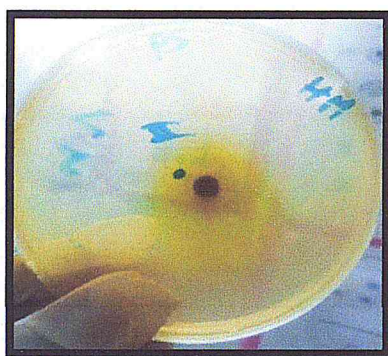


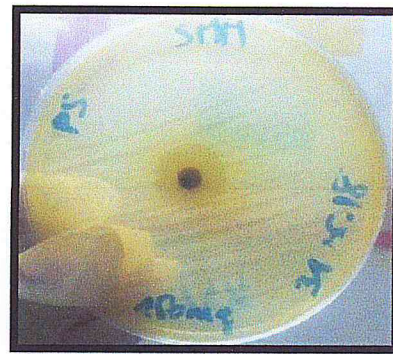
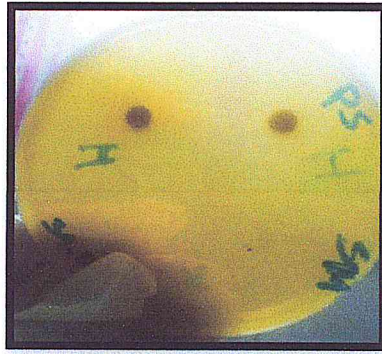
#### 4- Analyse des produits modifiés par CCM



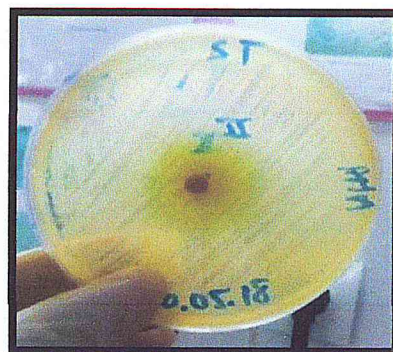
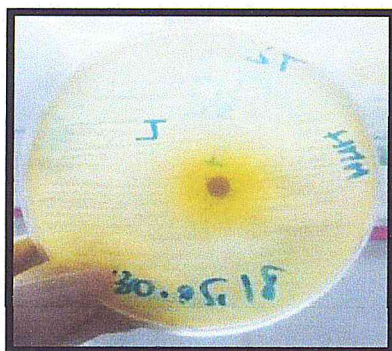
#### 5- Résultats de l'activité antimicrobienne

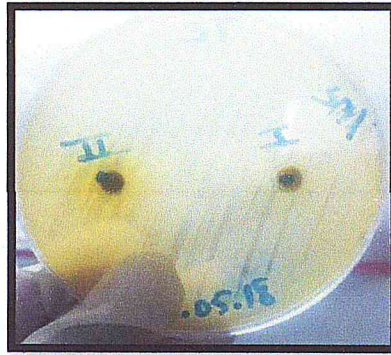
La souche *Pseudomonas aeruginosa*



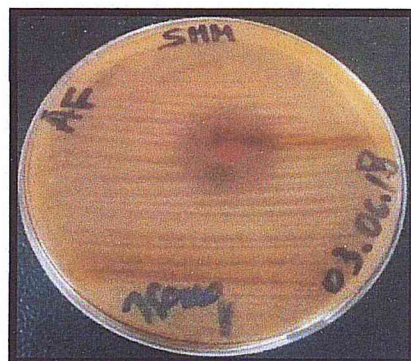
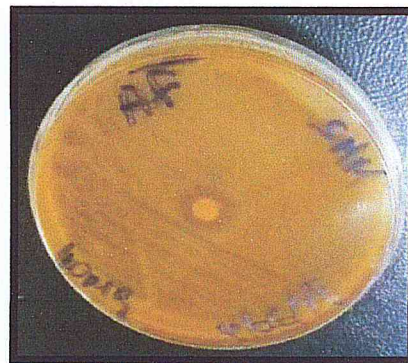
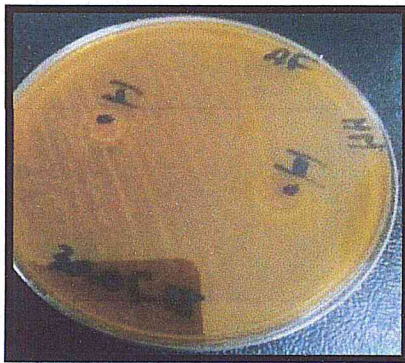


La souche *Staphylococcus aureus*

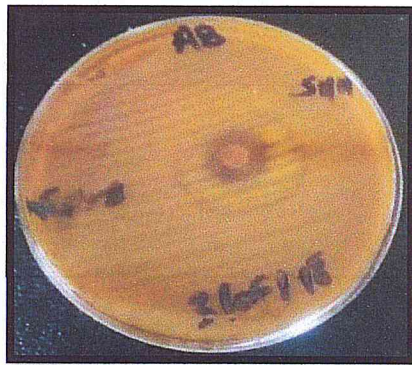
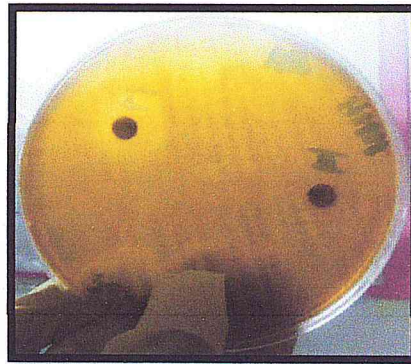
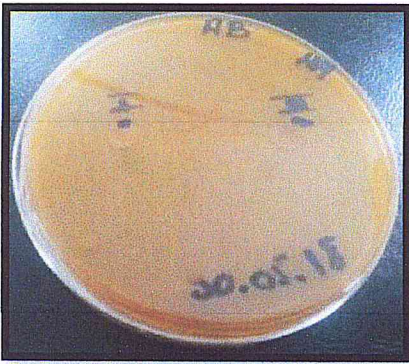




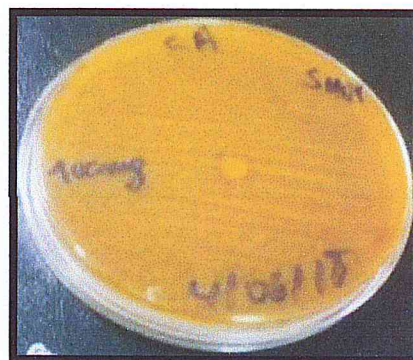
**La souche *Aspergillus flavus***



**La souche Aspergillus Braziliens**



**La souche Candidat albicans**



La souche *Aspergillus Nigéria*

