

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Saad Dahlab de Blida**

**Faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques**

**Département d'Agronomie**

**Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de**  
**Master 2 en Science du la Nature**

**Option : Phytopharmacie Appliquée**

**L'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits et des huiles**  
**essentielles de *Ruta Montana* L. de différents régions**  
**(Batna, Blida et Bejaia) et influence des surfactants**

**Présenté par : Belhadi Sarah**

**Devant le jury composé de :**

|                                   |                     |       |                      |
|-----------------------------------|---------------------|-------|----------------------|
| <b>M<sup>r</sup> Ramdane S.</b>   | Maître assistant A  | USDB  | <b>Président</b>     |
| <b>M<sup>me</sup> Djennes K.</b>  | Maître assistante A | USDB  | <b>Examinatrice</b>  |
| <b>M<sup>me</sup> Yahia N.</b>    | Maître assistante A | USDB  | <b>Examinatrice</b>  |
| <b>M<sup>r</sup> Aït Yahia A.</b> | Maître assistant A  | USDB  | <b>Promoteur</b>     |
| <b>M<sup>me</sup> Hamza K.</b>    | Maître assistante A | E.N.S | <b>Co-promotrice</b> |

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2012/2013**

# Remerciements

*Nous remercions tout d'abord le bon Dieu qui nous a donné le courage, la volonté et la santé afin d'accomplir notre travail.*

*Nous tenons à exprimé nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice M<sup>er</sup> Ait Yahiaï A Maitre assistante à l'USDB et co-promotrice M<sup>me</sup> Hamza K, Maitre assistante à L'ENS de Kouba qui a bien voulu nous consacrer tout son temps pour nous transmettre son savoir avec une*

*bonne*  
*volonté. Que Dieu la protège .*

*Nous exprimons notre profonde gratitude à M<sup>R</sup> Ramdane S. Maitre assistant à l'USDB d'avoir fait l'honneur de présider les jury examinateurs ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent à*

*M<sup>me</sup> Yahia N. Maitre assistant à l'USDB*

*Et à M<sup>me</sup> Djennes K, Maitre assistante à l'USDB*

*d'avoir accepté d'examiner notre mémoire.*

*Nous tenons à remercier vivement à toute l'équipe du laboratoire de la recherche l'ENS de Kouba et l'hôpital de Boufariq pour leur l'aide pratique.*

*Nous tenons à témoigner toutes nos connaissances à l'ensemble des enseignants du département d'Agronomie, pour leurs conseils et leurs aides qu'ils nous ont procuré durant tout notre cursus et qu'ils soient vivement remerciés .*

*Enfin nos remerciements vont à tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin à fin de réaliser ce travail.*

# DEDICACES

*Je dédie ce modeste travail en témoignage de mes gratitude et mes profonds remerciement à :*

*Ce lui qui m'a soutenu et suivi dans mes études, qui m'a guidé vers la réussite, qui a sacrifié toute sa vie pour le bonheur, à mon père.*

*Ma très chers mère, pour son aide, son amour, sa compréhension et surtout pour ses encouragements.*

*Mes frères Abd El madjed, mouhamade , Ali et ma sœurs Azhar.*

*Tous mes oncles, mes tantes.*

*Tous les étudiants de ma promotion « 2012-2013 » je la souhaite une vie pleine de joie, de bonheur et de réussite.*

*A mes amies chacun par son nom surtout : Ferhat, Amina, Djahida, khaoula, HAdjer, Hanane ,Nassima et Amina Agro.*

*Tout ceux qui m'aiment et que j'aimes, a tous qui mon aidé de prés ou de loin.*

*Sarah*

# RESUME

## Résumé

Ce travail a porté sur l'extraction des huiles essentielles de *Ruta montana* L. récoltée de trois régions différentes Blida, Bejaïa et Batna par hydrodistillation type clevenger. On nous nous comparer entre les rendements, compositions chimiques, ainsi que leur activités antimicrobiennes et antioxydants.

D'autre part, une autre série d'hydrodistillation type clevenger de la même espèce provenant de la région de Batna en présence des tensioactifs cationiques et non anioniques. Nous a permis d'identifier l'influence de ces agents surfactants selon leurs nature ioniques sur les rendements, compositions chimiques, et même leur activités antimicrobiennes.

**Mots clés :** *Ruta montana* L., Huile essentielle, Tensioactifs, hydrodistillation (type clevenger).

**المخلص:** يتضمن هذا العمل استخلاص الزيوت الأساسية من نبتة فيجلة الجبل المقطفة من البلدية , بجاية و باتنة بطريقة التقطير المائي(نوع clevenger) و ذلك بهدف مقارنة الإنتاجية , التركيب الكيميائي و دراسة النشاط ضد المكروبات .من جهة أخرى سلسلة من عملية التقطير المائي (نوع clevenger) من نفس النبتة الصادرة من منطقة باتنة باستعمال المادة الفعالة مع تبيان تأثير هذه المادة على الإنتاجية , التركيب الكيميائي و النشاط ضد المكروبات النشاط ضد التأكسد .

**المصطلحات:** نبتة فيجلة الجبل , الزيوت الأساسية , المادة الفعالة , التقطير المائي(نوع clevenger).

## Abstract

This work focuses on the extraction type clevenger of *Ruta montana* L. coming from the two regions Blida, Bejaïa and Batna. To do the comparison between the output, the chemical composition, and the antimicrobiennes.

For the second part, the series of distillation type clevenger to the same spice coming from Batna in the presence of surfactants agents identified the output, chemical composition, and antimicrobiennes.

**Keywords :** *Ruta montana* L., essential oil, surfactants agents, distillation( type clevenger).

# RESUME

L'objectif de notre travail est l'étude de l'activité biologique (antimicrobienne et antioxydante) des huiles essentielles des feuilles de *Ruta montana* L. de différentes régions Blida, Batna et Bejaia et celles de la région de Batna extraites en présence de tensioactifs. Ces huiles sont extraites par hydrodistillation type cleverger, leur composition chimique est déterminée grâce à l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.

D'autre part, des extraits phénoliques des feuilles de *Ruta montana* L. de différentes régions étudiées ont été extraits par soxhlet. Les teneurs en polyphénols totaux des extraits de Blida, Batna et Bejaia sont respectivement : 0,9mg/g et 0,19mg/g. La teneur en tanins est de 42,55 ; 47,48 ; 15.61 mg EAT/g d'extrait sec respectivement.

L'activité antioxydante testée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH a montré que les extraits et les huiles essentielles des trois régions présentent une activité antioxydante. Cette activité est plus importante dans le cas des extraits par rapport aux huiles essentielles. Les huiles des différentes régions présentent des activités variées malgré la ressemblance dans la composition chimique où on remarque la prédominance des cétones. La nature de tensioactif rajouté lors de l'extraction a son effet sur l'activité antioxydante.

L'activité antimicrobienne des huiles varie d'une souche à une autre. Les extraits et huiles essentielles des trois plantes étudiées présentent des valeurs de CMI qui varie selon la région et la nature du tensioactif rajouté.

**Mots clés :** *Ruta montana* L., huile essentielle, extrait, CG/SM, activité antioxydante, activité antimicrobienne.

# SOMMAIRE

## **INTRODUCTION.**

## **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.**

|  |           |
|--|-----------|
| Introduction .....                                       | 1         |
| I. 1. Le genre Ruta .....                                | 2         |
| I. 2. Introduction.....                                  | 2         |
| I. 3. Classification botanique .....                     | 2         |
| I.4.Distribution et habitat.....                         | 2         |
| I.5.Description botanique .....                          | 2         |
| I.6.Utilisations principales.....                        | 2         |
| I.6.1. En médecine traditionnelle.....                   | 2         |
| I.6.2.En agroalimentaire.....                            | 3         |
| I.6.3. Autres emplois.....                               | 3         |
| I.7. Données toxicologiques sur le genre Ruta.....       | 3         |
| <b>II.LES HUILES ESSENTIELLES .....</b>                  | <b>8</b>  |
| II .1. Définition.....                                   | 8         |
| II.2. Localisation .....                                 | 9         |
| II .3. Rôles dans la plante.....                         | 9         |
| II.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles..... | 9         |
| II.4.1. Distillation.....                                | 9         |
| II. 4.1.1. Hydrodistillation.....                        | 10        |
| II.4.1.2. Distillation à la vapeur d'eau.....            | 10        |
| II. 4.1.3. Distillation mixte.....                       | 11        |
| II. 4.2. Extractions par solvants.....                   | 11        |
| II.4.3. Expression à froid.....                          | 11        |
| II. 5. Les propriétés des huiles essentielles.....       | 12        |
| II.5.1. Propriété physique.....                          | 12        |
| II. 5.2. Propriété chimique.....                         | 12        |
| II. 6. Composition chimique.....                         | 13        |
| II.7. Utilisation.....                                   | 14        |
| <b>III. POLYPHENOLS.....</b>                             | <b>15</b> |
| III.1. Généralité .....                                  | 15        |
| IV.2. Classification des polyphénols.....                | 15        |
| III.2.1. Polyphénols simples.....                        | 15        |
| III.2.1.1. Phénols.....                                  | 15        |
| III.2.1.2. Flavonoïdes.....                              | 15        |
| III.2.2. Les tanins.....                                 | 15        |
| III.3. Localisation dans la plante.....                  | 15        |
| III.4. Méthodes d'extraction des polyphénols.....        | 16        |
| III.4.1. Extraction par les solvants ou macération.....  |           |
| III.4.2. Extraction par chromatographie sur colonne..... |           |
| III.4.3. Extraction supercritique.....                   |           |

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Objectif du travail</b> .....                               |           |
| <b>Lieux d'expérimentation</b> .....                           |           |
| <b>I. MATÉRIEL</b> .....                                       | <b>17</b> |
| I .1. Matériel biologique.....                                 | <b>17</b> |
| I.1.1. Matériel végétal.....                                   | <b>17</b> |
| I .1.2. Microorganismes.....                                   | <b>17</b> |
| I.2. Matériel non biologique.....                              |           |
| <b>II : MÉTHODES</b> .....                                     | <b>18</b> |
| II .1. Extraction de l'huile essentielle.....                  | <b>18</b> |
| II .1.1. Extraction par hydrodistillation type cleverger ..... | <b>18</b> |
| II. 2. Extraction des polyphénols par soxhlet .....            | <b>19</b> |
| II.3. caractéristiques organoleptiques.....                    | <b>20</b> |
| II .4. Rendement en huile essentielle.....                     | <b>20</b> |
| II .5. Identification de l'huile essentielle par CG/SM.....    | <b>21</b> |
| II.6. Dosage des composés phénoliques.....                     |           |
| II.6.1. Dosage des phénols totaux .....                        |           |
| II.6.2. Dosage des tanins.....                                 |           |
| II.7. Étude du pouvoir antioxydant.....                        |           |
| II .8. Etude du pouvoir antimicrobien.....                     | <b>27</b> |

## **RESULTATS ET DISCUSSION.**

|  |           |
|--|-----------|
| III.1. Caractéristiques organoleptiques.....   | <b>29</b> |
| III.2. Rendement en huile essentielle.....   | <b>29</b> |
| III.3. Identification des principaux composants des huiles essentielles par CG/SM..... | <b>31</b> |
| III.4. Dosage des composés phénoliques.....  |           |
| III.4.1. Dosage des phénols totaux.....  |           |
| III.4.2. Dosage des tanins.....  |           |
| III.5. Activité antioxydantes.....   |           |
| III.6. Etude du pouvoir antimicrobien.....   | <b>39</b> |
| III.6.1. Activité antibactérienne.....   | <b>39</b> |
| III.6.2. Activité antifongiques.....   | <b>42</b> |

## **CONCLUSION.**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.**

## **ANNEXES.**

# INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, les hommes ont su développer les extraordinaires vertus médicinales que recèlent les plantes, dont la connaissance et l'utilisation thérapeutique basée sur l'analyse et l'observation s'appelle la phytothérapie (**Dellile, 2007**).

Les huiles essentielles de nombreuses plantes sont devenues populaires ces dernières années et leurs principes bioactifs ont conquis récemment plusieurs domaines (**El Ajjouri et al., 2008**). Elles sont utilisées en médecine alternative depuis très longtemps pour leurs propriétés antimicrobiennes et notamment antifongiques (**Giordani et Kaloustian, 2006**).

La famille des Rutacées a été décrite initialement en 1782 par Durande, certains auteurs tels que, **Guignard (2001)**, place les Rutacées dans la classe des Dicotylédones, à la sous classe des Dialypétales, la série des discs flores, ordre des Spindales (Rutales). Les représentants de cette famille répartis en 150 genres (**Bruneton, 1999**). Comprenant peut être 1500 espèces de répartition cosmopolite (**Botineau, 2010**).

Beaucoup espèces des Rutacées sont utilisées dans différents domaines : en pharmacie, dans les industries agro-alimentaires telles que diverses espèces du genre citrus. Leurs flavonoïdes sont principalement utilisés pour améliorer l'insuffisance veinolymphatique, leurs huiles essentielles sont utilisées surtout en parfumerie

Dans ce travail nous sommes intéressés au un essences forestières à savoirs *Ruta montana* L.

Le but de cette étude était de rechercher d'éventuels principes bioactifs. Après extraction des huiles essentielles et les extraits. Nous avons procédé à :

-L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation type clevenger modifie de l'espèce *Ruta montana* L. provenant des trois différentes régions (Blida, Bejaia et Batna). Pour évaluer les rendements, la composition chimique, le pouvoir antioxydant et l'activité antimicrobiennes.

-L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation type clevenger modifie de *Ruta montana* L. provenant de la région de Batna en présence des agents surfactants anioniques et non ioniques. Pour vérifier l'utilisation de ces agents sur l'extraction des huiles essentielles.

-Identification des principaux composants chimiques des l'huiles essentielles.

-Dosage des polyphénols.

-Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne.

## Liste des Tableaux

**Tableau 1-a:** Souches bactériennes utilisées dans le screening antimicrobien

**Tableau 1-b :** Souches fongiques utilisées dans le screening antimicrobien

**Tableau 2 :** Les caractéristiques chimiques des tensioactifs utilisés

**Tableau 3 :** Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle feuilles de *Ruta montana* L.

**Tableau 4:** Rendements des huiles essentielles en pourcentage (%) obtenus l'hydrodistillation de *Ruta montana* L.

**Tableau 5:** Identification des principaux composants chimiques de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Ruta montana* L. région de Bejaia, Blida et Batna

**Tableau 6 :** Comparaison entre les teneurs en (%) majoritaires d'une HE de *Ruta montana* L

**Tableau 7 :** Comparaison des classes chimiques présentes dans les huiles essentielle de l'espèce étudiée provenant des régions différentes.

**Tableau 8 :** La teneur en phénols totaux de l'extrait de *Ruta montana* L. provenant des trois régions étudiées.

**Tableau 9:** les teneurs en tanins des extraits étudiées

**Tableau 10:** Le pouvoir de piégeage du radical DPPH par l'huile essentielle de *Ruta montana* L. de la Région de Batna, Bida et Bejaia

**Tableau 11:** Le pouvoir de piégeage du radical DPPH d'extrait de *Ruta montana* L. provenant des trois régions étudiées

**Tableau 12:** Concentration minimale d'inhibitrice (CIM) des différentes souches Bactérienne testées, en extraits et des huiles essentielles des feuilles de *Ruta montana* L.

**Tableau 13:** Concentration minimale inhibitrice (CIM) des différentes souches des levures testées, en extrait et des huiles essentielles des feuilles de *Ruta montana* L.

**Tableau 14 :** Rendement en huile essentielle de *Ruta montana* L. provenant de la région de Batna en présence et en absence des tensioactifs.

**Tableau 15 :** Composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce étudiée en présence et en absence de tensioactifs.

**Tableau 16 :** Comparaison des différentes classes chimiques présentes dans l'huile essentielle de *Ruta montana* de la région de Batna en présence et en absence des tensioactifs.

**Tableau 17 :** variation des pourcentages des composés majoritaires des huiles essentielle de *Ruta montana* extraites en présence et en absence de tensioactifs.

**Tableau 18 :** Travaux antérieurs sur l'extraction des huiles essentielles en utilisant des Tensioactifs

**Tableau 19:** Le pouvoir de piégeage du radical DPPH par l'huile essentielle de *Ruta montana* L. de la Région de Batna en présence et en absence des tensioactifs.

**Tableau 20 :** Concentration minimale inhibitrice CIM des différentes souches fongiques testées par les huiles essentielles de *Ruta montana* L. en présence et en absence de tensioactif.

## Liste des Figures

**Figure 1:** La plante *Ruta montana* L. (Original)

**Figure 2 :** Dispositif expérimental de l'hydrodistillation

**Figure 3:** Dispositif expérimental d'extraction par entraînement à la vapeur

**Figure 4 :** Montage d'hydrodistillation type clevenger modifiée (Originale).

**Figure 5 :** montage de soxhlet

**Figure 6:** Solution méthanolique d'extrait végétale.

**Figure 7:** Forme libre et forme réduite du DPPH

**Figure 8 :** Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Ruta montana* L. de la région de Bejaia.

**Figure 9 :** Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Ruta montana* L. de la région de Blida.

**Figure 10 :** Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Ruta montana* L. de la région de Batna.

**Figure 11 :** Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

**Figure 12 :** Courbe d'étalonnage d'acide tannique pour le dosage des tanins.

**Figure 13 :** Histogramme comparatif entre les phénols totaux et tanins.

**Figure 14 :** Histogramme comparatif du piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles testées

**Figure 15 :** Histogramme comparatif du piégeage du radical DPPH par les extraits testés.

**Figure 16 :** Effet de l'extrait des feuilles de *Ruta Montana* L. de Bejaia à différentes concentrations sur le développement des souches bactériennes.

**Figure 17 :** Effet l'extrait des feuilles de *Ruta Montana* L. de Batna à différentes concentrations sur le développement des souches antifongique.

**Figure 18:** Effet l'huile essentielle des feuilles de *Ruta Montana* L. région de Batna à différentes concentrations sur le développement des souches antifongique.

**Figure 19 :** Effet l'huile essentielle des feuilles de *Ruta Montana* L. région de Blida à différentes concentrations sur le développement des souches antifongique.

**Figure 20:** Histogramme des différents rendements en huile essentielle de *Ruta montana* L. en présence et en absence des tensioactifs.

**Figure 21 :** schéma de mécanisme d'intervention des tensioactifs dans l'extraction des huiles essentielles.

**Figure 21:** Interactions tensioactif – bicouche lipidique et formation des micelles

**Figure 22 :** Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Ruta montana* L. de la région de Batna en présence de tensioactifs anionique (SDS).

**Figure 23:** Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Ruta montana* L. de la région de Batna en présence de tensioactif cationique (CTAB).

**Figure 24 :** Histogramme de la variation des pourcentages des composés majoritaires des huiles essentielles de *Ruta montana* L. extraies en présence et en absence de tensioactifs.

**Figure 25 :** Histogramme du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de *Ruta montana* L. de Batna en absence et en présence des tensioactifs.

**Figure 26 :** Effet l'huile essentielle des feuilles de *Ruta Montana* L. région de Batna en présence SDS à différentes concentrations sur le développement des souches antifongique.

**Figure 27 :** Effet l'huile essentielle des feuilles de *Ruta Montana* L. région de Batna en présence CTAB à différentes concentrations sur le développement des souches antifongique.

## Liste des abréviations

- **AFNOR** : Association Française de Normalisation
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **CG/MS** : Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
- **CPG** : Chromatographie en phase Gazeuse
- $d_t^t$  : Densité
- **HE** : Huile essentielle
- **Kg** : Kilogramme
- **MHE** : Masse de l'huile essentielle
- **mn** : Minute
- **pH** : potentiel d'hydrogène
- **Rd THE** : Rendement cumulé en huile essentielle
- **SM** : spectrométrie de Masse
- **MH** : Mueller Hinton
- **Sab** : Milieu Sabouraux
- **DPPH** : 2,2 – Diphényl- 1-picrylhydrazyl

L'utilisation des plantes aromatiques et médicinales est associée à l'évolution des civilisations. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, dans la composition des parfums et dans les préparations culinaires. Certaines de ces plantes sont cultivées et d'autres sont spontanées.

Le genre *Ruta* appartient à la famille des Rutacées (**Guignard, 2001**). Ce genre a été découvert par C. Vonlinné. Le *Ruta* est aussi connu par son nom grec «Ρύτη», qui coule allusion à ses vertus emménagogues (**François, 2000**). Les synonymes recensés sont : Rue fétide, Rue puante, piganion, herbe de la grâce (**Clevely et al. 1997**).

L'intérêt suscité de l'étude phytochimique du genre « *Ruta* » revêt plusieurs aspects :

- Un aspect pharmacologique : à cause de la présence d'une substance « rutine » : rutoside ou quercétine 3-rhamnoglycoside. Selon Weiss, ce principe (1%) peut être utilisé en même titre que le marron d'Inde dans l'insuffisance veineuse (**Guy, 1967**).
- Un aspect thérapeutique : en raison de l'utilisation de différentes espèces en médecine traditionnelle.
- Un aspect chimique : en raison de la présence de nombreux alcaloïdes, flavonoïdes, les coumarines, les saponines, les lignines et les tritèrènes (**Belkacem et al. 2011**)
- Aspect aromatisant : en raison de la présence d'une huile essentielle

### **I.1.1. Classification botanique**

*Ruta montana* L. est une espèce typiquement méditerranéenne. La taxonomie retenue pour la *Ruta montana* est le suivant (**Guignard, 2001**).

**Règne** : Plantae  
**Embranchement** : Spermaphytes  
**Sous embranchement** : Angiospermes  
**Classe** : Dicotylédones  
**Sous classe** : Dialypetales  
**Série** : Disciflores  
**S. série** : Diplostemones  
**Ordre** : Spindales (Rutales)  
**Famille** Rutacées  
**Sous famille** : Rutiodées  
**Genre** : *Ruta*  
**Espèce** : *Ruta montana*.

### I.1.2. Distribution et habitat :

Deux espèces du genre *Ruta* sont représentées en Algérie et peuvent se trouver en Kabylie : *Ruta chalepensis* et *Ruta montana* L.

***Ruta montana*** : espèce présente du Maghreb. En Algérie elle est souvent dénommée Aourmi ou fidjela el jbel, elle est connue dans les montagnes de l'intérieur du pays jusqu'à l'Atlas saharien (Ait Youssef, 2006). Elle s'est rencontrée dans le Sud d'Europe (Teusher et al, 2005). Ouest de l'Asie et l'Afrique du Nord ainsi que le Nord d'Algérie (Quezel et Santa, 1963).

### I.1.3. Description botanique :

Il s'agit d'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, multiovulés, 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 (Durande, 1782). La plante est originaire de l'Europe méridionale et occidentale et de l'Afrique du sud (De Jussieu A.L).



**Figure 1:** La plante *Ruta montana* L. (Original, 2012)

#### **I.1.4.Utilisations principales**

Les usages de l'espèce *Rutamontana* dans l'ensemble des pays du Maghreb sont innombrables et fréquent.

##### **I.1.4.1. En médecine traditionnelle**

En Afrique et dans d'autres continents, cette plante, entrent dans la composition de plusieurs préparations médicamenteuses utilisées en médecine traditionnelle. En générale, les différentes parties de la plantes sont utilisées fréquemment à raison de ses propriétés emménagogues, abortives, antispasmodiques, analgiques et antiparasitaires (**Ait Youssef, 2006**).

##### **I.1.4.2.En agroalimentaire**

Les feuilles de la Rue dégagent une odeur forte et pénétrante que certains jugent désagréable. La Rue est pourtant un herbe condimentaire intéressante, que les anciens prisait beaucoup, elle entrait dans la composition du Moretum (condiment qui aromatisait de nombreux plats, voir le vin).

En quantité modérée ; les feuilles sont très bonnes dans les salades (**Couplan, 1985**). Les feuilles ou les jeunes rameaux hachés servent à aromatiser les salades, les sauces, les soupes, les légumes et les marinades ; aussi pour les légumes conservés dans du vinaigre, le beure aux herbes, les plats de viande (tout particulièrement d'agneau et de mouton, de volaille et de gibier), les farces aux herbes, les plats à base de poisson ou d'œufs, les légumes secs (pois, fèves) les pinards, les champignons et les fromages blancs.

En combinaison avec d'autres herbes aromatiques, ces feuilles peuvent également être tartinés, on peut les utilisés comme condiment pour cornichon ou pour aromatiser les tomates, elles constituent un ingrédient de la soupe à l'anguille, une spécialité de Homburg.

Dans la cuisine éthiopienne, la rue est aussi fréquemment rajoutée au café, au thé ou à toute autre boisson. (**Teuscher et al.2005**).

En liquoristerie les italiens utilisent l'huile essentielle de la rue pour aromatiser un vin nommé Grappa, elle aromatise aussi les alcools de type vermouth.

Les feuilles de la Rue étaient utilisées en les bouillées avec de mélasse pour la conserve, longtemps.

#### **I.1.4.3. Autres emplois**

Les rameaux en fruits servent à des fins décoratives par exemple : dans les bouquets secs, ou après dorure comme décoration de Noël.

#### **I.1.5. Données toxicologiques sur le genre *Ruta***

L'utilisation des sommités fleuries de l'espèce *Ruta chalepensis* et *Ruta montana* étaient considérées comme dangereuses en Algérie (**Ait Youssef, 2006**). Sa toxicité interne est liée surtout à la présence de méthyl-nonyl-cétone (**Ait Youssef, 2006**). Citant les travaux de CHARNOT (la toxicologie au Maroc, 1945), décrit ainsi l'intoxication par la Rue (*R.graveolens, R.montana, R.chalipensis*)

Dans la phase initiale : gastro-entérite (diarrhées aigues, associées ou non à des vomissements), vertige et début de trouble de conscience, tuméfaction de la langue, et salivation abondante. Une évolution fatale est possible, des cas d'empoisonnement mortels ont été décrits bien que rares (**Ait Youssef, 2006**). Cependant, en qualité d'épice, les feuilles de rue doivent être utilisées qu'en très infimes quantités et absolument évitées en cas de grossesse

La prise en usage interne à forte dose, la rue peut provoquer une inflammation des muqueuses (bouches, gorge, estomac, intestin grêle et l'utérus ...), un saignement de nez et des gencives, des douleurs articulaires (**Wolfgang et al. 2010**).

Toxicité externe : La présence des furanocoumarines donne un caractère photo toxique ou photosensibilisant, ce type peut avoir lieu après un simple contact avec la plante dans son environnement naturel (**Bruneton, 1993**).

En effet sur la peau, la « Rue » peut provoquer des éruptions cutanées et des inflammations avec formation des cloques, cette réaction de la peau au contact des espèces du genre « *Ruta* » étant liée à la présence de furocoumarines (**Ait Youssef, 2006**).

### I.2.1 Définition

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches et les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal. Elles sont odorantes et très volatiles (**Padrini et Lucheroni, 1996**).

L'association française de normalisation (**AFNOR**) définit une huile essentielle comme étant un produit obtenue à partir d'une matière végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus* ; soit par distillation à sec. L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques (**AFNOR, 2000**).

### I.2.2. Localisation

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, il y a environ 500.000 plantes sur terre, 10.000 d'entre elles, possèdent des propriétés médicinales (**Encyclopédie, 2001**).

Les huiles essentielles sont obtenues à partir d'un matériel végétal : fleurs, bourgeons, graines, feuilles, écorces, rhizomes, herbes, bois, fruits et racines. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. L'huile essentielle est alors stockée dans une cellule transformée en cellule à essence ou dans des poils glandulaires, des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs voir des papilles (**Teuscher et al., 2005**).

Toutes les parties des plantes aromatiques peuvent contenir de l'huile essentielle.

- les fleurs bien sur, exemples : oranger, rose, lavande ; le bouton floral (girofle) ou les bractées (ylang-ylang)
- les feuilles le plus souvent, exemples : eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, aiguilles de pin et sapin
- les organes souterrains, exemples : racines (vétiver), rhizomes (gingembre, acore)
- les fruits, exemples : fenouil, anis, épicarpe des Citrus
- les graines : noix de muscade, coriandre.
- le bois et les écorces, exemples : cannelle, santal, bois de rose.

Les huiles essentielles sont produites par diverses structures spécialement différenciées dont le nombre et les caractéristiques sont très variables.

- les poils sécréteurs épidermiques rencontrés souvent chez les Lamiacées, Géraniacées et Verbénacées. Ils produisent les essences dites superficielles.
- les organes sécréteurs sous-cutanés comprenant des cellules et des poches sécrétrices Qui sont généralement disséminées au sein du tissu végétal chez les *Myrtacée*, *Rutacées*, ainsi que des canaux sécréteurs chez les Apiacées.

La composition chimique d'une huile essentielle peut varier considérablement :

- dans une même plante selon les organes (feuille, fleur, fruit, bois)
- dans l'année selon la saison pour une même plante,
- selon les conditions de culture pour une même espèce végétale (ensoleillement, humidité, longueur du jour, fertilité du sol),
- selon les races chimiques (ou chemotypes) pour une même espèce (l'exemple classique est le thym avec 7 races chimiques).

### **I.2.3. Rôles dans la plante**

Le rôle des huiles essentielles n'a pas pu être clairement démontré en effet, on considère qu'il s'agit de produits de déchets du métabolisme. Toutefois, certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile essentielle pour **(Bernard, 1988)** :

- Protéger les parties durables des plantes contre les micro-organismes.
- Favoriser la pollinisation en attirant les insectes pollinisateurs.
- La considère comme une ressource énergétique, facilitant certaines réactions chimiques.
- D'après **Belaiche (1979)**, les HE conservent l'humidité nécessaire à la vie des plantes exposées à des climats désertiques.

### **I.2.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles**

Plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles sont utilisées, on citera la distillation Hydro- distillation, distillation à la vapeur d'eau, distillation mixte, extractions par solvants, expression à froid.

## 1. Distillation

Il est communément admis que la vapeur pénètre les tissus de la plante et vaporise toutes les substances volatiles. Dans l'industrie des HE une terminologie distingue trois types de distillations : distillation à l'eau ou hydrodistillation, distillation à la vapeur et distillation mixte (Nazli, 2003).

### 1.1. Hydrodistillation

C'est un procédé très ancien qui consiste à entraîner les matières odorantes volatiles par la vapeur d'eau à partir de fleurs, de feuilles, et même de racines broyées. L'ensemble est condensé dans un serpentin réfrigéré. On obtient de cette façon des huiles essentielles qui se séparent de l'eau. La plupart sont plus légères que l'eau et flottent à la surface où on les recueille à partir de récipients (Peyrefitte et Martini, 2008).

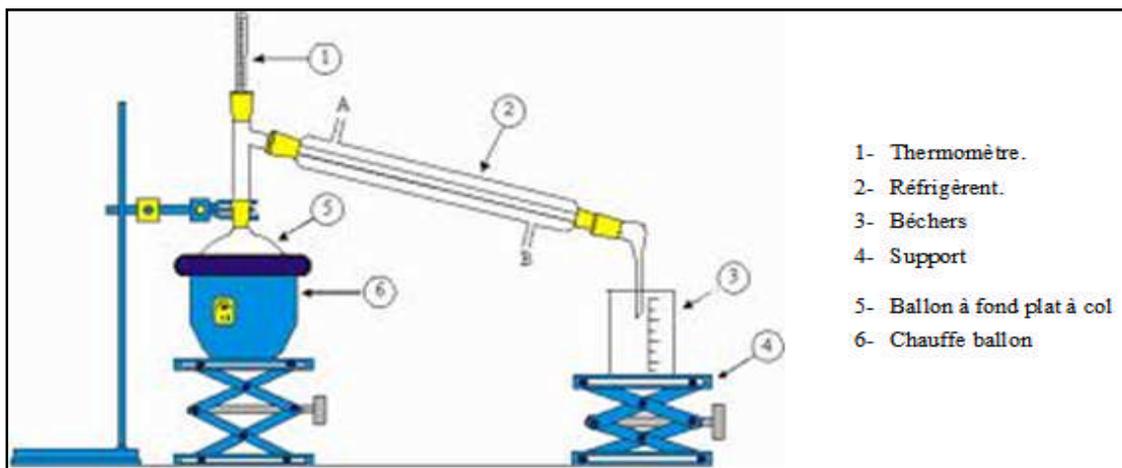
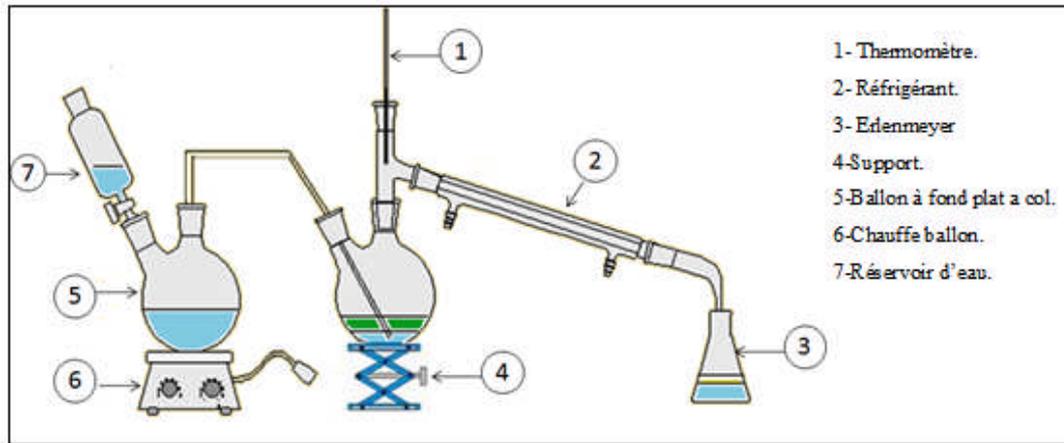


Figure 2 : Dispositif expérimental de l'hydrodistillation (De La Souchere et al., 2008)

### 1.2. Distillation à la vapeur d'eau

Les plantes entières, ou broyées lorsqu'il s'agit d'organes durs (racine, écorce), sont disposées dans un alambic traversé par un courant de vapeur d'eau. Sous l'effet de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur qui sous basse pression, traverse alors la cuve remplie de plantes aromatiques. La vapeur d'eau qui a volatilisé et entraîné l'huile essentielle, qui se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant. La distillation doit être complète pour que l'on récupère tous les constituants aromatiques de l'huile essentielle, ce qui implique souvent une durée relativement longue, variables selon les organes distillés (Roux et al., 2008).



**Figure 3:** Dispositif expérimental d'extraction par entraînement à la vapeur (**De La Souchere et al., 2008**)

#### I.2.4. 2 Distillation mixte

La distillation mixte est un processus couplant l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation. Au cours de l'extraction, la matière végétale baignant dans l'eau bouillante est traversée par un courant de vapeur d'eau, les divers phénomènes d'extraction se trouvent combinés. Il semble que ce procédé a pour principale avantage de diminuer les réactions secondaires subies par l'huile essentielle sous l'action de l'eau acide (**Guenther, 1972**).

#### I.2.4.3 Extractions par solvants

Elle consiste à dissoudre les principes aromatiques gras, les pigments, les cires et les résines de la plante fraîche dans un solvant volatil dont l'évaporation laisse un résidu cireux très coloré, très aromatique : la **concrète**. Cette dernière, purifiée par l'alcool absolu, donne l'**absolue**, qui n'est pas exactement une huile essentielle mais s'en rapproche beaucoup (**Duraffourd et Lapraz, 2002**).

#### I.2.4.4 Expression à froid

Elle constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin d'en libérer l'essence. Cette technique uniquement mécanique limite l'oxydation car elle conserve les antioxydants naturels

contenus dans la fraction non volatile de l'essence, le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence car il n'a subi aucune modification chimique (**Roux et al., 2008**).

## **I.2.5 Propriétés des huiles essentielles**

### **I.2.5.1 Propriétés physiques**

Les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques (**Bruneton, 1999**) :

- Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C.
- Leur densité et en générale inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0,75 à 0,99.
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée.
- A température ambiante, elles sont généralement liquides incolores ou jaune pâle, il existe cependant quelques exceptions, exemple huile essentielle à azulène de coloration bleue.

### **I.2.5.2 Propriétés chimiques**

Les huiles essentielles possèdent un certain nombre de propriétés chimiques parmi les quels (**Jacque et Paltz, 1999**).

- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, et peu solubles dans l'eau à laquelle, toute fois, elles communiquent leur odeur.
- Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et réduisent certains sels.
- Ce sont des parfums de conservation limitée.
- Sont très altérables et sensibles à l'oxydation.
- Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, très odorantes et volatiles.
- Elles sont des substances inflammables.

## **I.2.6 Compositions des huiles essentielles**

Chaque huile essentielle est très complexe, elle est constituée par un mélange de composants qualitativement définis pour une même espèce et quantitativement variables

suivent : le lieu de développement de la plante, de la période de la récolte, de la partie de la plante utilisée et aussi suivant les conditions climatiques, géographiques et agronomiques qu'elle rencontre. Certains travaux scientifiques ont contribué à mettre en évidence la composition des huiles essentielles, en général, chacune comporte un nombre important de composants tous ne sont pas encore identifiés (**Roquebert, 2002**).

Certains composants, appelés communément terpènes, dérivent de la formule générale  $(C_5H_8)_n$  (**Sarmi-Manchado et Cheynier, 2002**).

- n =1 hémiterpènes.
- n =2 Monoterpènes.
- n =3 sesquiterpènes.

Les terpènes peuvent être :

- A chaîne ouverte, exemple : farnésol, myrcène.
- Monocycliques, exemple : limonène, menthol.
- Bicycliques, exemple : pinène, caryophyllène.

D'autres composés peuvent être des hydrocarbures (**Roquebert, 2002**).

- De la série aliphatique :
  - ▲ Carbures : heptane, hexadécane.
  - ▲ Alcools primaires (méthyliques)
  - ▲ Alcools secondaires (méthylcarbinol)
  - ▲ Acides saturés (isobutyrique, isovalérianique)
- De la série aromatique :
  - ▲ Carbures (toluène, paracymène).
  - ▲ Phénols (thymol, carvacrol, apiol, eugénol).
  - ▲ Alcools (benzylique).
  - ▲ Aldéhydes (vanilline).
  - ▲ Acide (benzoïque).

### **I.2.7. Techniques d'analyses**

Depuis une vingtaine d'années, l'état de nos connaissances a fait un prodigieux bond, grâce à l'amélioration constante des performances des techniques d'analyse.

La chromatographie en phase gazeuse (CG), extrêmement bien adaptée à l'analyse des constituants volatils, est devenue un outil de routine très sophistiqué. Les colonnes capillaires en silice fondue avec phase greffée possèdent une bonne résistance thermique et d'excellents pouvoirs de résolution (plusieurs milliers de plateaux théoriques au mètre).

Les techniques d'analyse spectrales (spectrométrie de masse, spectrométrie infrarouge, ...) ont également fait des progrès considérables. Chaque année, les limites de la sensibilité sont améliorées.

### **1. Chromatographie sur couche mince (CCM)**

La chromatographie (CCM) est une méthode d'analyse chimique qualitative permettant la séparation et l'identification des espèces chimiques d'un mélange. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La chromatographie d'adsorption est basée sur la différence d'affinité existant entre ses composés. La phase mobile « l'éluant » est un solvant ou un mélange de solvant qui se progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité.

En outre, chaque composé de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Dans le cas de substances colorées, on visualise plusieurs taches traduisant une séparation. Dans le cas de substances non colorées, il faut les rendre visible, trois solutions s'offrent : Placer la plaque sous lampe UV, utiliser de la vapeur d'iode pour colorer les taches ou utiliser un révélateur chimique.

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale  $R_f$  avec :  $R_f = \text{hauteur de la tache} / \text{hauteur du front du solvant}$ . Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du  $R_f$  avec un témoin.

## 2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible. Elle permet de recueillir des informations sur la nature, la composition et la structure des espèces présentes dans l'échantillon.

Le spectromètre de masse est souvent couplé avec un système de chromatographie en phase gazeuse, cette association, d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification, permet d'étudier des mélanges. Complexes à l'état de traces. Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV.

L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formation ainsi des ions fragments, ces derniers sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et /ou électrique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

La spectrométrie de masse est utilisée dans l'analyse élémentaire et dans l'analyse isotopique. Cette dernière est très utilisée dans le domaine pharmaceutique, ou dans celui de l'étude de croissance des plantes.

Le couplage chromatographique en phase gazeuse- spectrométrie de masse (CG-SM) est devenu un outil de routine. L'analyse de la composition qualitative d'une huile essentielle, qui, il y a seulement vingt ans, demandait des mois, voire des années, peut s'effectuer en moins d'une heure, grâce à l'informatisation (utilisation de banques de données et traitement des résultats par ordinateur).

Ainsi, la liste des constituants volatils identifiés à l'intérieur d'une huile essentielle ne fait que croître en fonction du temps. Nous avons noté que les huiles essentielles de différentes parties de clou de girofle ont fait l'objet de plusieurs études et ont mené à l'identification de la composition chimique, ainsi que différentes activités biologiques.

### **I.2.8. Utilisation**

Les huiles essentielles sont utilisées dans différents domaines à des fins très variées :

➤ **En thérapeutique :**

Les huiles essentielles ont de nombreuses propriétés antiseptiques, antihistaminiques, circulatoires, anti-hématomes, cicatrisantes et relaxantes. L'utilisation ancienne des huiles essentielles par voie générale pour leurs effets diurétiques, carminatifs, anti-inflammatoire, anti-algiques est toujours valable. Les expérimentations animales ou tissulaires prennent leur activité sur le système neurovégétatif et le système endocrinien (**Duraffourd et Lapraz, 2002**)

➤ **En cosmétique :**

Certaines huiles essentielles s'inscrivent parfaitement dans un programme cosmétique au naturel. La plus couramment utilisée en cosmétique est l'huile essentielle de patchouli. Les huiles extraites de la bourrache et de l'orange permettent d'améliorer l'hydratation de la peau (**Vautrin, 2005**). L'huile essentielle de Cèdre sert en parfumerie, en savonnerie ainsi que dans les industries pharmaceutiques comme des dentifrices et dans les gargarismes (**Teuscher et al., 2005**).

➤ **En agroalimentaire :**

Certaines drogues sont utilisées en nature (épices et aromate) d'autre le sont sous le forme d'HE ou des rétinoïdes, complexes, encapsulés.

L'aromatisation naturelle des produits alimentaires ne cesse de croître aux dépens de composition aromatique de synthèse (**Bruneton, 1999**).

### **I.3.1 Généralité**

Les polyphénols constituent une famille importante de métabolites secondaires de faible poids moléculaire du règne végétal (**Akawah et al., 2004**). Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes. Ce sont des corps dont la molécule contient plusieurs fonctions phénols. Ces corps jouent un rôle fondamental car ce sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractère organoleptique), nutritionnelles des végétaux que consomme l'homme. Leur intervention dans la santé et maintenant reconnue dans des domaines variés, anticancerigène, antioxydant, la lutte contre le vieillissement des cellules, antioestrogénique et anti inflammatoire (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

### **I.3.2. Classification des polyphénols**

#### **1. Polyphénols simples**

Les formes phénoliques les plus simples présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C<sub>6</sub> aux flavonoïdes en C<sub>15</sub>, ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**).

##### **a- Phénols**

Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (**Sarni-manchado et Cheynier, 2006**).

#### **3. Flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, et des fruits. Ils dérivent tous de la flavone (ou 2-phénylchromone) et existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides. (**Ghestem et al., 2001**).

#### **4. Les tanins**

Les tanins sont des composés phénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000. Les tanins sont classés en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Ghestem et al., 2001**).

### **I.3.2. Localisation dans la plante**

Une bonne connaissance de la localisation des composés phénoliques dans les différents tissus et organes végétaux est souvent essentielle pour orienter l'utilisation que l'homme souhaite en faire.

A l'échelle cellulaire, la localisation des composés est très caractéristique. Ils s'accumulent principalement dans deux sites : d'une part la paroi cellulaire où sont présentes les lignines et les flavonoïdes (quercétine, kamphérol) pourraient également être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique mais toujours à très faible concentration.

A l'échelle tissulaire, on observe également des répartitions très inégales des différents composés phénoliques. Ainsi les anthocyanes et les pigments de type flavonols sont généralement présent dans les couches cellulaires externes des organes végétaux en particulier les épidermes de fruits et des feuilles (**Sarni et Cheynier, 2006**).

### **I.3.3.Méthodes d'extraction des polyphénols**

#### **1. Extraction par les solvants ou macération**

Le contacte entre le solvant (liquide) et la matière végétale (solide) a pour but de libérer les polyphénols présents dans les cellules par rupture du tissu végétale et par diffusion (**Owen et Johns, 1999**).

#### **2. Extraction par chromatographie sur colonne**

Elle consiste à absorber sur une résine du type C18 pour les polyphénols et flavonoïdes des extraits végétaux puis à éluer sélectivement les substances polyphénoliques au moyen d'éthanol ou méthanol aqueux (**Hayouni et al., 2007**).

#### **3. Extraction supercritique**

Le CO<sub>2</sub> supercritique, utilisé comme solvant d'extraction, du fait de sa faible viscosité lui confère une grande capacité de diffusion lui permettant d'avoir accès à des composés phénoliques liés à la paroi cellulaire et sa densité relativement élevée lui confère un pouvoir de solvation ce qui permet un meilleur taux d'extraction (**Chan et Maznah, 2009**).

### **Objectif du travail**

L'objectif de ce travail est l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Ruta montana* L. provenant de la région de Batna, Blida et Bejaia et de leurs extraits phénoliques.

Dans un autre axe, ce travail consiste à extraire l'huile essentielle de la même espèce récoltée de la région de Batna en présence des agents surfactants et de comparer les rendements, la composition chimique,

Ces huiles essentielles sont obtenues par une hydrodistillation type Clevenger et Les extraits des poly-phénols sont obtenus par le Soxhlet.

### **Lieux d'expérimentation**

Notre étude a été réalisée dans les laboratoires suivants :

- L'extraction des huiles essentielles des plantes étudiées ainsi que leur extraits phénolique sont réalisés par les membres du laboratoire de recherche sur les produits bioactifs et la valorisation de la biomasse de l'ENS de Kouba.
- L'étude de l'activité antimicrobienne a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie de l'hôpital à Boufarik.

## **II. MATERIEL**

### **II.1. Matériel biologique**

#### **II.1.1. Matériel végétal**

Notre étude a été réalisée sur les plantes, Rue des montagnes *Ruta montana* L. Les parties concernées sont les feuilles. Trois prélèvements sont effectués en Mai. Les feuilles fraîchement récoltées.

La Rue des montagnes récoltée de Batna a été identifiée par Mr Bensassi Mohammed Botanicien au niveau de Parc national de Belezma (Batna). Une seule récolte à partir de populations différentes des parties aériennes de notre espèce a été réalisée le 30 Mai 2012,

durant la période de floraison de la plante dans son habitat naturel situé dans la région de Fesdis Willaya de Batna. Les feuilles sont ensuite séparées des tiges puis séchées à l'air libre, à l'abri de la lumière, et l'humidité, et enfin conservées jusqu'au moment de l'extraction.

La deuxième cueillette à la région de Blida a été identifiée par Monsieur Metall Maitre assistant au niveau de laboratoire de biologie végétale Département d'agronomie à l'Université Saad Dahleb-Blida. Une seule récolte à partir des populations différentes de cette espèce a été faite le 19 Mai 2012, durant la période de floraison de la plante dans son habitat situé dans la région de Hammam Melouane Wilaya de Blida.

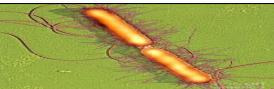
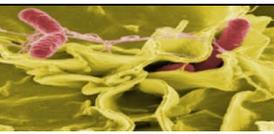
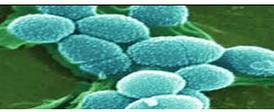
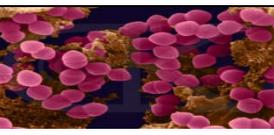
La troisième cueillette à partir de la région de Bejaia a été identifiée par les habitants de la région de kherrata. Une récolte à partir des différentes populations de cette espèce a été effectuée le 19 Mai 2012, durant la période de début de floraison de la plante dans son habitat situé dans la région de Kherrata (Wilaya de Bejaia).

### **II.1.2. Micro-organismes**

L'activité antimicrobienne est évaluée sur 24 microorganismes. Certains sont référenciés par la norme **AFNOR** et d'autre ne sont pas référenciés.

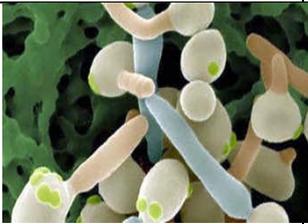
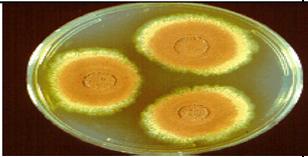
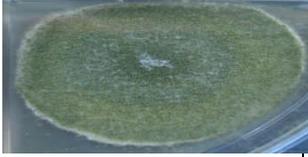
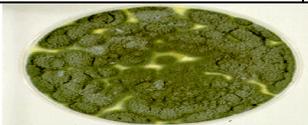
Le tableau **1-a** regroupe les souches bactériennes, l'allure sous le microscope électronique et la pathologie des souches utilisées.

**Tableau 1-a:** Souches bactériennes utilisées dans l'activité antimicrobienne (**anonymes**).

|        | Souches                                    | Allure  | Pathologies  |
|--------|--|---|--|
| Gram - | <i>Escherichia Coli</i><br>ATCC            |    | infections urinaires   |
|        | <i>klebsiella pneumoniae</i>               |    | présentes dans le tube digestif et dans l'appareil respiratoire                  |
|        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 1299 |    | responsable d'infections nosocomiales.   |
|        | <i>Morganella morganii</i>                 |   | infections urinaires, extra intestinales, intoxication alimentaire à l'histamine |
|        | <i>Proteus vulgaris</i><br>(ATCC 253)      |  | infections urinaires   |
|        | <i>Salmanella Typhi</i>                    |  | extra-intestinales   |
| Gram + | <i>Staphylococcus epidermidis</i>          |  | non pathogène  |
|        | <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 6538  |  | Des infections cutanées suppuratives, infections de l'appareil respiratoire      |
|        | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC10536       |  | Entéropathogène : Gastroentérite, infections intestinales.                       |
|        | <i>Enterococcus Sp</i>                     |  | les infections urinaires et les abcès abdominaux                                 |

Le tableau **1-b** regroupe les souches champignons, l'allure sous le microscope électronique et la pathologie des souches utilisées.

**Tableau 1-b** : Souches fongiques utilisées dans l'activité antimicrobienne (**anonymes**).

| Champignons                |  | Allure   | Pathologie  |
|----------------------------|--|--|---|
| <i>Candida</i>             | <i>albicans</i> plaie                  |    | d'infection superficielle cutanée : une vaginite, une balanite  |
|                            | <i>tropicalis</i> (ongle)              |  |   |
|                            | <i>albicans</i> (goitre)               |  |   |
|                            | <i>tropicalis</i> (Liquide Biliaire)   |  |   |
|                            | <i>Parapsilosis</i> (Squame du Thorax) |  |   |
|                            | <i>parapsilosis</i> (ongle)            |  |   |
| <i>Aspergillus niger</i>   |  |    | pourriture des pommes et des poires   |
| <i>Aspergillus terreus</i> |  |   | blessures pénètrent dans certains fruits ou sur les porte-graine  |
| <i>Aspergillus flavus</i>  |  |  | de spores jaune-vert sur la surface supérieure et rougeâtre or sur la surface inférieure. Dans les céréales et les légumineuses |
| <i>Penicillium sp</i>      |  |  | de pourriture « vertes » et « bleues » des agrumes  |
| <i>Fusarium culmorum</i>   |  |  | pourriture racinaire, fusariose de l'épi, pourriture de la tige, la pourriture sèche du tubercule de la pomme de terre          |

## II.2. Matériel non biologique

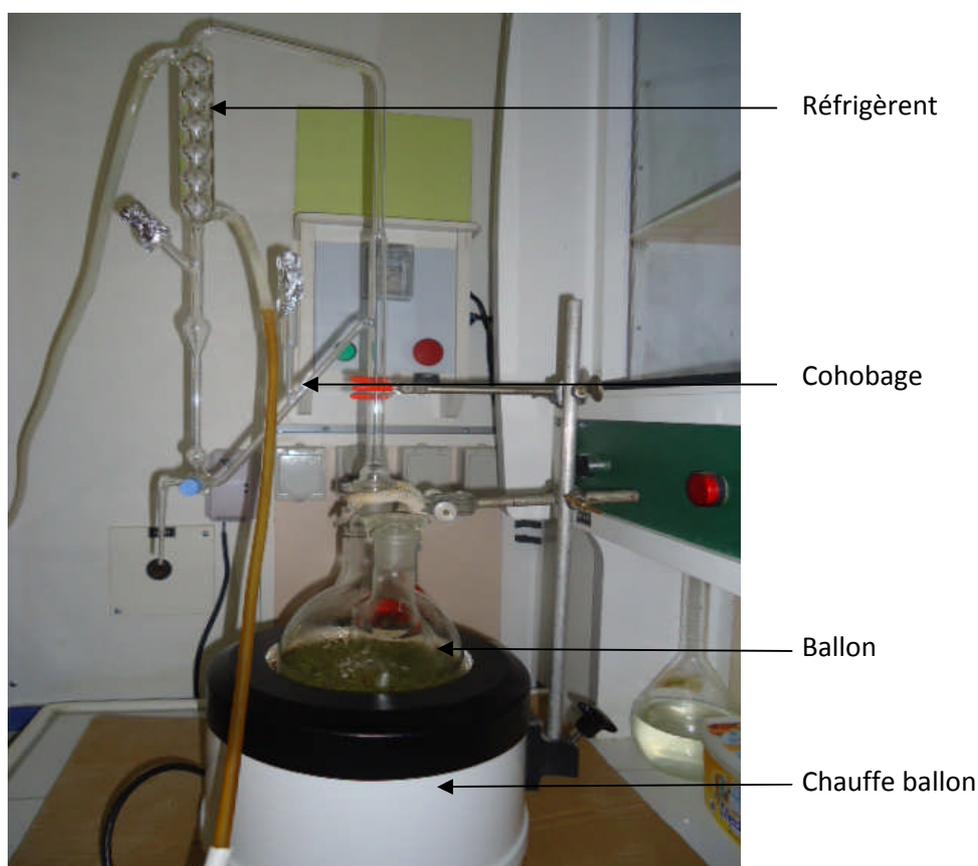
La verrerie, l'appareillage et les réactifs utilisés sont mentionnés dans l'**annexe**.

## II.3. METHODES

### II.3.1. Extraction de l'huile essentielle

Dans le but d'extraire les huiles essentielles de l'espèce étudiée, nous avons choisis la méthode classique d'hydrodistillation type clevenger. C'est la méthode préconisée par la Pharmacopée Européenne.

L'hydrodistillation des parties aériennes de *Ruta montana* L. a été réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger modifié. Le montage utilisé est représenté dans la figure ci-dessous.



**Figure 4** : L'appareil d'hydrodistillation type clevenger modifiée (Originale, 2012).

Après avoir pesé 100g de matière végétale constituée des parties aériennes sont introduits dans un ballon de 2L rempli d'eau aux 2/3 de son volume. Avant le raccordement du montage, on introduit dans le ballon quelques grains de pierres de ponces à raison d'ajuster la pression et régler l'ébullition, puis un chauffage est réalisé pendant 3 heures. Après

installation et fermeture du montage, le ballon sera chauffé à l'aide d'une chauffe ballon commençant dans un premier temps avec un réglage optimum du chauffage afin de stabiliser l'extraction.

Après écoulement des premières gouttes .La distillation a été effectuée avec un recyclage communément appelé cohobage (Recyclage dans l'alambic, pendant une distillation, de l'eau recueillie à la sortie de l'appareil après séparation de l'essence).

La vapeur condensée obtenue conduit à deux phases :

- Une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau par simple décantation. Une quantité de Sulfate de Sodium anhydre a été ajoutée au l'huile essentielle afin d'éliminer toutes traces d'eau pour la réalisation des analyses.
- Une phase aqueuse (eau aromatique ou hydrolat) qui contient une quantité non négligeable d'essence sous forme solubilisée. La récupération de cette huile est réalisée par extraction liquide-liquide avec un solvant organique (éther diéthylique).

L'utilisation d'un évaporateur rotatif permet d'éliminer l'éther et d'obtenir ainsi l'HE dissoute dans l'hydrolat. La somme des deux quantités d'huiles essentielles donne la quantité finale obtenue de cette extraction.

Pour l'extraction de l'huile essentielle en des tensioactifs on a utilisé le même procédé d'extraction, sauf qu'on a pris des quantités de 60g plus l'ajout des tensioactifs à raison de 0,6g.

- **les tensioactifs utilisés**

**Tableau 2 :** Les caractéristiques chimiques des tensioactifs utilisés.

| <b>Caractéristiques</b>     | <b>SDS</b> | <b>Tween</b> | <b>CTAB</b> |
|-----------------------------|------------|--------------|-------------|
| <b>CMC (20C° – 25C°)</b>    | 7 - 10     | 0,012        | 1           |
| <b>HLB</b>                  | 40         | 15           | 10          |
| <b>Code du produit</b>      | L-3771     | P8192        | H6269       |
| <b>Charge ionique</b>       | Anionique  | Non ionique  | Cationique  |
| <b>Point de fusion (C°)</b> | □100       | 65           | 170         |

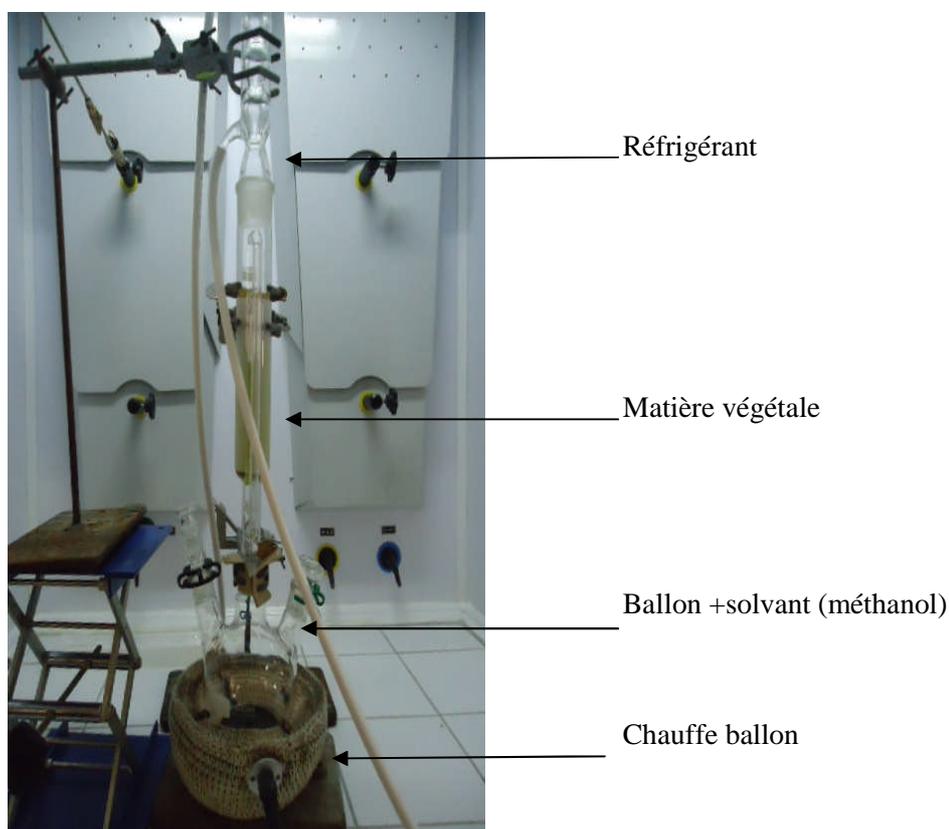
L'utilisation des tensioactifs cités ci-dessus est réservée dans le domaine d'enzymologie, la préparation des vaccins, la solubilisation des protéines membranaires.

- ✓ Récupérer l'huile essentielle et conserver à une température de 4°C, à l'abri de la lumière dans des flacons en verre teintés pour éviter sa dégradation.

### II.3.2. Extraction des composés phénoliques

- **Extraction par solvant volatils**

La technique utilisée pour l'extraction des composés phénoliques est celle par solvant volatil qui consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil méthanol est la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique.



**Figure 5 :** L'appareil de soxhlet (Originale, 2012).

### Mode opératoire

Les étapes d'extraction des composés phénoliques par soxhlet sont les suivantes :

- On met 400 mL de méthanol plus 100 mL de l'eau distillé dans un ballon de 1 litre.
- De faire passer 39g de matière végétale sèche contenue dans une cartouche de cellulose.
- Le flux descendant de solution méthanoïque est toujours neuf puisque distillé à chaque cycle.
- Faire passer ce distillat dans un évaporateur rotatif afin d'éliminer la solution méthanoïque et obtiendrai un extrait visqueux de couleur verte glauque.
- Conserver l'extrait sec en solution à +5°C.



**Figure 6:** Solution méthanolique d'extrait végétale (Originale, 2012).

### II.4. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles consiste à évaluer l'aspect, l'odeur, la couleur et la saveur, en utilisant les sens.

### II.4. Rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse d'huile essentielle extraite et la masse de la matière végétale utilisée (AFNOR, 2000). Le rendement exprime en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R_{HE} = (M_{HE} / M_{MV}) \times 100$$

**RHE** : rendement en huile essentielle (%).

**MHE** : masse de l'huile essentielle en gramme.

**MMV** : masse de matière végétale en gramme.

## II.5. Identification des huiles essentielles par CG/SM

La composition chimique d'huile essentielle extraite par hydrodistillation a été analysée qualitativement et quantitativement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

Ces analyses ont été effectués au sein de laboratoire de biotechnologie végétale appliquée aux plantes aromatiques et médicinales (BVPAM) Université Jean Monnet de Saint-Etienne (France) selon les conditions opératoires suivantes :

**CPG :** Hewlett Packard Agilent 5896N Les conditions de chromatographie sont les suivantes :

- Injection de 2  $\mu$ L en mode Splitless.
- Température de l'injection : 250°C
- Colonne capillaire HP5MS (30m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m)
- Programmation de température : 60°C pendant 2 min ; C°/min jusqu'à 245°C pendant 4 min
- Débit du gaz vecteur : Hélium (1ml / min)

**Spectre de masse :** model Agilent 5973

- Température : 250°C
- Impact électronique est de 70 ev.
- Scan : 350 amv/s

Pour l'identification de la composition chimique des huiles essentielles on calcule l'indice de rétention de l'huile essentielle pour la comparaison avec l'indice de rétention de la banque de donnée d'ADAMS, et l'indice de rétention calculé donné par la relation suivante :

$$IR = C*100+100x \frac{TR-TR_Z}{TR_{Z+1}-TR_Z}$$

IR : temps des rétentions

TR<sub>Z</sub> : temps des rétentions d'alcane inférieur par rapport de temps de rétention de composés de l'huile essentielle.

TRz+1 : temps des rétentions d'alcane supérieur par rapport de temps de rétention de composés de l'huile essentielle

C\*100 : numéraux de carbone d'alcane de temps de rétention inférieur par rapport de temps de rétention de composés de l'huile essentielle.

## II.6. Dosage des composés phénoliques

A fin de caractériser les extraits préparés à partir des feuilles des deux plantes étudiées, un dosage des polyphénols totaux et des tanins a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribuées.

### II.6.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu décrite en **1978** par **Singleton**.

#### ➤ Principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué d'un mélange d'acide ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (**Ribereau, 1968**).

La coloration produite, dont l'absorption maximum en spectrophotométrie UV-Visible à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

La quantification des polyphénols a été établie par rapport à une courbe d'étalonnage linéaire ( $y=ax+b$ ) réalisée avec l'acide gallique (polyphénol). La teneur en phénols totaux a été exprimée en **mg/g**.

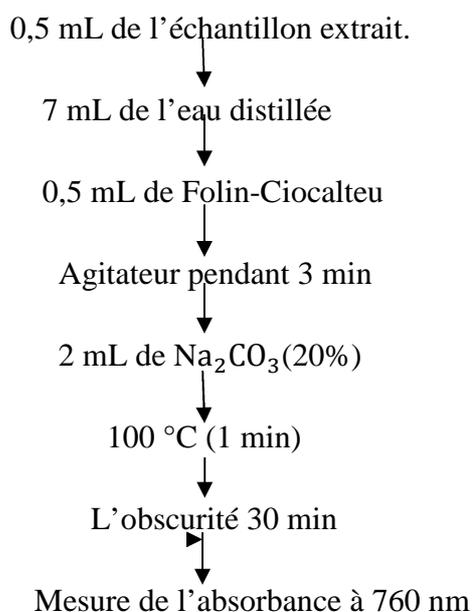
#### Mode opératoire de courbe d'étalonnage

À partir d'une solution mère aqueuse préparée de l'acide gallique de concentration massique 0,5mg/mL. Des solutions filles sont ainsi préparées de concentrations allant 0,003mg/mL à 0,013mg/mL. Un volume de 0,5ml de chaque solution filles est introduit dans des tubes à essais, suivi de l'addition de 7mL de l'eau distillé, 0,5mL de réactif **Folin**

**Ciocalteu** (10fois dilué). 2mLde carbonate de sodium à 20% (m/v) ont été ajoutés (favoriser le milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction).Par la suite ces solutions sont maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc (eau distillée),ceci nous permis de tracer la courbe d'étalonnage.

### Dosage des phénols totaux des trois extraits à étudier

L'estimation de la quantité en phénols totaux de notre extrait végétal (solution mère à raison de 5mg/3mL d'eau distillée) est obtenue selon le protocole expérimental cité dans le schéma suivant :



**Figure :** Protocole de mise en œuvre du test de dosage des phénols totaux.

### II.6.2.Dosage des tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques responsables de la saveur astringente des aliments, leurs propriétés principales sont liées à leur aptitude à se combiner aux protéines et glycoprotéines pour les faire précipités.

### **Mode opératoire de courbe d'étalonnage**

À partir d'une solution mère aqueuse préparée de l'acide tannique de concentration massique 0,1mg/mL. Des solutions filles sont ainsi préparées de concentrations allant 1µg/mL à 5µg/mL. Un volume de 0,5mL de chaque solution filles est introduit dans des tubes à essais, suivi de l'addition de 7mL de l'eau distillé, 0,5mLde réactif **Folin Denis**. 2mL de carbonate de sodium à 20% (m/v) ont été ajoutés (favoriser le milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction).Par la suite ces solutions sont maintenus à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc(eau distillée),ceci nous permis de tracer la courbe d'étalonnage.

### **Dosage des tanins des deux extraits à étudier**

L'estimation de la quantité en phénols totaux de notre extrait végétal (solution mère à raison de 5mg/3mL d'eau distillée) est obtenue en suivant le même protocole expérimental.

### **Mode opératoire**

En suivant le même protocole cité précédemment (dosage des phénols totaux) sauf qu'on utilise pour l'étalonnage l'acide tannique à la place de l'acide gallique et on mesure les différente absorbances à 685 nm.

## **II.7. L'étude du pouvoir antioxydant des huiles essentielles en présence et en absence des tensioactifs ainsi que les extraits bruts**

L'activité antioxydant a été évaluée par de piégeage de DPPH (2,2 – Diphényl- 1-picrylhydrazyl).

Le pouvoir antioxydant de nos huiles essentielles ainsi que les extraits testés est estimé par comparaison avec antioxydants de synthèse BHT. Tous les tests ont été réalisés avec trois répétitions pour chaque concentration.

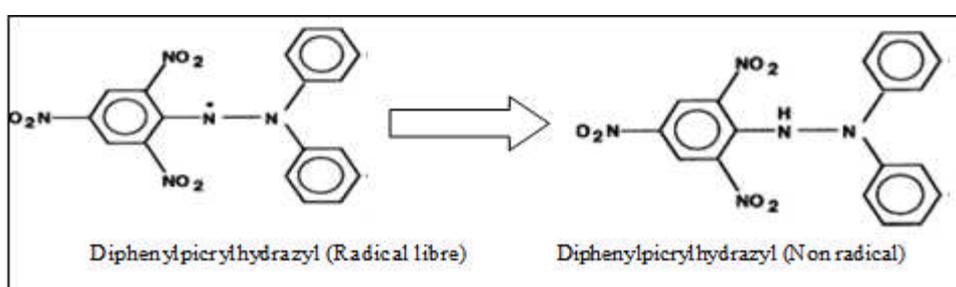
### **Principe :**

Pour étudier l'activité antioxydante des huiles essentielles et des extrais, nous avons utilisé le teste au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle(DPPH), selon le protocole décrit par (**Kim**

et *al.*, 2003). Le DPPH, radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires (Figure 7).

Le test du DPPH a été réalisé dans un spectrophotomètre UV-visible de type UNICAM HELIOS  $\lambda$  à la longueur d'onde de **517 nm** (Leitao et *al.*, 2002).

L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des composés.



**Figure 7:** Forme libre et forme réduite du DPPH (Molyneux, 2004)

### Préparation de la solution de DPPH

Le DPPH (2,2 – Diphényl-1- picrylhydrazyl) est solubilisé dans du éthanol à raison de 4mg / 100mL.

### Préparation de la solution mère et dilutions des huiles essentielles et des extraits

Comme première étape, des solutions mères des huiles essentielles ont été préparées par dissolution dans l'éthanol à raison de 60 mg/mL.

Des solutions mères des extraits bruts ont été préparées par dissolution dans le même solvant à raison de 0,5mg/mL.

Des dilutions de nos échantillons ont été préparées en choisissant deux concentrations. Où chacune des dilutions des huiles essentielles ou des extraits est mélangée avec la solution éthanolique de DPPH. Après une période d'incubation de 30min à la température de laboratoire et à l'abri de la lumière et l' $O_2$  atmosphérique, l'absorbance est lue à 517 nm.

En parallèle, des solutions mères d'antioxydants de synthèse BHT, ont été préparées à raison de 0,2mg/mL pour le BHT.

Le pouvoir d'inhibition est calculé par une formule spécifique. Le pourcentage d'activité (I%) est donné par la formule suivante :

$$I\% = (\text{Abs}_{\text{CONTROL}} - \text{Abs}_{\text{TEST}} / \text{Abs}_{\text{CONTROL}}) \times 100$$

**Abs** : Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm.

**Abs control**: Absorbance à la longueur d'onde de 517 nm de la solution méthanol + DPPH.

**Abs test**: Absorbance à 517 nm de l'échantillon

## II.8. Etude du pouvoir antimicrobien

La technique de diffusion sur gélose a été utilisée pour l'étude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle et de l'extrait des feuilles du *Ruta montana* L. Cette méthode consiste en la réalisation d'un Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), dans le but de déterminer la sensibilité des différentes souches.

### Détermination de la Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Du fait du non miscibilité des huiles essentielles dans la gélose, l'incorporation d'un dispersant Tween 80 a été nécessaire pour la réalisation de cette étude. De même que nos essais ont révélé que ce tensio-actif n'exerce aucune inhibition sur la croissance des germes testés (NCCLS, 2002)

#### ➤ Mode opératoire :

##### Milieux de culture utilisés :

- **Milieu Muller-Hinton** : milieu sélectif pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.
- **Cétrimide agar base (CAB)** : milieu sélectif pour *Pseudomonas aeruginosa*.
- **Milieu sabouraud** : milieu sélectif pour *candida albicans*.
- **Milieu PDA** : milieu sélectif pour *Fusarium cumarum*.

### **Préparation de l'émulsion d'huile essentielle**

Une solution mère d'huile essentielle de 20 mg/ml (HE/milieu de culture) environ 2% a été préparée comme suit :

#### **Pour la CMI des bactéries :**

- Mélanger 100µl d'HE avec 100 µl de tween 80
- Ajouter 20 ml de milieu M-H (Mueller Hinton) a ce mélange
- Agiter le tout jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

#### **Pour la CMI des levures :**

Le même procédé a été appliqué avec le milieu Sabouraud

Une série de dilution de chaque HE et des extraits, préparée avec un intervalle de concentrations en HE qui varie entre 0,5 % à 0,031 %.

La réalisation des dilutions se fait comme suit :

- Verser la moitié du premier flacon solution mère dans une boîte Pétri.
- Ajuster la moitié qui reste avec 10 ml de milieu gélosé pour obtenir une dilution de 0,25%

Procéder de la même manière jusqu'à l'obtention de la dernière dilution de 0,031%.

La gamme de concentration finale ainsi obtenue correspond à 0.5% ,0.25% , 0.125% , 0.062% , 0.031%.

La CMI se définit comme étant la plus petite concentration du produit pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

Cette partie se veut être une étude comparative entre les plantes de *Ruta montana* L. des différentes régions de l'Algérie.

### III.1.1 Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle des feuilles de *Ruta montana* L. des régions de Batna, Blida et Bejaia sont regroupées dans le tableau 3.

**Tableau 3 :** Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle feuilles de *Ruta montana* L.

| Les régions         | Aspect         | Couleur             | Odeur                       | Saveur |
|---------------------|----------------|---------------------|-----------------------------|--------|
| Batna               | Liquide mobile | transparente        | Caractéristique désagréable | Amère  |
| Blida               | Liquide mobile | Jaune pâle          | Caractéristique prononcée   | Amère  |
| Bejaia              | Liquide mobile | transparente        | Caractéristique désagréable | Amère  |
| AFNOR Normes (2000) | Liquide mobile | Jaune à jaune clair | Caractéristique, grasse.    | Amère  |

Ces tests ont montré que pour l'aspect l'odeur et la saveur des huiles essentielles de trois régions aient conformes à celle décrites par **AFNOR (2000)**. Seulement, la couleur des huiles essentielles de Batna et Bejaia sont transparents alors que celle de Blida est conforme aux normes AFNOR. Cette différence est due probablement à la différence de composition chimique de ces huiles essentielles.

### III.1.2. Rendement en huile essentielle

Des extractions par hydrodistillation type cleverger de *Ruta montana* L. ont été réalisées dans le but de quantifier et comparer les rendements en huile essentielle extraite à partir de l'espèce étudiée provenant des trois régions. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau III-2.

**Tableau 4:** Rendements des huiles essentielles en pourcentage (%) obtenus par l'hydrodistillation de *Ruta montana* L.

| Région    | Batna | Blida | Bejaia |
|-----------|-------|-------|--------|
| Rendement | 2,53% | 2,01% | 1,37%  |

L'analyse des résultats montre que le rendement en huile essentielle des feuilles de *Ruta montana* L. est important dans le cas des trois régions. On note que l'extraction des parties

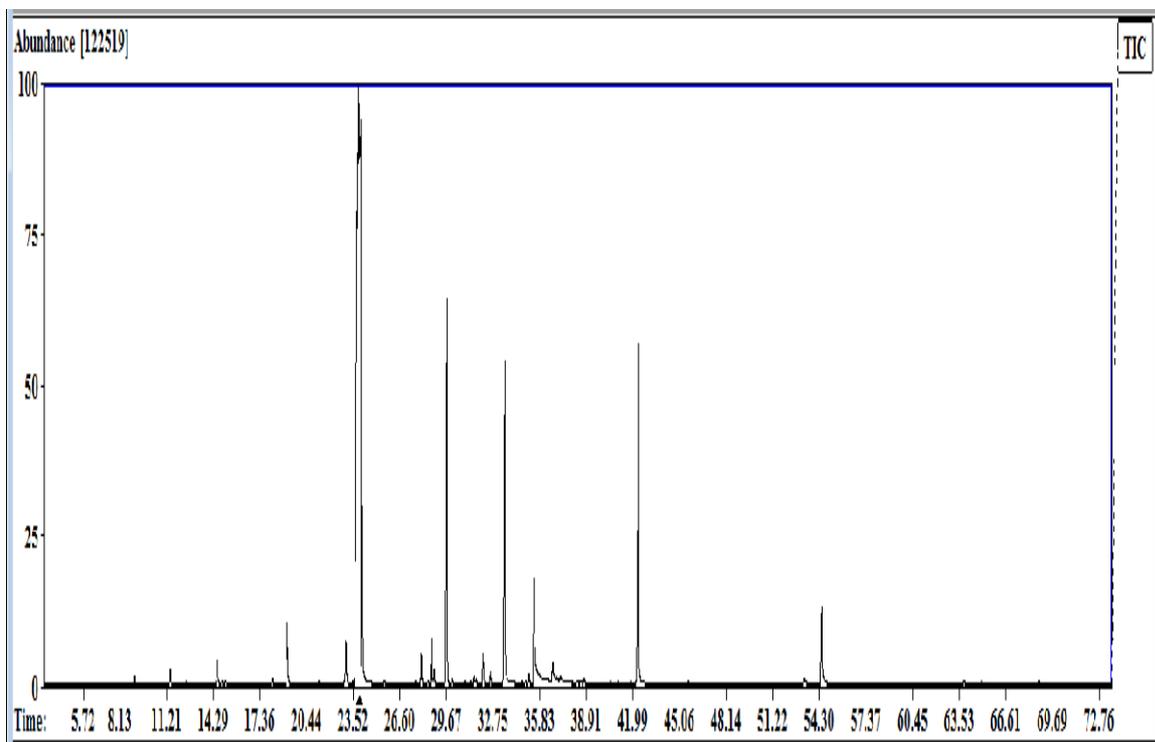
aériennes de la Rue par l'entraînement à la vapeur d'eau a donné un rendement de 0,72% à 1,2% à (AFNOR, 2000).

Selon (Kambouchet *al.*, 2008), Le rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Ruta montana* L. était de 1,63%. Pour (Zellagui *et al.* 2012) a enregistré un rendement de 1% et un rendement de 4,5% a été enregistré par les travaux de (Belkacem *et al.* 2011).

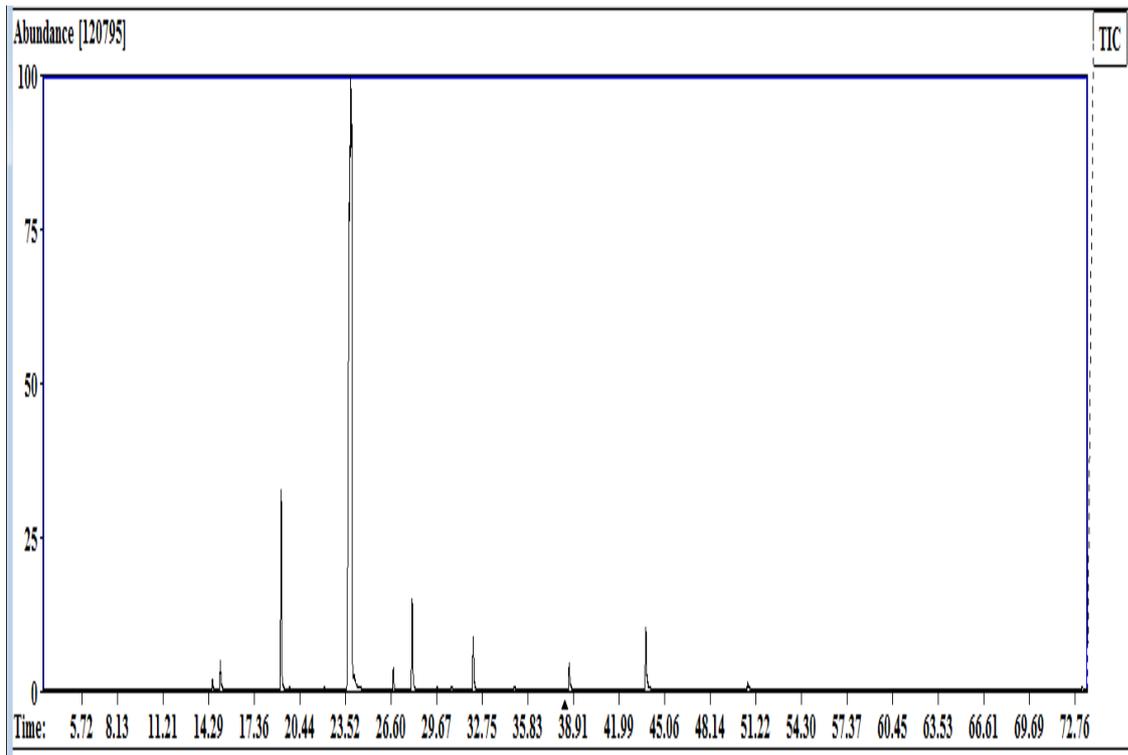
Les conditions climatiques, la position géographiques de la région, les techniques agricoles des herbes, stade végétatifs (floraison, état végétatif), ainsi que l'application des différentes techniques d'extraction, l'état de la matière végétale, les conditions d'entreposage peuvent être considérés comme facteurs influençant les différentes variations des rendements en huile essentielle.

### III.1.3. Identification des principaux composants des huiles essentielles par CG/SM

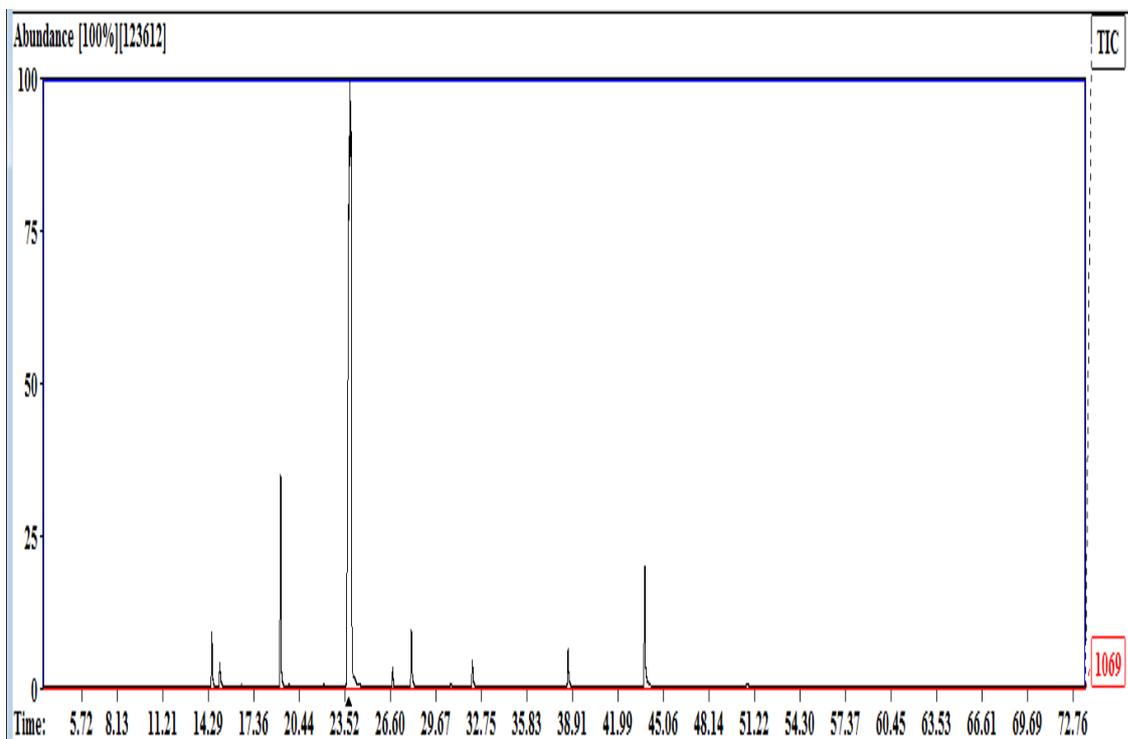
Les résultats de l'identification chromatographique par CG/SM des principaux composants chimiques de l'huile essentielle des feuilles de *Ruta montana* L. de Bejaia, Blida et Batna sont donnés par les Figures et tableau 5.



**Figure 8 :** Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Ruta montana* L. de la région de Bejaia.



**Figure 9 :** Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Ruta montana* L. de la région de Blida.



**Figure 10 :** Chromatogramme de l'huile essentielle extraite à partir de la partie aérienne de *Ruta montana* L. de la région de Batna.

**Tableau 5:** Identification des principaux composants chimiques de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Ruta montana* L. région de Bejaia, Blida et Batna.

| composés   | Tr    | IR Calculé | IR Adams | Bejaia | Blida | Batna |
|--|-------|------------|----------|--------|-------|-------|
| Sabinene   | 9,13  | 962,83     | 969      | 0,15   | /     | /     |
| l-limonene   | 11,48 | 1021,61    | 1024     | 0,3    | /     | /     |
| Trans-beta-ocimene   | 12,52 | 1045,27    | 1044     | 0,005  | /     | /     |
| Gamma-terpenene  | 12,87 | 1053,19    | 1054     | 0,16   | /     | /     |
| 2-Nonanone   | 14,55 | 1091,08    | 1087     | 0,63   | 0,41  | 1,84  |
| Nonanal  | 15,09 | 1103,29    | 1100     | 0,11   | 1,19  | 1     |
| 2-Decanone   | 19,19 | 1192,94    | 1190     | 1,41   | 7,14  | 7,39  |
| 2-heptenal (Z and E)                                       | 19,75 | 1205,52    | ND       | /      | 0,17  | 0,18  |
| tridec-12-en-2-one   | 22,11 | 1258,34    | ND       | /      | 0,06  | /     |
| Pentalene, 1, 2, 3,3a, 4,6a-hexahydro-                     | 23,06 | 1277,37    | ND       | 1,15   | /     | /     |
| Pregeijerene   | 23,08 | 1280,12    | 1288     | /      | 0,06  | /     |
| 2-Undecanone   | 23,87 | 1297,89    | 1293     | 51,35  | 78,07 | 77,6  |
| 1-Tetradecanol   | 24,12 | 1303,58    | ND       | /      | 1,45  | /     |
| 2-Dodecanol  | 24,16 | 1304,48    | 1469     | 3,83   | /     | /     |
| tridec-12-en-2-one   | 26,78 | 1365,61    | 1292     | /      | /     | 0,68  |
| 2-Dodecanone   | 28,04 | 1395,27    | ND       | 0,68   | 3,62  | 2,4   |
| Beta-caryophellen .  | 28,71 | 1411,00    | 1418     | 1,19   |       | /     |
| Cyclopropane, (R,R)-1-((Z)-hex-1'-enyl)                    | 28,88 | 1415,00    | ND       | 0,34   |       | /     |
| Cyclopropane, 1,2-dibutyl-                                 | 29,71 | 1436,09    | ND       | /      | 0,11  | /     |
| 1-Dodecene   | 29,75 | 1436,91    | ND       | 8,76   | /     | /     |
| Alpha.-Humulene  | 30,10 | 1445,53    | 1452     | 0,08   | /     | /     |
| 4-Tridecanone  | 31,31 | 1475,36    | ND       | 0,04   | /     | /     |
| Benzene methanol, 2-methyl-, acetate                       | 31,67 | 1484,18    | ND       | 0,1    | /     | /     |
| (Z, E)-.alpha.-Farnesene                                   | 32,11 | 1495,15    | ND       | 0,7    | /     | /     |
| 2-Tridecanone  | 32,16 | 1496,36    | 1495     | 1,18   | 2,2   | /     |
| E, E-.Alpha.-Farnesene",                                   | 32,61 | 1507,73    | 1508     | 0,23   | /     | /     |
| 2-Nonen-4-one  | 33,55 | 1532,00    | ND       | 8,06   | /     | /     |
| trans, trans-Farnesal                                      | 33,56 | 1532,67    | ND       | 0,09   | /     | /     |
| Pentane, 3-methylene-                                      | 34,05 | 1545,00    | ND       | 0,11   | /     | /     |
| Aromadendrene  | 35,15 | 1573,71    | ND       | 0,22   | /     | /     |
| Tridecane-2,4-dione  | 35,49 | 1582,35    | ND       | 4,67   | /     | /     |
| 4,5-Dihydro-2-methylthiophene                              | 36,11 | 1598,517   | ND       | 0,13   | /     | /     |
| Benzene, (1-methylethenyl)-                                | 36,19 | 1600,53    | ND       | 0,17   | /     | /     |
| 7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane, 1-methyl-4-(2-methyloxiranyl)- | 36,40 | 1606,28    | ND       | 0,25   | /     | /     |
| 2-Pentadecyn-1-ol  | 36,96 | 1621,65    | ND       | 0,2    | /     | /     |
| Bicyclo[6.1.0]nonane, 9-(1 methylethylidene                | 37,22 | 1628,66    | ND       | 0,18   | /     | /     |
| Pentane, 3-methylene-                                      | 37,34 | 37,34      | ND       | 0,15   | /     | /     |

|   |       |         |    |       |      |       |
|---|-------|---------|----|-------|------|-------|
| 2,5-Dimethylbenzenesulfonic acid                          | 38,64 | 1667,00 | ND | /     | /    | 1,45  |
| Benzene, 4-pentenyl-                                      | 38,64 | 1667,54 | ND | /     | 1,23 | /     |
| 2-Pentene, 2-methyl-                                      | 42,38 | 1773,05 | ND | 9,34  | /    | /     |
| 4-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-4,5-dihydrofuran-2(3H)-one | 43,82 | 1758,46 | ND | /     | 3,29 | 5,6   |
|   |       |         |    | 95,96 | 99   | 98,14 |

/:Absence

L'analyse par CG/MS de l'huile essentielle extraite à partir des parties aériennes de *Ruta montana* de la région de Bejaia, Blida et Batna, nous a permis d'identifier 31 composés pour la région de Bejaia, 14 composés pour la région de Blida et 10 composés pour la région de Batna qui représentent 95% , 98,14% et 99 % de la totalité des pics respectivement. Nous remarquons que cette huile présente une dominance des cétones qui constituent 66,81% des composés de l'huile où la **2-Undecanone** représente à elle seule la quasi-totalité de l'huile avec une teneur de 51,35% et des teneurs le **2-Decanone** et **2-Dodecanone** de pourcentage 1,41% et 0,68% respectivement.

À titre de comparaison, le tableau 6 donne les teneurs en composition majoritaires d'un autre échantillon de *Ruta montana* L.

**Tableau 6 :** Comparaison entre les teneurs en (%) majoritaires d'une HE de *Ruta montana* L.

|           |              | <i>Ruta montana</i> |       |        |                   |                  |                  |
|-----------|--------------|---------------------|-------|--------|-------------------|------------------|------------------|
|           |              | Blida               | Batna | Bejaia | Oran              | Mila             | Oum El Bouaghi   |
| Année     |              | 2012                | 2012  | 2012   | 2008              | 2012             | 2011             |
| référence |              | /                   | /     | /      | Kambouche et al., | Belkacem et al., | Zellagui et al., |
| Composés  | 2-Undecanone | 78,07               | 77,6  | 51,35  | 32,8              | 60,90            | 90,4             |
|           | 2-Decanone   | 7,14                | 7,32  | 1,41   | *                 | 6,26             | 1,41             |
|           | 2-Dodecanone | 3,62                | 2,4   | 0,68   | *                 | *                | 1,43             |

\* : ≤ 0,1%

D'après les résultats résumés dans le tableau 6 on remarque que le **2-Undecanone** reste le composé prédominant dans l'huile essentielle de *Ruta montana* L. pour les différentes régions. Alors que les autres produits apparaissent sous forme de trace dans l'huile essentielle d'Oran.

### Classes chimiques

Les différentes classes chimiques des huiles essentielles de la Rue récoltée à partir de trois régions différentes Blida, Batna et Bejaia sont illustrées dans le tableau.

**Tableau 7 :** Comparaison des classes chimiques présentes dans les huiles essentielle de l'espèce étudiée provenant des régions différentes.

| Classes chimiques               | Teneur relatives % |       |        |
|---------------------------------|--------------------|-------|--------|
|                                 | Blida              | Batna | Bejaia |
| Cétones                         | 94,79              | 96,63 | 66,81  |
| Aldéhydes                       | 1,45               | 1,18  | 0,60   |
| Acides                          | /                  | 1,45  | 0,25   |
| Alcools                         | 1,45               | /     | 4,03   |
| Esters                          | /                  | /     | 0,1    |
| Hydrocarbures                   | 1,4                | /     | 20,33  |
| Hydrocarbures sesquiterpéniques | /                  | /     | 2,42   |
| Hydrocarbures monoterpéniques   | /                  | /     | 0,66   |

/ : Absence

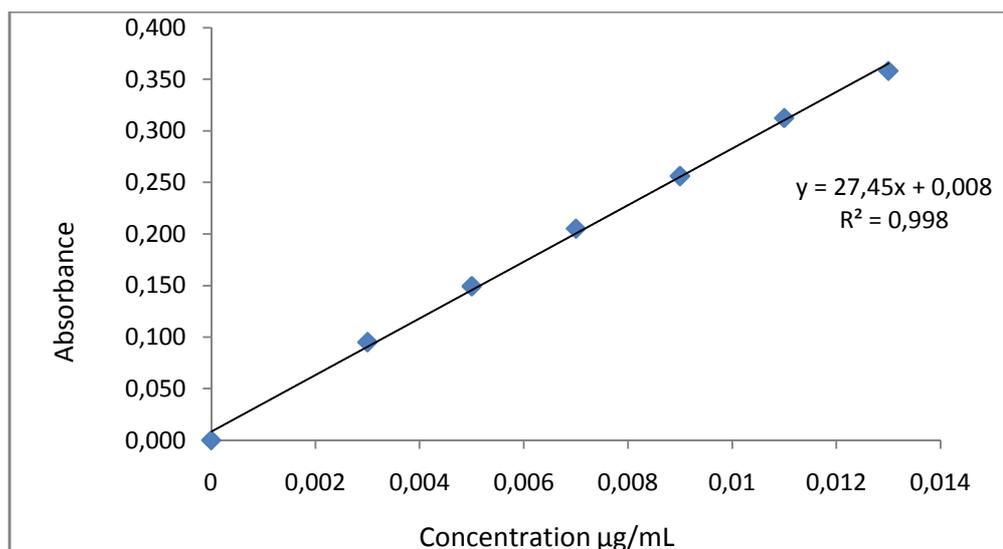
L'examen de tableau 7 permet de formuler les conclusions suivantes :

- La composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta montana* L., présente toujours le caractère cétonique dont le 2-Undécanone reste le constituant principal à teneurs relatives différentes.
- En revanche, on observe une absence ou présence des composés chimiques où on trouve les acides avec un pourcentage de (1,45%) dans l'huile essentielle provenant de la région de Batna. Une absence totale a été remarquée dans l'huile essentielle de la région de Blida et même pour les alcools avec un pourcentage de (1,45%) dans l'huile essentielle de Blida, et absence totale dans l'huile essentielle de Batna.
- Les aldéhydes sont présentés également dans les trois échantillons d'huile essentielle étudiés. Une absence des hydrocarbures dans l'huile essentielle de la Rue provenant de la région de Batna, avec une teneur relative de 1,4% a été enregistrée dans l'huile essentielle de la région de Blida et une différence significative en teneurs relatives des hydrocarbures (20,33%).

### III.1.4. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrométrique adaptée de (Singleton et Ross, 1965) avec le réactif de Folin Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche (mg GAE /g) en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique (Figure 11).



**Figure 11** : Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

La teneur en phénols totaux de l'extrait de *Ruta montana* L. pour les trois régions étudiées est reportée dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 8** : La teneur en phénols totaux de l'extrait de *Ruta montana* L. provenant des trois régions étudiées :

|                        | Région | Teneur en phénols totaux (mg EAG /g d'extrait sec) |
|------------------------|--------|--|
| <i>Ruta montana</i> L. | Blida  | 0,09   |
|                        | Batna  | 0,09   |
|                        | Bejaia | 0,19   |

Pour les trois régions étudiées, nous avons remarqué une similarité des teneurs en phénols totaux (la figure 8). Qui sont de l'ordre 0,09mgEAG/g d'extrait sec pour l'espèce provenant de deux régions Blida et Batna.

Une étude a été faite par (Djeridane et al. 2005), montre que la teneur en phénols totaux des extraits de l'espèce *Ruta montana* L. récoltée à partir de l'Aghout (région de steppe en Algérie) est de l'ordre 3,13 mg EAG /g d'extrait sec, cette teneur est supérieure à celle qu'on

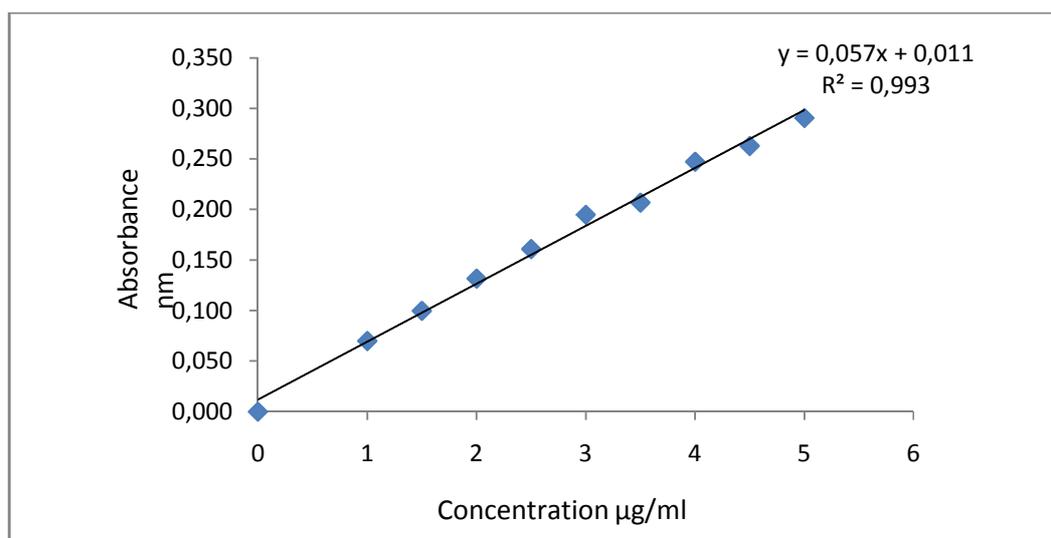
a trouvé dans l'espèce étudiée provenant de Batna et Blida avec des teneurs de (0,09 mg EAG /g d'extrait sec).

Puisque l'extrait méthanolique de l'espèce *Ruta montana L.* provenant de la région de Bejaia présente un teneur élevé (0,16 mg EAG /g) en phénols totaux, ce dernier doit présenter la plus importante activité antioxydante.

Cette teneur importante en phénols totaux peut être est due à la différence entre les conditions climatiques comme l'étage bioclimatique de la région, la sécheresse, et la pluviométrie.

### III.1.5. Dosage des tanins :

La quantification des tanins a été effectuée par une méthode adaptée par (Patrice et *al.* 2003) en utilisant le Folin-Denis .une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant l'acide tannique. Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide tannique par gramme de la matière végétale sèche (figure 12).



**Figure 12 :** Courbe d'étalonnage d'acide tannique pour le dosage des tanins.

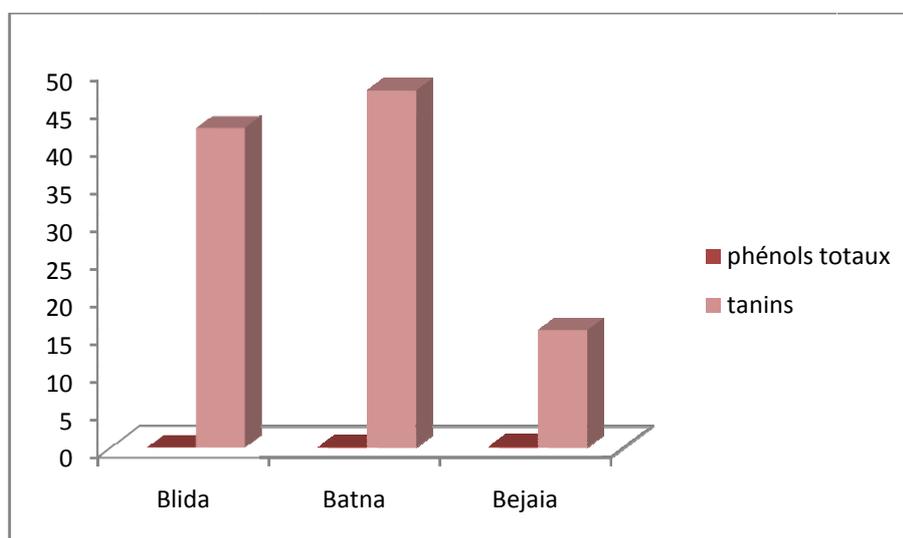
Les teneurs en tanins des extraits méthanoliques de *Ruta montana L.* des trios régions Batna, Blida et Bejaia sont illustrés dans le tableau 9.

**Tableau 9:** les teneurs en tanins des extraits étudiées

|                        | Région | Teneur en tanins (mg EGT/g d'extrait) |
|------------------------|--------|---------------------------------------|
| <i>Ruta montana</i> L. | Blida  | 42,55                                 |
|                        | Batna  | 47,48                                 |
|                        | Bejaia | 15,61                                 |

Es résultats du tableau 9 nous montrent que les concentrations en tanins sont classées par région comme suit : Blida, Batna et Bejaia qui présentent des teneurs suivante : 42,55 ; 47,48 ; 15.61 mg EAT/g d'extrait sec respectivement.

À titre de comparaison entre les taux des polyphénoliques et des tanins, un histogramme comparatif a été réalisé dans la figure 13.



**Figure 13** : Histogramme comparatif entre les phénols totaux et tanins.

Les résultats de l'évaluation des teneurs en phénols totaux et tanins des extraits méthanoliques de l'espèce étudiée des trois régions montrent à prédominance des tanins dans cet extrait.

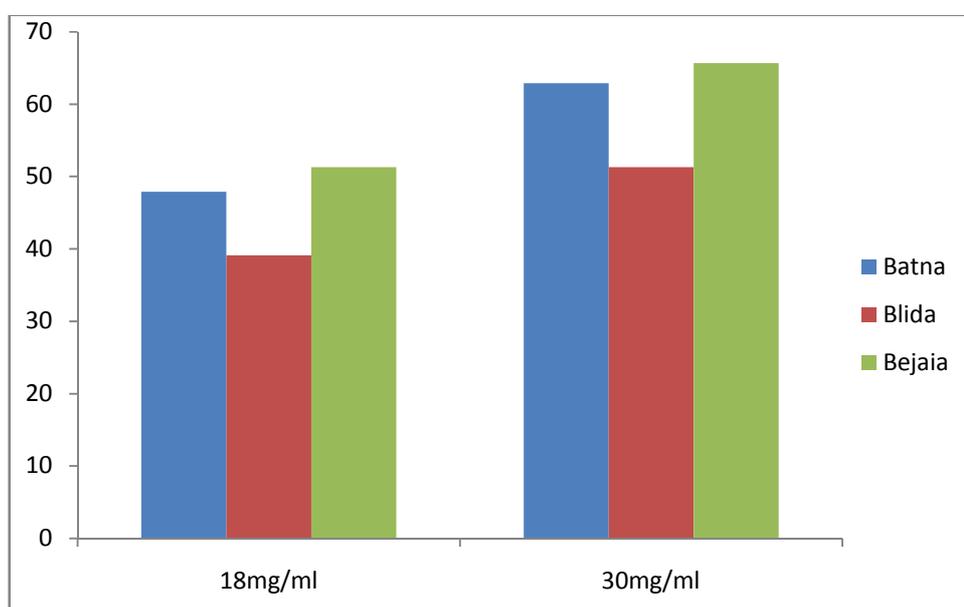
### III.1.6. L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles étudiées

L'activité anti-radicalaire de nos huiles a été testée en utilisant la méthode de piégeage du radical libre DPPH, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 10.

**Tableau 10:** Le pouvoir de piégeage du radical DPPH par l’huile essentielle de *Ruta montana* L. de la Région de Batna, Bida et Bejaia

| Concentration (mg/mL) | Activité (%) |        |        |
|-----------------------|--------------|--------|--------|
|                       | Batna        | Blida  | Bejaia |
| 18                    | 47,887       | 39,141 | 55,198 |
| 30                    | 62,887       | 51,284 | 65,673 |

La figure14 ci-dessous indique le pouvoir antioxydant des huiles essentielles de *Ruta montana* L.



**Figure 14 :** Histogramme comparatif du piégeage du radical DPPH par les huiles essentielles testées

D’après le tableau et la figure ci-dessus, il apparait clairement que l’huile essentielle de *Ruta* provenant de la région de Bejaia présente une capacité de réduction du radical DPPH plus importante par rapport à celle extraite en région de Blida et Batna.

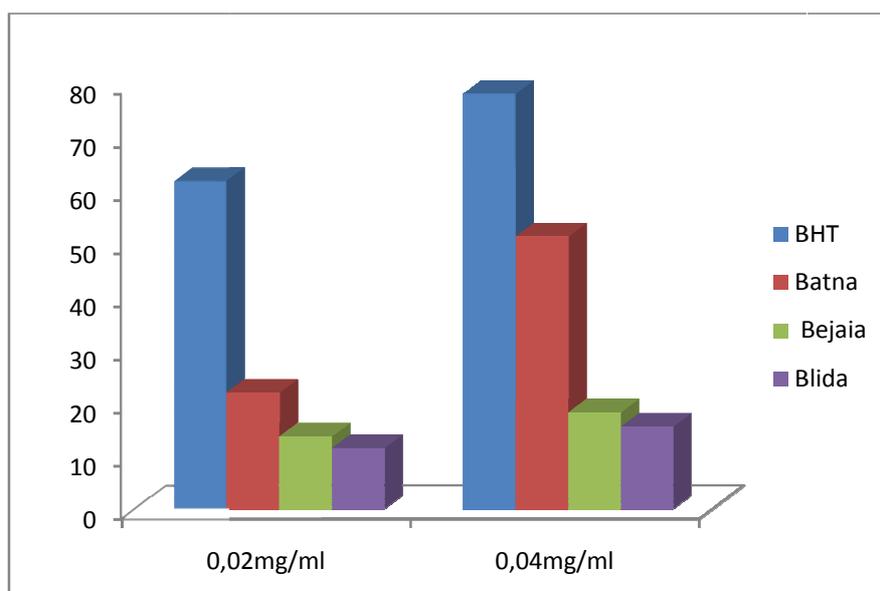
### III.1.7. Activité de piégeage du radical DPPH de l’extrait de *Ruta montana* L. des trois régions étudiées

La capacité radicalaire d’extrait de la Rue est représentée dans le tableau 11.

**Tableau 11:** Le pouvoir de piégeage du radical DPPH d’extrait de *Ruta montana* L. provenant des trois régions étudiées

| Concentration<br>(mg/mL) | Activité (%) |       |       |        |
|--------------------------|--------------|-------|-------|--------|
|                          | BHT          | Batna | Blida | Bejaia |
| 0,02                     | 61,72        | 21,89 | 11,43 | 13,62  |
| 0,04                     | 78,07        | 51,27 | 15,46 | 18,16  |

La Figure 15 ci-dessous indique le pouvoir antioxydant des extraits de *Ruta montana* L.



**Figure 15 :** Histogramme comparatif du piégeage du radical DPPH par les extraits testés

En revanche, pour des concentrations de (0,02 ; 0,04 mg /mL), les extraits des trois régions étudiées présentent une activité antioxydante assez faible par rapport à celle obtenue par le BHT.

Pour les trois régions étudiées, on remarque que l'extrait de chaque région présente un pouvoir de piégeage du radical DPPH d'autant plus important par rapport à celui attribué pour les huiles essentielles.

On constate aussi que pour une faible concentration d'extrait, ce dernier présente une action radicalaire plus élevée pour huiles essentielles les espèces étudiées.

Cela est du probablement aux facteurs suivants :

- Absence ou présence des phénols dans les huiles essentielles.
- La teneur élevée des principes actifs (phénols totaux et tanins)

### III.1.8. Etude du pouvoir antimicrobien

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles étudiées a été réalisée par la méthode de la CMI dans le milieu gélosé sur une série de bactéries, levures et champignons.

#### Cas des Bactéries :

L'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées a été réalisée sur huit bactéries de Gram négative dont : *Escherichia Coli* (infection Urinaire), *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Morganella morganii*, *Enterococcus Sp*, *Proteus vulgaris*, *Serrasia Margni*, *Escherichia coli* ATCC et trois bactéries de Gram positif dont *Staphylococcus epidermidis*, *Salmanella Thyphin* et *Staphylococcus aureus* de Gram positif. Les résultats concernant les CIM des différentes souches bactériennes testées par les huiles essentielles et les extraits de *Ruta montana* L, sont regroupés dans le tableau 12.

**Tableau 12:** Concentration minimale d'inhibitrice (CIM) des différentes souches Bactérienne testées, en extraits et des huiles essentielles des feuilles de *Ruta montana* L.

|        | Souches bactériennes                         | Huile essentielle | Extraits phénoliques |
|--------|--|-------------------|----------------------|
|        |  | Blida             | Blida                |
| Gram - | <i>Escherichia Coli</i> (infection Urinaire) | 0,50%             | ≥0,5%                |
|        | <i>klebsiella pneumoniae</i>                 | ≥0,5%             | ≥0,5%                |
|        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                | 0,06%             | 0,13%                |
|        | <i>Morganella morganii</i>                   | 0,50%             | 0,25%                |
|        | <i>Proteus vulgaris</i>                      | ≥0,5%             | ≤0,5%                |
|        | <i>Enterococcus Sp</i>                       | ≥0, 5%            | 0,06%                |
|        | <i>Salmanella Thyphin</i>                    | ≥0,5%             | 0,25%                |
|        | <i>Serrasia Margni</i>                       | ≥0,5%             | ≥0,5%                |
| Gram + | <i>Staphylococcus epidermidis</i>            | ≥0,5%             | ≥0,5%                |
|        | <i>Staphylococcus aureus</i>                 | ≥0,5%             | ≥0,5%                |
|        | <i>Escherichia coli</i> ATCC                 | ≥0,5%             | ≥0,5%                |

L'analyse des résultats du tableau 12 montre que les concentrations minimales inhibitrices des extraits et des huiles essentielles de Blida présentent des valeurs de CMI qui varie entre 0,5 et 0,13%. Ces valeurs varient d'une souche à une autre.

Les huiles essentielles de deux régions (Bejaia et Batna) n'ont aucune activité sur les germes testés aux concentrations étudiées.

Selon **Kaci Messouda et al., (2010)** les extraits sont détenteurs d'une bonne activité antimicrobienne, cela est surtout visible pour l'extrait de Ruta qui présente une plus grande action que l'huile essentielle pure, sur chacune des souches suivantes : *Bacillus Subtiis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* . L'extrait et l'huile de Rue présentent une activité presque similaire vis-à-vis de leueur *Candida albicans*, l'action de l'huile de Rue reste plus efficace sur *klebsiella pneumoniae*. *Staphylococcus epidermidis*, Cela rejoint la théorie de (**Proestos et al. ,2006**) qui affirme que les bactéries Gram +) sont plus sensible aux extraits des plantes que les bactéries Gram -.

### Cas des levures :

Les résultats concernant les CIM des différentes souches testées par les huiles essentielles et des extraits de *Ruta montana* L, sont regroupés dans le tableau 13.

**Tableau 13:** Concentration minimale inhibitrice (CIM) des différentes souches des levures testées, en extrait et des huiles essentielles des feuilles de *Ruta montana* L.

| Levures   | Concentration minimale inhibitrice (CIM) |        |         |                      |        |        |
|---|--|--------|---------|----------------------|--------|--------|
|   | Huile essentielles                       |        |         | Extraits phénoliques |        |        |
|   | Blida                                    | Bejaia | Batna   | Blida                | Bejaia | Batna  |
| <i>Candida albicans</i> (plaie)                   | 0,5                                      | 0,062  | ≥0, 5   | ≥0,5                 | ≥0,5   | ≥0,5   |
| <i>Candida albicans</i> (goitre)                  | ≥0,5                                     | ≥0,5   | 0,005   | ≥0.5                 | ≥0,5   | ≥0,5   |
| <i>Candida tropicalis</i> (ongle)                 | 0,062                                    | 0,062  | ≤0,031  | ≥0,5                 | ≤0,31  | ≤0,031 |
| <i>Candida tropicalis</i><br>(Liquide Billaire)   | ≥0,5                                     | 0,125  | ≥0,5    | ≥0,5                 | ≥0, 5  | ≥0,5   |
| <i>Candida Parapsilosis</i><br>(Squame du Thorèx) | ≥0,5                                     | ≥0,5   | 0,5     | 0,5                  | ≥0,5   | ≥0,5   |
| <i>Candida parapsilosis</i><br>(ongle)            | 0,125                                    | ≤0,31  | ≤0.0 31 | 0,062                | 0,062  | ≤0,031 |

D'après les résultats du tableau précédent, il apparait que *Candida albicans* (plaie) a été sensible pour l'huile essentielle de Blida avec un CMI de 0,062% et pour l'huile essentielle de Bejaia, mais pour les autres huiles, cette levure montre une résistance pour les différentes concentrations de cet intervalle.

Concernant les deux souches *Candida albicans* (goitre) et *Candida Parapsilosis* (squame du Thorax), les résultats de CIM montrent 0,5% sur l'huile essentielle de Batna.

La souche *Candida tropicalis* (ongle), présente une sensibilité vis-à-vis à l'extraits de Batna et de Bejaia. Par contre cette levure a été résistante pour l'extrait de Blida dans l'intervalle des concentrations utilisées. Pour les huiles de Blida et Bejaia leur CMI a été de 0,062%.

Alors que *Candida tropicalis* dont l'origine est le liquide biliaire, on a observé un CMI de 0,125% pour l'huile essentielle de Bejaia. Concernant les autres huiles essentielles et les extraits, cette souche présente une sensibilité pour les déférentes concentrations.

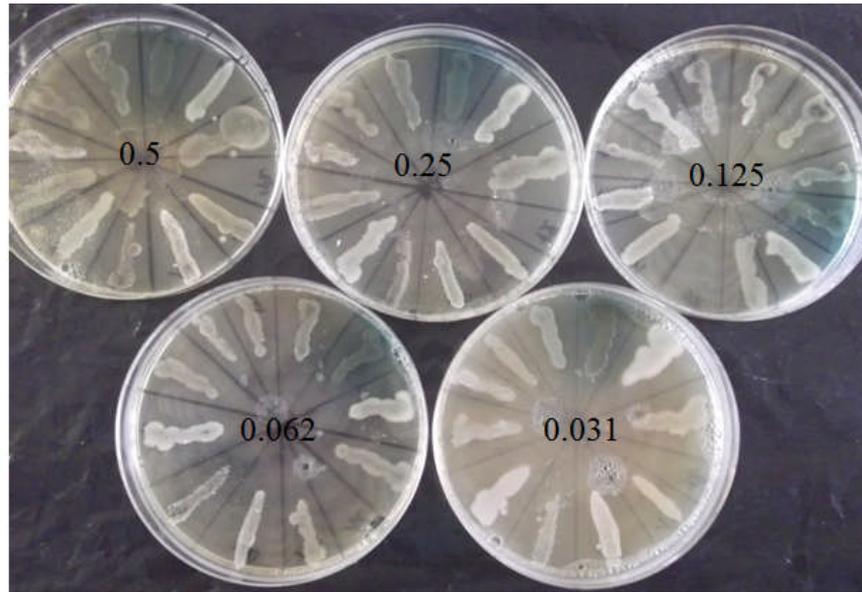
Pour la souche *Candida parapsilosis* (ongle), légèrement sensible sur les huiles de Batna, Bejaia et l'extrait de Batna. Alors qu'avec les extraits de Blida, Bejaia nous avons obtenu une CIM de 0,062%.

L'activité des huiles essentielles et des extraits de *Ruta montana* au contact de levure s'est avérée forte, ceci est en accord avec les résultats de (Nogueira et al., 2008) qui ont enregistré une sensibilité plus prononcée de ce germe.

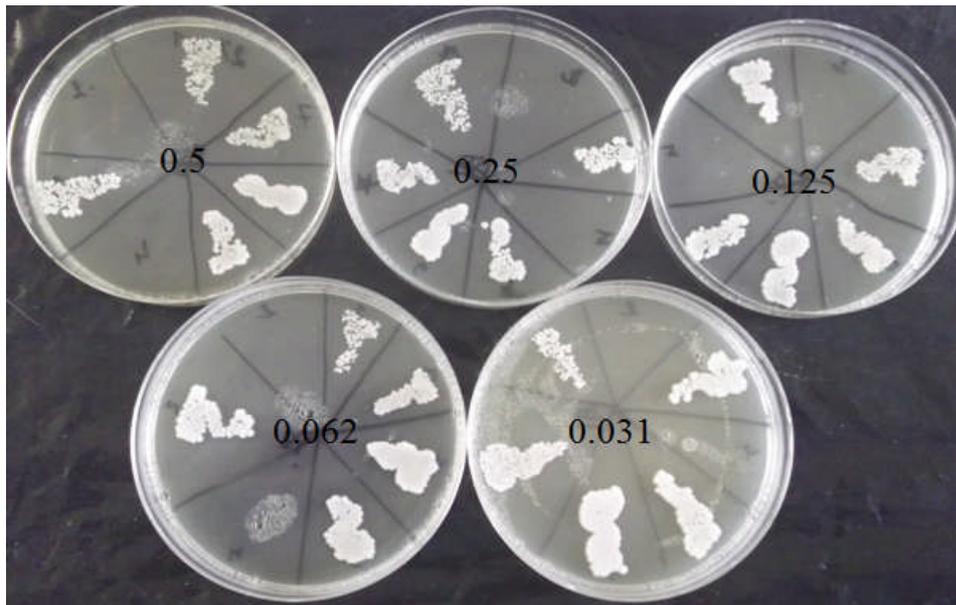
Nos résultats concordent avec les travaux de (Kaci Messouda et al., 2010) qui affirment que *Candida* est inhibée par l'huile de *Ruta montana* L.

### III.1.9 Activité antifongique

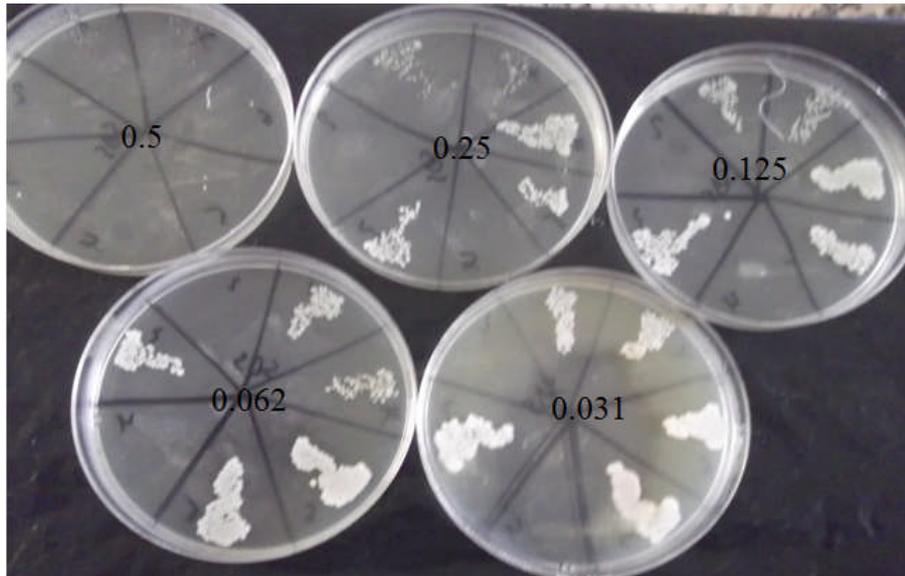
Les huit souches fongiques testés à savoir : *Fusarium culmarum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terrus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp* et *Mucor romanianus* n'ont montré aucune sensibilité aux huiles essentielles des plantes étudiées, quelle que soit la concentration.



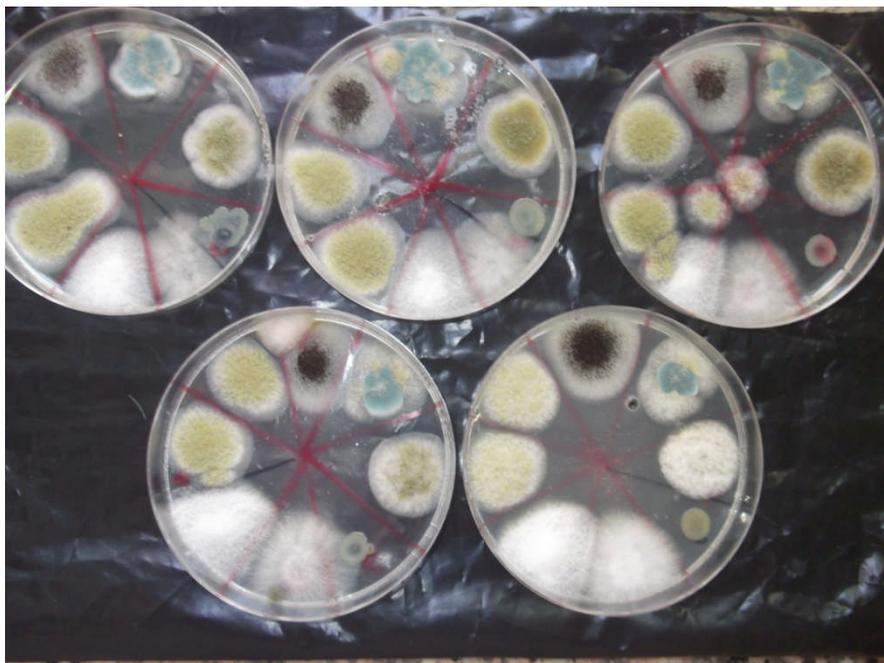
**Figure 16:** Effet de l'extrait des feuilles de *Ruta Montana* L. de Bejaia à différentes concentrations sur le développement des souches bactériennes (l'original, 2013).



**Figure 17 :** Effet l'extrait des feuilles de *Ruta Montana* L. de Batna à différentes concentrations sur le développement des souches antifongique (original, 2013).



**Figure 18:** Effet l'huile essentielle des feuilles de *Ruta Montana* L. région de Batna à différentes concentrations sur le développement des souches antifongique (original, 2013).



**Figure 19 :** Effet l'huile essentielle des feuilles de *Ruta Montana* L. région de Blida à différentes concentrations sur le développement des souches antifongique (original, 2013).

\*

\*\*

## References

1. **Abdelli.M, 2010.** Extraction des huiles essentielles de *Salvia officinalis* .L, de *Rosmarinus officinalis*.L et de *Coriandrum sativum*.L par hydrodistillation en présence des tensioactifs. Thèse de magister.
2. **AFNOR., 2000.** Recueil de normes: les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles. AFNOR. Paris. pp:661-663.
3. **Ait Youssef, 2006.** plante médicinale de Kabylie. Ed. Ibis press.
4. **Bartels. A, 1997.** Guide des plantes méditerranéennes. Paris : 323p.
5. **Belkacem.A, Zellagui.A, Ghenaf.N, Lahoual.M, Rhouati.S, 2011.** Essential oil composition of Algerian « *Ruta montana* »(clus)Land antibacterial effects on microorganismes responsible for respiratory infections article.
6. **Belaiche P., 1979.** L'aromatogramme traité de phytothérapie et d'aromathérapie .M.S.A. Editeur, Paris : Tome 1.
7. **Bernard T., Perinan F., Belmas M. et Gaset A., 1988.** Extraction des huiles essentielles Chinie et technologie information Chinie.
8. **Bouhraoua R-T., Villement C., Khelit M.-A. et Bouchouhaour S., 2002.** Situation sanitaire de quelques subéraies de l'ouest Algérien : impact des xylophages. IOBC (W P R S Bull-,25C5). pp : 85-92.
9. **Brunton.J, 1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2èmeédition Lavoisier, 385-626P.
10. **Bruneton J., 1999.** Huiles essentielles, In pharmacognosie photochimie plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> Edition. Doc- et Tec- La Voisier.

11. **Couplan.F, 1990.** Plantes sauvages et toxiques, encyclopédie des plantes comestibles de l'Europe.
12. **Djeridane.A, Yousif.M., Nedjmi.B., Boutossouma.D., Stocker.P., Vidal.N., 2005.** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plant extracts containing phenolic compounds. Ed food chemistry.
13. **Duraffourd C., Lapraz J.-C., 2002.** Traité de phytothérapie clinique, Médecine et endobiogénie. Edition MASSON. pp: 7- 139.
14. **Durande, 1782,** Notions Elémentaires de Botanique, 284.
15. **De Jussieu A.L., 1789,** Genera Plantarum, 296.
16. **Encyclopédie, 2011.** Des plantes médicinales. Identification, préparation, soins Larousse. p : 84.
17. **François.C, 2000.** Dictionnaire étymologique de botanique .Ed.Delachaux et Nistlé. Paris
18. **Guenther E., 1972.** The essential oils. Ed. Robert et Krieger : Vol : 1, p : 427.
19. **Guignard J.L, 2001.** Botanique systématique moléculaire 12<sup>ème</sup> édition. Paris.
20. **Guy.D, 1967.** Organisation et classification des plantes vasculaires, société d'édition d'enseignement supérieur, Paris, in Benkiki, 2006.
21. **Jacque C. et Paltiz G., 1999.** Le fascinant des huiles essentielles.
22. **Kaci.M, Alloune.K, 2010.** Huiles essentielles et extraits d'*origanumfloribundum* et de *Rutamontana*. Mémoire ingénieur.
23. **Kambouche N, Merah B, Belahoual S, Bouayad J, Dicho . A, Lagunez.R.L, 2006.** Étude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.
24. **Kim K.-S., Lee S., Lee Y.-S., Jung S.-H., Park Y., Shin K.-H., Kim B.K., 2003.** Anti-oxydant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea* Journal of Ethnopharmacology. pp: 69-72.
25. **Leitao G-G., Leitao S-G et Vilegak W., 2002.** Quick preparative separation of natural Naphthopyranones with Antioxydant activity by High-speed Counter-Current Chromatography.Z. pp: 1051-1055.
26. **Leitao G-G., Leitao S-G et Vilegak W., 2002.** Quick preparative separation of natural Naphthopyranones with Antioxydant activity by High-speed Counter-Current Chromatography.Z. pp: 1051-1055.
27. **Nazli N., 2003.** Etude des huiles essentielles de quelques plantes Algériennes et caractérisation chimique.

28. **Padrini F et Lucheroni M-T., 1996.** Le grand Guide des huiles essentielles, Ed : Devecchi.
29. **Peyrefitte G et Martini M-C., 2008.** Esthétique Cosmétique CAP .Edition MASSON. p: 241.
30. **Proestos C., Boziaris I.S., Nychs G.-J.E., Komaitis M., 2006.** Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants : Inverstigation of thier antioxydant capacity and antimicrobial activity. Food Chemistry , vol.95, n.4,p.p.664-671.
31. **Quzel.P et Santa.S, 1963.** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. GNRS, Paris.
32. **Ribereau G.-P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, p : 254.
33. **Roquebert M-F., 2002.** Les contaminations biologiques des culturels. Edition ELSEVIER pp : 534- 335.
34. **Roux D et Chaumont J-P., Cieur C., Millet J., Morel J-M. et Tallec D., 2008.** Nord de l'Algérie tom II. pp : 271-272.
35. **Roux D et Chaumont J-P., Cieur C., Millet J., Morel J-M. et Tallec D., 2008.** Nord de l'Algérie tom II. pp : 271-272.
36. **Singleton V-L., 1978.** The phénolic cinnamates of grapes and wine, Journal of Sciences and food agriculture. pp: 29-403-410.
37. **Teuscher E., Anton R et Lobstein A., 2005.** Plantes aromatiques épices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition TEC and DOC, LOVOISIER. pp : 6- 266-272.
38. **Tamuna.H, Yamasaki. K, Isomio.K, Yoshikawa.T,** Effet of the polyoxyethylene chairlengt of triton x surfactants on the adsolubilisation of reconstituted, in Abedelli, 2010.
39. **Vautrin D., 2005.** Une peau zéro défaut, Guide pratique, des soins cosmétiquent aux aliments beauté. Edition Alpen. p : 68.
40. **Zellagui.A, Belkacem.A, Belaidi A, Ghenaf .N, 2012.** Enviremental impact of the chemical composition and yield of essential oils of Algerian « *Ruta montana* » (clus).Land their antioxydant and antibacterial activities

## Conclusion

Notre travail a été mené dans le cadre de la valorisation d'essence phytochimique et biologique de la plante *Ruta montana* L. des trois régions différentes (Blida, Bejaia et Batna), nous sommes arrivés à des résultats qui nous ont permis la caractérisation de cette plante.

L'objectif de ce travail visait la mise des deux points essentiels :

- L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation type Clevenger modifiée de l'espèce *Ruta montana* L. provenant des trois différentes régions (Blida, Bejaia et Batna). Pour évaluer les rendements, la composition chimique, le pouvoir antioxydant et l'activité antimicrobiennes.
- L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation type Clevenger modifiée de *Ruta montana* L. provenant de la région de Batna en présence des agents surfactants anioniques et non ioniques. Pour vérifier l'utilisation de ces agents sur l'extraction des huiles essentielles.

Les résultats obtenus lors de la réalisation de cette étude nous ont permis de formuler les points suivants :

L'extraction par hydrodistillation type Clevenger des huiles essentielles de *Ruta montana* L. récoltées des trois régions étudiées, donne des rendements importants pour les trois régions à raison de 2,53%, 2,01% et 1,37% pour Batna, Blida et Bejaia respectivement.

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *Ruta montana* L. par GC/MS des trois régions étudiées, nous a permis d'identifier 31 composés pour la région de Bejaia, 14 composés pour la région de Blida et 10 composés pour la région de Batna qui représentent 95%, 98,14% et 99% de la totalité des pics respectivement. Nous avons remarqué que ces huiles présentent une dominance des cétones qui constituent 94,79%; 96,63% et 66,81% pour les régions Blida, Batna et Bejaia respectivement. Le **2-Undécanone** représente à elle seule la quasi-totalité de l'huile.

Pour la quantification en composés phénoliques (phénols totaux et tanins) de l'extrait méthanolique de *Ruta montana* L. nous avons remarqué une teneur similaire de la quantité des phénols totaux pour les deux régions Batna et Blida à raison de 0,09mg EAG/g d'extrait sec et 0,16mg EAG/g d'extrait sec de l'extrait de Bejaia. Aussi, une teneur en tanins plus importante pour les trois régions étudiées mais la quantité des tanins de l'extrait des espèces étudiées de la région de Batna et Blida est supérieure à celle de l'extrait de *Ruta Montana* L. de la région de Bejaia.

L'activité antioxydante de l'huile essentielle de *Ruta montana* L. a été évaluée par la méthode de piégeage de radical DPPH. En résultant que l'activité antioxydante de l'huile essentielle de la région de Bejaia présente une capacité de réduction plus importante par rapport à celle extraite en région de Blida et Batna.

On constate aussi que pour une faible concentration d'extrait, ce dernier présente une action radicalaire plus élevée pour huiles essentielles les espèces étudiées.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles de deux régions (Bejaia et Batna) n'ont aucune activité sur les souches bactériennes et les champignons testées aux concentrations étudiées.

L'action de l'extrait et l'huile essentielle de Blida sur les bactéries présentent des valeurs de CMI qui varie entre 0,5 et 0,13%. Ces valeurs varient d'une souche à une autre.

La souche *Candida albicans* a été sensible pour l'huile essentielle de Blida avec un CMI de 0,062% et pour l'huile essentielle de Bejaia, mais pour les autres huiles, cette levure montre une résistance pour les différentes concentrations de cet intervalle. Alors ces HE peuvent être utilisés comme antifongique (action fongicide), car elles présentent un large spectre d'action sur les souches pathogènes de levures

Pour la deuxième partie de l'extraction des huiles essentielles de *Ruta montana* L. de la région de Batna en présence des tensioactifs nous avons illustrés les résultats suivants :

On a enregistré une augmentation de rendement lors de l'utilisation de tensioactifs à raison de (3,22% ; 2,85% ; 2,5%) pour le CTAB, SDS et Tween respectivement par rapport au l'huile essentielles sans tensioactifs, cela pourrait être due au fait que la solution aqueuse s'achemine plus facilement à travers la cuticule végétale de la plante.

La composition chimique des huiles essentielles en présence des tensioactifs présente toujours le caractère cétonique. Une augmentation en hydrocarbure en présence des trois tensioactifs ioniques utilisés.

L'activité antioxydante par la méthode de radical DPPH montre que l'huile essentielle de *Ruta montana* L. en présence des tensioactifs (CTAB, SDS et Tween) donne faible activité antioxydante par rapport à l'huile essentielle en absence des tensioactifs. Cela a été justifié par l'augmentation du pourcentage des hydrocarbures de ces huiles.

L'activité des huiles essentielles *Ruta montana* L. de Batna au contact des levures s'est avérée forte, ceci est en accord avec les résultats en absences des tensioactifs

## Annexe

### Matériel non biologique

| Appareillages  | Verreries et autres   | Réactifs et solutions   |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>-Autoclave</li> <li>-Agitateur magnétique</li> <li>-Mixeur</li> <li>-Chauffe ballon</li> <li>-Support</li> <li>-Thermomètre</li> <li>-Balance de précision</li> <li>-Etuves bactériologiques (25°C, 35°C, 42°C)</li> <li>-Hydrodistillateur</li> <li>-Plaque chauffante</li> <li>-Hotte</li> <li>-Spectrophotomètre(UV)</li> <li>-Vertex</li> <li><b>-CPG : Hewlett Packard Agilent6890N piloté par Chemstation (NIST98).</b></li> <li><b>-Spectre de masse : model Agilent 5973</b></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Ampoules à décanter</li> <li>-Ballon à fond plat à col rodé</li> <li>-Béchers: 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 ML.</li> <li>-Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre</li> <li>-Burette 20 ml</li> <li>-Disques vierges</li> <li>-Écouvillons Stériles</li> <li>-Pipettes Pasteurs</li> <li>-Tubes à essai stériles</li> <li>-Entonnoir</li> <li>- Filtres</li> <li>-Eprouvette</li> <li>-Pince de laboratoire</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Eau de javel 12°</li> <li>-Eau distillée</li> <li>-Méthanol 95° et 70°</li> <li>-Éther diéthylique</li> <li>-Sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>So<sub>4</sub>)</li> <li>- Folin-Ciocalteu</li> <li>-Acide gallique</li> <li>-Acide tannique</li> <li>- Bicarbonate (CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>)</li> <li>-2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle(DPPH),</li> </ul> |