

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

THEME

**Etude *in vitro* de l'activité antioxydante et antibactérienne
des alcaloïdes extraits à partir de la plante *Ruta graveolens***

Présenté par :

LAH Hadjer

HAMDI Yamina

Devant le jury composé de :

Présidente :	M ^{me} . BOUNOUALA Fatima Zohra	MCB	U.A.T -Laghouat
Examinatrice	M ^{me} . BENABED Khedidja Houda	MCB	ENS -Laghouat
Encadreur :	M ^{me} . BOUSSOUSSA Hadjer	MCA	U.A.T-Laghouat
Co-encadreur :	M ^{me} . KHACHBA Ihcen	MCA	U.A.T-Laghouat

Année Universitaire : 2020/2021.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

THEME

**Etude *in vitro* de l'activité antioxydante et antibactérienne
des alcaloïdes extraits à partir de la plante *Ruta graveolens***

Présenté par :

LAH Hadjer

HAMDI Yamina

Devant le jury composé de :

Présidente :	M ^{me} . BOUNOUALA Fatima Zohra	MCB	U.A.T -Laghouat
Examinatrice	M ^{me} . BENABED Khedidja Houda	MCB	ENS -Laghouat
Encadreur :	M ^{me} . BOUSSOUSSA Hadjer	MCA	U.A.T-Laghouat
Co-encadreur :	M ^{me} . KHACHBA IHCEN	MCA	U.A.T-Laghouat

Année Universitaire : 2020/2021.

Remerciement

بسم الله الرحمن الرحيم

كل الحمد لله لمن بيده النواهي واليه اجتهادي واخلاصي

ثم الصلاة على من بعثه رحمة للأنام ومن تعجز عن وصفه الأقدام

محمد رسول الله صلى الله عليه وسلم تسليما كثيرا

أما بعد . . .

*A notre encadreur, Mme Boussoussa Hadjer et co-encadreur Mme KHAFERBA
Hcen, Docteurs au département de Biologie- université de Laghouat.*

Vous nous ont fait l'honneur d'avoir dirigés Et participé à ce travail.

Merci pour vos conseils précieux Ainsi que votre disponibilité.

A notre présidente de jury et notre examinatrice,

*Dr. BOUWOLLA Fatima Zohra et Dr. BENABED Khadija
Houda*

Nous vous remercions d'avoir consacré du temps pour lire et juger note travail.

Au chef de département de Biologie Université de Laghouat

Mr Chaibi R

Ainsi que tous les enseignants du département de biologie pour leur contribution à notre

formation et leur disponibilité à orienter les étudiants.

*Né nous oublions pas de remercier tout particulièrement Mm GUELLOUMA Fatima
pour son aide et son soutien durant ce travail.*

Enfin, nous remercions toute personne ayant contribué de près de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

Tout d'abord à mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont offert sans condition leur soutien.

A mes chers frères et surtout le bon frère Tayeb pour son soutien, je lui souhaite du succès dans Sa vie.

A mes très chères sœurs : keltoum et bohra.

*A mes amie : Fatna. S, Hadjer. T, Aicha. Khe, Hanane.lak ,
Noura. R et Khaira. Lab.*

A ma partenaire dans ce travail Hadjer Lah, pour son partage, sa patience durant ces années et je lui souhaite plus d'éclat dans sa vie.

A tous mes amis que j'ai vécus avec eux des beaux moments au cours de mon cursus à l'université.

*A toute la promotion 2020/2021 option Biochimie appliquée
Tous ceux et celles qui mon aidé.*



Famina

Dédicace

*Je dédie ce travail à ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde.
Mes chers parents qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie.
Qui m'ont apporté leur appui durant toutes mes années d'études, pour leur sacrifices et soutien et
m'ont toujours donné la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité.*

*A mes très chères et adorables sœurs Aicha, Houra et son mari Ismail
Et spécialement pour le prince Ammar Ahmed*

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

Keltoume, Fatna, Khayra, Hadjer, Aicha, Hanane, Houra et Halima

*A ma chère binôme Fatima a souvent soutenu moralement dans la réalisation de ce travail,
qu'elle trouve ici l'expression de mon profond remerciement.*

*Je remercie toutes les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de près ou
de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*



Hadjer

Résumé

Ruta graveolens L. est une plante aromatique médicinale, appartenant à la famille des Rutacées, appelée communément par la population locale « Fidjel ». Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle Algérienne et dans de nombreux pays pour l'expulsion du fœtus et du placenta et aussi pour les maladies inflammatoires. Notre travail porte sur l'étude de l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait d'alcaloïdes du *Ruta graveolens* de la région d'HASSI RMEL de la wilaya de LAGHOUAT. L'extraction des alcaloïdes a été effectuée sur la partie aérienne de la plante. Par la suite, on s'est intéressé à l'évaluation du pouvoir antioxydant par deux tests *in vitro* (piégeage de DPPH et PPM) puis, nous avons évalué l'activité antibactérienne de ces alcaloïdes sur deux souches à Gram (+) et à Gram (-). D'après les résultats d'extraction, nous avons obtenu un taux d'alcaloïdes d'environ 13,1%, et les résultats des tests de l'activité antioxydante montrent que notre extrait d'alcaloïdes possède une faible activité DPPH ($IC_{50}=29,66\pm 3,72\text{mg/ml}$) et PPM ($VAEAC=0,007\pm 0,002$) respectivement. Les résultats de test antibactérien par la méthode de diffusion par disque contre la souche *Escherichia coli* a révélé une résistance. Par contre, la souche *Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité intermédiaire, la détermination de la CMI en milieu liquide pour cette dernière a donné une valeur de $327,5\mu\text{g/ml}$.

Mots clés : *Ruta graveolens*, alcaloïdes, activité antioxydante, activité antibactérienne, DPPH, PPM.

Abstract

Ruta graveolens L. is an aromatic medicinal plant, belonging to the *Rutaceae* family, commonly called by the local population "Fidjel". It is used in the Algerian traditional medicine and many countries for the expulsion of the foetus and the placenta and also for the inflammatory diseases. Our work concerns the study of the antioxidant and antibacterial activities of the alkaloids extract of *Ruta graveolens* from the region of HASSI RMEL of the wilaya of LAGHOUAT. The extraction of alkaloids was performed on the aerial part of the plant. Then, we were interested in the evaluation of the antioxidant activity by two *in vitro* tests (DPPH and PPM trapping) then, we evaluated the antibacterial activity of these alkaloids on two strains with Gram (+) and Gram (-). From the extraction results, we obtained alkaloid content of about 13.1%, and the antioxidant activity test results show that our alkaloid extract has low activity on DPPH ($IC_{50}=29.66\pm 3.72\text{mg/ml}$) and PPM ($VAEAC=0.007\pm 0.002$) respectively. The results of antibacterial test by disc diffusion method against *Escherichia coli* strain showed resistance. On the other hand, the *Staphylococcus aureus* strain showed an intermediate sensitivity, the determination of the MIC in liquid medium for the latter gave a value of $327.5\mu\text{g/ml}$.

الملخص

السذاب، هو نبات طبي عطري ينتمي الى عائلة السذابية، ويطلق عليه السكان المحليون اسم " الفيجل "، يتم استخدامه في الطب التقليدي الجزائري وفي العديد من البلدان لانزال الجنين والمشيمة وكذلك للأمراض الالتهابية. يركز عملنا على دراسة للنشاط المضاد للأكسدة والمضاد للبكتيريا للمستخلص القلوي للسذاب من منطقة حاسي الرمل الاغواط، تم استخراج القلويدات من الجزء العلوي للنبات. بعد ذلك قمنا بتقييم نشاط مضادات الاكسدة من خلال اختبارين في المختبر (DPPH و PPM) ثم قمنا بتقييم النشاط المضاد للبكتيريا لهذه القلويدات على سلالتين جرام (+) وجرام (-). من نتائج الاستخلاص، تحصلنا على مستوى قلويد حوالي 13,1%، وأظهرت نتائج اختبار نشاط مضادات الاكسدة = IC50 (29,66 ± 3,72mg / ml و VAEAC = 0,007±0,002) ان المستخلص القلوي له نشاط منخفض. أظهرت نتائج اختبار مضاد للبكتيريا بطريقة الانتشار القرصي ضد سلالة الاشريكية القولونية وجود مقاومة من ناحية أخرى أظهرت سلالة المكورات العنقودية الذهبية حساسية متوسطة، حيث اعطى التقدير في الوسط السائل للأخيرة قيمة 327,5 ميكروغرام / مل.

Liste d'abréviations

% : pourcentage.

°C : degré Celsius.

µl : microlitre.

µm : micromole.

µM : micro Molaire.

AaEAc : Antioxydant Equivalente à Acide ascorbique

Abs : Absorbance.

AO : Agent oxydant.

ATP : Adénosine triphosphate.

CAT : Catalase.

cm : centimètre.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

Da : Dalton.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DPPH : 2,2-diphényl-1- (2,4,6-trinitrophényl) hydrazyle.

EAO : Espèces oxygénées activées.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

EtOH : Ethanol.

g : gramme.

g/l : gramme sur litre.

GPx : la Glutathion Peroxydase

GR : la Glutathion Réductase.

h : heure.

I% : pourcentage d'inhibition.

IC50 : Concentration en antioxydant capable de réduire 50% du radical libre.

MeOH : Méthanol.

MF : Mc Ferland.

MH : Mueller Hinton.

min : minute.

ml : millilitre.

mm : millimètre.

Mo⁺⁶, Mo⁺⁵ : Molybdate, Molybdène.

nm : Nano mètre.

OMS : l'Organisation mondiale de la Santé.

pH : Potentiel Hydrogène.

PPM : Phosphomlybdate.

SOD : Superoxyde Dismutase.

UV : Ultraviolet.

Vit C : Vitamine C.

Liste des figures

Figure 1 : la plante <i>Ruta graveolens</i> L	13
Figure 2 : Schéma représentative de la plante <i>Ruta graveolens</i>	14
Figure 3 : photo de la plante <i>Ruta graveolens</i>	18
Figure 4 : protocole d'extraction des Alcaloïdes de la plante <i>Ruta graveolens</i> par les solvants organiques.	19
Figure 5 : réaction de la radical DPPH avec un donneur d'hydrogène A (antioxydante).....	21
Figure 6 : Schéma du Protocol de test DPPH.	21
Figure 7 : Schéma du Protocol de test PPM.....	23
Figure 8: Schéma du Protocol de technique de dilution en milieu liquide.	26
Figure 9: Histogramme représentant une comparaison des rendements d'alcaloïdes de différentes plantes du genre <i>Ruta</i>	29
Figure 10: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de concentration de l'acide ascorbique.....	30
Figure 11: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de concentration des alcaloïdes de la plante <i>Ruta graveolens</i>	30
Figure 12: Courbe représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en standard (VitC).	32
Figure 13: Courbe représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en alcaloïdes de l'extrait du <i>Ruta graveolens</i>	33
Figure 14: Zone d'inhibition de notre extrait sur la boîte de <i>S.aureus</i> après l'incubation.....	34
Figure 15: Zone d'inhibition de notre extrait sur la boîte de <i>E.coli</i> après l'incubation.	35
Figure 16: les tubes de dilution en milieu liquide.	36

Liste des tableaux

Tableau 1: la classification des alcaloïdes	6
Tableau 2 : Quelques exemples des alcaloïdes avec leurs activités biologiques.....	7
Tableau 3 : les types des radicaux libres	9
Tableau 4: Travaux antérieurs sur l'activité antibactérienne de <i>Ruta graveolens</i>	12
Tableau 5: les méthodes d'études de l'activité antibactérienne.....	12
Tableau 6 : Systématique de la plante <i>Ruta graveolens</i>	13
Tableau 7: Le rendement, couleur et aspect de l'extrait brut de la plante <i>Ruta graveolens</i> . ..	28
Tableau 8: Comparaison des rendements d'alcaloïdes de différentes plantes du genre <i>Ruta</i> avec lieu et période de récolte.	28
Tableau 9: Le pourcentage d'inhibition à 50% de l'extrait et le standard.	31
Tableau 10: la concentration d'inhibition de différentes espèces de <i>Ruta</i> de différentes régions.	31

Table des matières

Résumé	I
Liste d'abréviations	IV
Liste des figures.....	V
Liste des tableaux	VI
Introduction	2

Chapitre I : Aperçu bibliographique

I.1 Les métabolites secondaires	5
I.1.1 Les types métabolites secondaires.....	5
I.1.2 Les alcaloïdes	6
I.2 Les radicaux libres	7
I.2.1 Les types des radicaux libres.....	8
I.3 Le stress oxydatif	9
I.4 Les antioxydants.....	10
I.4.1 Classification.....	10
I.5 L'activité antibactérienne.....	11
I.5.1 Travaux antérieurs sur l'activité antibactérienne de <i>Ruta graveolens</i>	11
I.5.2 Les méthodes d'étude de l'activité antibactérienne	12
I.6.1 Description morphologique de la plante	13
I.6.1.1 Systématique de la plante.....	13
I.6.1.3 Description botanique de la plante	14
I.6.1.4 Utilisation traditionnelle.....	15
I.6.1.5 Composition chimique	15
I.6.1.6 Activités biologiques.....	15
I.6.1.7 La toxicité de la plante	16

Chapitre II : Matériels et Méthodes

II.1 Récolte de la plante d'étude.....	18
II.2 Produits chimiques.....	18
II.3 Extraction des alcaloïdes.....	18
II.3.1 Macération (extraction solide-liquide).....	18

II.3.2 Extraction liquide-liquide	18
Détermination du rendement	20
II.4 Evaluation de l'activité antioxydante.....	20
II.4.1 Test de DPPH.....	20
II.4.2 Test de phosphomolybdate	22
II.5 Evaluation de l'activité antibactérienne.....	23
II.5.1 Méthode de diffusion sur gélose (sur disque)	23
II.5.2Détermination de CMI par technique de dilution en milieu liquide	26

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1 Le rendement de l'extraction	28
III.2 Evaluation de l'activité antioxydante	29
III.2.1 Résultat du test de DPPH.....	29
III.2.2 Résultat du test de phosphomolybdate (PPM).....	32
III.3 Evaluation de l'activité antibactérienne :	34
III.3.1 Méthode de diffusion par disques.....	34
III.3.2 Détermination de CMI.....	35
Conclusion et perspective.....	39
Annexe.....	41
Référence.....	43

The page features decorative red lines in the corners. In the top right, there are two horizontal lines and one vertical line. In the bottom left, there are two vertical lines and two horizontal lines.

Introduction

Introduction

Le règne végétal contient plusieurs plantes, mais nous ne pouvons pas dire que toutes les plantes sont des plantes médicinales. Ces dernières possèdent plusieurs définitions parmi elles, celle qui les définit comme des plantes utilisées en médecine traditionnelle grâce à leurs effets thérapeutiques préventifs ou curatifs pour certaines maladies, cette propriété provient de la présence d'un nombre de substances actives dont la plupart agissent sur l'organisme humain. (Iserin, et *al.*, 2001)

Les remèdes traditionnels à partir des plantes médicinales sont utilisés jusqu'aujourd'hui sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables à ces actions bien qu'aient été attribués à des métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, des terpènes, stéroïdes et des composés phénoliques. (Hamidi, 2013)

L'utilisation de ces remèdes diminue en présence de médicaments. Cependant 25-30% de ces médicaments, qui sont disponibles pour le traitement des maladies, sont tirées directement ou indirectement des plantes médicinales. Donc, les métabolites secondaires ont des applications dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et des insecticides. Parmi les activités biologiques attribuées aux plantes médicinales, l'activité antioxydante se révèle parmi les plus importantes en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant. (Rahmani & Boulanouar, 2019)

Le développement de la résistance des microorganismes aux antibiotiques classiques, a créé un besoin impérieux de renouvellement constant des principes actifs, et la toxicité des antioxydants synthétiques a conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires en quête de molécules naturelles efficaces et dénuées de tout effet adverse. (Moroh, 2013)

Dans ce contexte, nous aborderons la recherche d'une source naturelle ayant pour son effet antibactérien et antioxydant à partir la plante du *Ruta graveolens*.

Vu l'usage traditionnel de la plante *Ruta graveolens* contre plusieurs maladies (l'expulsion du fœtus et du placenta, maladies inflammatoires), nous nous sommes intéressés dans ce travail à évaluer les propriétés antioxydantes et antibactériennes *in vitro* de ces extraits alcaloïdes.

Notre travail sera présenté comme suit :

Dans le premier chapitre, nous avons essayé dans un premier temps de donner une synthèse bibliographique concernant les métabolites secondaire, le stress oxydatif, les différents antioxydants et méthodes d'étude de l'activité antibactérienne.

Nous avons ensuite entamé un deuxième chapitre qui présente notre plante, décrit le matériel utilisé lors du travail expérimental et les méthodes d'extractions des alcaloïdes, les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH et phosphomolybdate) et les méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.

Nous avons exposé dans le troisième chapitre de ce mémoire l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion.

Nous terminons par conclusion générale et perspectives de ce travail.



Synthèse bibliographique

I.1 Les métabolites secondaires

Les métabolites primaires sont des composés naturels produits à partir des plantes lors de la photosynthèse impliquées dans les grandes voies du métabolisme basal de la cellule, par contre les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes (Gantait, et *al.*, 2021), leur rôle majeur c'est l'adaptation des végétaux à leur environnement. Ils assurent des fonctions principales dans la résistance aux facteurs biotiques (phytopathogène, herbivores...) et abiotiques (UV, température...). (Thakur, et *al.*, 2019)

En pharmacologie, les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés chimiques présents chez les végétaux et on estime aujourd'hui qu'environ 1/3 des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale. Cette efficacité pharmacologique des métabolites secondaires s'est traduite par le développement de médicaments majeurs sur les 30 dernières années. (Togola, et *al.*, 2019)

I.1.1 Les types métabolites secondaires

Ils sont divisés principalement en trois grandes familles : Les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes.

I.1.1.1 Les polyphénols

Les polyphénols ou les composés phénoliques sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. Les polyphénols comportent plusieurs familles : les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques, les stilbènes et lignane. (Gantait, et *al.*, 2021)

I.1.1.2 Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels résultant de la combinaison de plusieurs unités d'isoprène (C_5H_8), de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte. Ils sont des constituants habituels des cellules végétales, on les trouve fréquemment dans les huiles volatiles des plantes. Ils sont classés selon le nombre n en : monoterpènes (composés en C_{10}), sesquiterpènes (C_{15}), diterpènes (C_{20}), sesterpènes (C_{25}), triterpènes (C_{30}) et tétraterpènes. (Koné, 2018)

I.1.2 Les alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques (Bouvry, 2020).

Ils sont des composés de masse moléculaire variant 100 à 900 Da, ont une saveur amère et leur solubilité varie en fonction du pH. A l'état naturel, les alcaloïdes existent le plus souvent sous forme de sels d'acides minéraux ou organiques et parfois des combinaisons (avec les tanins en particulier). Ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 différentes structures) (Koné, 2018).

I.1.2.1 La classification des alcaloïdes

Les alcaloïdes classés selon plusieurs critères l'origine biosynthétique et selon leur structure (tableau1)

Tableau 1: la classification des alcaloïdes. (BENMENNI, 2017)

Selon l'origine Biosynthétique	Les alcaloïdes vrais	Sont des substances complexes azotées d'origine naturelle et de distribution restreinte (atome d'azote inclus dans un hétérocycle)
	Les Pseudo- alcaloïdes	Sont des substances complexes azotées d'origine biosynthétique (dérivés d'isoprénoïdes et du métabolisme de l'acétate)
	Les proto- alcaloïdes	Sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique (élaborés à partir d'acides aminés)
Selon leur composition chimique et structure moléculaire	Indole, Quinoline, soquinoline, Tropane, Pyridine, Quinolizidine, Morphine, Solanidine	

I.1.2.2 Les activités biologiques des alcaloïdes

Il existe plusieurs activités biologiques des alcaloïdes des différentes plantes, quelques exemples sont présentés dans le tableau 2 suivant.

Tableau 2 : Quelques exemples des alcaloïdes avec leurs activités biologiques.

Alcaloïdes	Activités biologique	Les plantes	Référence
Alcaloïdes diterpénoïdes	Anti-inflammatoire	<i>Delphinium staphysagria</i>	(Faridi, et al.,2014)
Alcaloïdes Isoquinoline	Antiproliférative contre les cellules cancéreuses du sein	<i>Fumaria agraria</i>	(Bougoffa-Sadaoui, et al., 2016)
Alcaloïdes indole	Cytotoxique contre les cellules tumorales	<i>Gelsemium elegans</i>	(Wang, et al., 2018)
Alcaloïdes Isoquinoline	Anti-plasmidique	<i>Actinodaphne macrophylla</i>	(Fadaeinasa b, et al., 2015)
Alcaloïdes indole	Antibactérienne	<i>Laurencia similis</i>	(Li, et al., 2016)
Alcaloïdes totale	Antiviral	<i>Peganum harmala</i>	(Moradi, et al., 2017)

I.2 Les radicaux libres

L'oxygène c'est une molécule indispensable à la vie et susceptible d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme via la formation de radicaux libres et d'espèces oxygénées activées (EOA).il est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule toute l'énergie nécessaire (sous forme d'adénosine triphosphate ATP) pour assurer ses multiples fonctions. (BENMENNI, 2017)

Donc, les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui contiennent un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés) sur l'orbite externe. Ils sont générés au cours du fonctionnement normal, ces radicaux sont toujours en tendance de remplir ses orbitales en captant un électron pour devenir plus stables (demi de vie courte).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, on distingue deux formes :

Les radicaux primaires qui sont dérivés de l'oxygène par des réductions à un électron telle l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO.

L'autre espèce dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulier 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux.

L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs sont souvent appelés espèces réactives de l'oxygène (**ERO**) (Guillouty, 2016).

La plupart des radicaux libres proviennent de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le rôle des ERO est très complexe car elles peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration (par l'augmentation de fabrication des ERO ou par la diminution d'élimination des antioxydants). (Desmier, 2016)

I.2.1 Les types des radicaux libres

Selon (HAMMA, et *al.*, 2015) les radicaux libres sont présentés dans le tableau 3

Tableau 3 : les types des radicaux libres. (HAMMA, et *al.*, 2015)

Oxygène	O ₂
Oxygène singulier	¹ O ₂
Anion super oxyde	O ₂ ^{·-}
Radical hydroxyle	OH [·]
Radical hydroperoxyde	HOO [·]
Radical peroxyde	ROO [·]
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO [·]
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Monoxyde d'azote	NO [·]
Peroxynitrite	ONOO ⁻

I.3 Le stress oxydatif

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydants de l'organisme. La balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre (Desmier, 2016). Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant ». Donc Le stress oxydant se définit comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels. En faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme. A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires. (KASSI, et *al.*, 2020)

I.4 Les antioxydants

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. (Desmier, 2016)

Notre organisme est équipé de tout un système complexe de défenses antioxydants qui est présent dans tous les compartiments de l'organisme qu'il soit intracellulaire, membranaire ou extracellulaire. Ils peuvent être soit exogène (provenant essentiellement des apports alimentaires) soit endogène (produits directement par l'organisme). Les antioxydants sont des substances capables de prévenir, réduire ou réparer des dégâts occasionnés par les radicaux libres. Il peut diminuer ou empêcher l'oxydation cellulaire. (Guillouty, 2016)

I.4.1 Classification

Les antioxydants sont classés dans deux grandes catégories différentes :

I.4.1.1 Les antioxydants synthétiques

Sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers que les antioxydants naturels. Ils sont introduits dans toutes les formulations contenant des corps gras insaturés. Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques en cas d'excès de consommation. (HAMMA, et al., 2015)

I.4.1.2 Les antioxydants naturels

Ils comportent des systèmes antioxydants enzymatiques et des systèmes antioxydants non enzymatiques. (HAMMA, et al., 2015)

Antioxydants Enzymatiques endogènes synthétisées par l'organisme. Il s'agit principalement du superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR).

Antioxydants non enzymatiques exogènes apportés par l'alimentation. Ils sont des produits extraits de plantes et en particulier des épices : glutathion, la vitamine C et l'acide urique, les vitamines E, C et A le β -carotène, bilirubine et le groupement thiol. (HAMMA, et al., 2015)

I.5 L'activité antibactérienne

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multirésistance bactérienne. (Konaté, et *al.*, 2019)

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Ces plantes constituent une source importante de molécules bioactives contre les infections bactériennes qui font généralement partie des métabolites secondaires. Parmi elles : les coumarines, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes, les flavonoïdes et les alcaloïdes. (Bouharb, et *al.*, 2014 ; Bouyahya, et *al.*, 2017)

Face au problème posé par les résistances des microorganismes aux antibiotiques classiques, il y a un besoin impérieux de renouvellement constant des principes actifs. Ces molécules recherchées doivent posséder diverses autres propriétés chimiques et utiliser de nouveaux mécanismes d'action contre ces microbes pathogènes. Les plantes médicinales restent la source la plus importante de molécules entrant dans la composition des médicaments pharmaceutiques. (Roth, et *al.*, 2019)

L'activité antibactérienne des alcaloïdes a été étudiée de façon extensive durant la période 1940- 1980 c'est grâce aux études de Fontaine et *al.*, (1948) qui a démontrée pour la première fois l'effet antibactérien d'un alcaloïde : la tomatine présente chez le genre botanique *Lycopersicon*. Les différentes études de l'effet antibactérien des alcaloïdes ont démontré que ces derniers agissent sur les bactéries Gram positives et Gram négatives, dans les années 1990 les alcaloïdes les mieux étudiés du point de vue de l'effet antibactérien sont la berbérine et la sanguinarine. (Raji, et *al.*, 2019 ; Thawabteh, et *al.*, 2019)

I.5.1 Travaux antérieurs sur l'activité antibactérienne de *Ruta graveolens*

Parmi les travaux antérieurs qui ont été effectués sur la plante *Ruta graveolens*, sont mentionnés dans le tableau 4 ci-dessous

Tableau 4: Travaux antérieurs sur l'activité antibactérienne de *Ruta graveolens*.

Souche bactérienne	La substance active	Référence
<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> et <i>Klebsiella pneumonia</i>	Huile essentielle des feuilles de <i>Ruta graveolens</i>	(Eman Zekry, et al., 2018)
<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> et <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Les composées phénoliques	(Bayoud, et al., 2007)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> et <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Las alcaloïdes	(Bayoud, et al., 2007)
<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i> et <i>S. aureus</i>	Les phénol totaux	(Valentina, et al., 2019)

I.5.2 Les méthodes d'étude de l'activité antibactérienne

Afin d'étudier l'activité antibactérienne de notre extrait d'alcaloïdes, nous avons utilisé les méthodes indiquées dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5: les méthodes d'études de l'activité antibactérienne. (Mohammadi Motamed, et al., 2014)

La méthode	Le principe
Technique de dilution en milieu liquide	C'est une technique permet de calculer la concentration minimale inhibitrice CMI de l'agent antimicrobienne qui est capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée.
Méthode de diffusion en gélose (sur disque)	C'est une méthode qui consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antibactérienne de l'extrait d'alcaloïde de la plante en des disques sur un milieu solide (boite de Pétri), en présence des germes testés.

I.6.1 Description morphologique de la plante

Définition

Ruta graveolens, est une plante médicinale, aux feuilles persistantes, fortement odoriférante ou un petit arbuste, appartenant à la famille des Rutacées (Figure 1). Il est d'origine de la région méditerranéenne, distribuée dans le monde entier et cultivée comme plante médicinale et ornementale. Il contient plus de 120 composés naturels comprenant principalement : les Alcaloïdes, les coumarines, les huiles essentielles et les flavonoïdes. (Reza, et al., 2020).



Figure 1 : la plante *Ruta graveolens* L. (Ecosostenibile, 2017)

I.6.1.1 Systématique de la plante

La systématique de la plante *Ruta graveolens* est citée dans le tableau 6 suivant

Tableau 6 : Systématique de la plante *Ruta graveolens*. (Ozenda, 1977)

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Sapindales
Famille	Rutaceae
Genre	Ruta
Espèce	<i>Ruta graveolens</i> L

I.6.1.2 Nom vernaculaire

Ruta graveolens

- Le nom du latin signifie : *gravis*, « lourd », et *olor*, « odeur » Rue à odeur forte (Reza, et al., 2020)
- L'efficacité de *Ruta* dans diverses maladies a inspiré les Grecs à le nommer *Ruta*, c'est-à-dire libre. (Reza, et al., 2020)

Français La Rue officinale / Rue des jardins ou Rue fétide

Anglais Rue, Garden Rue, Herb of grace

Arab السذاب الازفر, سذاب شديد الرائحة الفيجل (Parry SA, 2012)

I.6.1.3 Description botanique de la plante

C'est une plante herbacée vivace, parfumée et glabre ou un sous-arbuste ; pouvant atteindre jusqu'à un mètre d'hauteur ; La tige est mince, lisse, verte glauque pâle. Les feuilles sont composées, linéaires-ovales ou oblongues, glanduleuses et glauques. L'inflorescence est corymbe terminale, cymes irrégulièrement dichotomiques. (Badhusha, 2020)

Les fleurs sont bisexuées régulières (hermaphrodite), les fleurs terminales sont pentamères et les autres sont tétramères. Les pétales sont distincts, largement étalés, jaune verdâtre, larges et encapuchonnés au sommet, brusquement reliés à une étroite griffe en dessous, bord ondulé et parfois denté (figure 2). Les fruits sont secs, durs, arrondis, 4-5 lobés émoussés au sommet. (Reza, et al., 2020)



Figure 2 : Schéma représentative de la plante *Ruta graveolens*. (Ecosostenibile, 2017)

I.6.1.4 Utilisation traditionnelle

En ancien, *Ruta graveolens* L. est utilisée pour plusieurs maladies inflammatoires. L'huile de rue est couramment utilisée comme agent antiviral, dans certaines dermatoses, eczéma et psoriasis, et comme rubéfiant médicament homéopathique. (Badhusha, 2020)

La décoction de *Ruta graveolens* est utilisée pour soulager les flatulences et la colite. L'utilisation locale avec du miel est un bon traitement pour la paralysie, les tremblements, les douleurs articulaires et les troubles nerveux. Étant un analgésique, il est utile dans la douleur thoracique causée par la pneumonie et la pleurésie. Il est également utile dans la dyspnée, la sciatique, la goutte et l'arthrite. (Badhusha, 2020)

Les feuilles de rue sont utilisées en suppositoire ou en tampon pour application extra-vaginale ou administrées par voie orale sous forme de sirop en cas d'aménorrhée. Il aide à l'expulsion du fœtus et du placenta. Il a des propriétés litholytiques contre les calculs rénaux et vésiculaires. (Reza, et al., 2020)

I.6.1.5 Composition chimique

Les constituants chimiques présents comprennent la rutine (2%), l'imperatorine, l'isoimperatorine, la xanthotoxine, le bergaptène et le psoralène. Les alcaloïdes graveoline, gravelinine, rutamine, rutamarine sont également présents dans l'herbe. L'analyse des graines a donné les valeurs suivantes : substances azotées 21,6%, huile fixe 36,8% et cendres 13,8%. L'huile de graines est composée en acides gras : acide palmitique 21,8%, acide stéarique 9,1%, acide oléique 22,0% et acide linoléique 44,5%. La matière insaponifiée contient de l'alcool céryl, du sitostérol et de nouvelles coumarines. (Parray SA, 2012)

I.6.1.6 Activités biologiques

La rue possède plusieurs activités biologiques, dont certains ont été découvertes depuis l'antiquité, et les plus récents. Parmi elles :

Anti-inflammatoire (Ratheesh & Helen, 2007), Anti-leishmaniose, Antiparasitaire (De Queiroz, 2014), Anti-Schistosomiase (Carvalho, 2019), Fongicides naturels (Oliva, 2003), Antibactérienne (Orlanda, 2015), Antimicrobienne (Attia EZ, 2018), Antioxydant (Pandey P, 2011), Anti-hyperglycémie (Ahmed OM, 2010), Anticancers (Rethy B, 2007), Activité antiarythmique (Khorri, 2008), Activité anti-conceptive et Anti-fertilité (A-Mahmoud MS, 2003).

I.6.1.7 La toxicité de la plante

L'utilisation de la rue à grandes quantités peut être mortelle, et son ingestion accidentelle provoque des douleurs à l'estomac, des vomissements, de l'épuisement, de la confusion et des convulsions. La plante est irritante et vésicante, en particulier dans la chaleur de l'été ; le contact des fleurs et des fruits a produit un érythème, avec une sensation de brûlure, des démangeaisons et une vésication. (Dhale, 2010)



Matériel et Méthodes

II.1 Récolte de la plante d'étude

Notre plante a été récoltée dans la région 32.94589 degré N, 3,27.365 degrés E HASSI RMEL de la wilaya de LAGHOUAT/ ALGERIE durant le mois Mars 2020.

Après la récolte, la partie aérienne de la plante (Figure 03) est séchée à température ambiante à l'abri de la lumière, broyée, tamisée et stockée dans un endroit sec et obscuré jusqu'à leur utilisation.



Figure 3 : photo de la plante *Ruta graveolens*. (la bardane, 2020)

II.2 Produits chimiques

L'éthanol, chloroforme, dichlorométhane, $\text{NH}_4 \text{OH}$, Na_2SO_4 , DMSO, MeOH, DPPH, acide ascorbique, acide sulfurique, phosphate de sodium, molybdate d'ammonium et milieu MH.

II.3 Extraction des alcaloïdes

II.3.1 Macération (extraction solide-liquide)

Est une méthode traditionnelle, elle a été largement utilisée, basée sur le transfert de la matière entre la phase « solide » qui contient la matière à extraire, et le solvant d'extraction « liquide », par la mise en contact la matière végétale avec le solvant avec/sans agitation, à température ambiante pour une durée déterminée. Cette technique est utilisable pour l'extraction des molécules fragile et thermolabile à température ambiante pour le maintien de l'intégrité des molécules bioactifs. (Allouni, 2018)

II.3.2 Extraction liquide-liquide

Est un processus qui permet la séparation et la transformation d'une ou plusieurs substances entre deux phases liquides. Dans la majorité des cas, l'une des phases est aqueuse et l'autre phase est constituée d'un solvant organique « solvant d'extraction » immiscible avec la phase aqueuse. Cette extraction est réalisée par le contact de la solution contenant les constituants à séparer « soluté » avec l'autre phase liquide « solvant », dans des appareils destinés à mélanger les deux phase (ampoules, colonnes ...). (GUERDOUH, 2017)

Protocole

Une quantité de 5g de la poudre de la plante (*Ruta graveolens*) est introduite dans un flacon en verre contenant 50ml d'éthanol absolu pour une macération de 48h à température ambiante et à l'obscurité. Le macérât obtenu est en suit filtré par le papier filtre, et évaporé sous pression réduite à 55°C, pour l'extraction liquide-liquide (Figure 04). (Benarous, et *al.*, 2015)

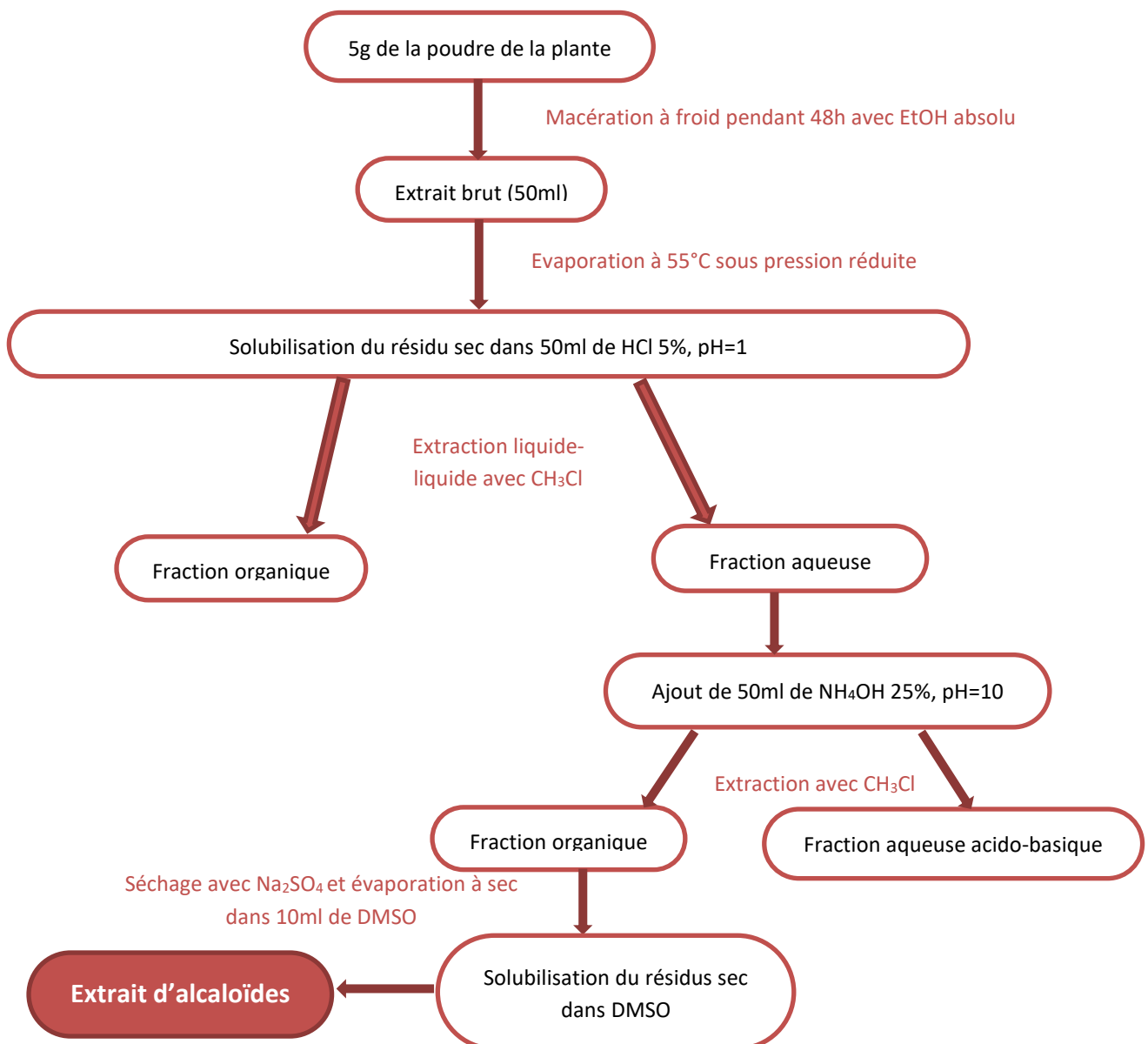


Figure 4 : protocole d'extraction des Alcaloïdes de la plante *Ruta graveolens* par les solvants organiques.

Détermination du rendement

Le rendement des alcaloïdes est le rapport entre la masse de l'extrait déterminée après l'évaporation du solvant et la masse initiale de la plante à traiter. Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante. (Celia, 2015)

$$R (\%) = \frac{\text{la masse final}}{\text{la masse initial}} \times 100$$

R : le rendement en pourcentage (%).

La masse finale : la masse du résidu après l'évaporation (g).

La masse initiale : la masse initiale de la plante utilisée (g).

II.4 Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de la pouvoir antioxydante et anti-radicalaire de notre extrait est mesuré par deux méthodes colorimétriques à savoir le teste DPPH et Phosphomlybdate, et les résultats sont comparés aux étalons de références acide ascorbique (la vit C). Tous les essais ont été effectués deux fois afin de vérifier la reproductibilité.

II.4.1 Test de DPPH

Principe

Le test DPPH (2,2-diphényl-1- (2,4,6-trinitrophényl) hydrazyle) est une méthode colorimétrique standard, très populaire et très fréquemment utilisée pour tester la capacité des composés à agir comme piègeurs des radicaux libres ou des donneurs d'hydrogène. (Sirivibulkovit, 2018)

Le DPPH est un radical stable en solution et apparaît de couleur violette absorbant à 515-520 nm dans le méthanol, où le DPPH accepte un atome d'hydrogène (H) de la molécule de piègeur, cela se résulte réduction de DPPH, qui change sa couleur violette au jaune (figure 05). Le changement de la couleur est surveillé par spectrophotométrie et utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante. (Sirivibulkovit, 2018)

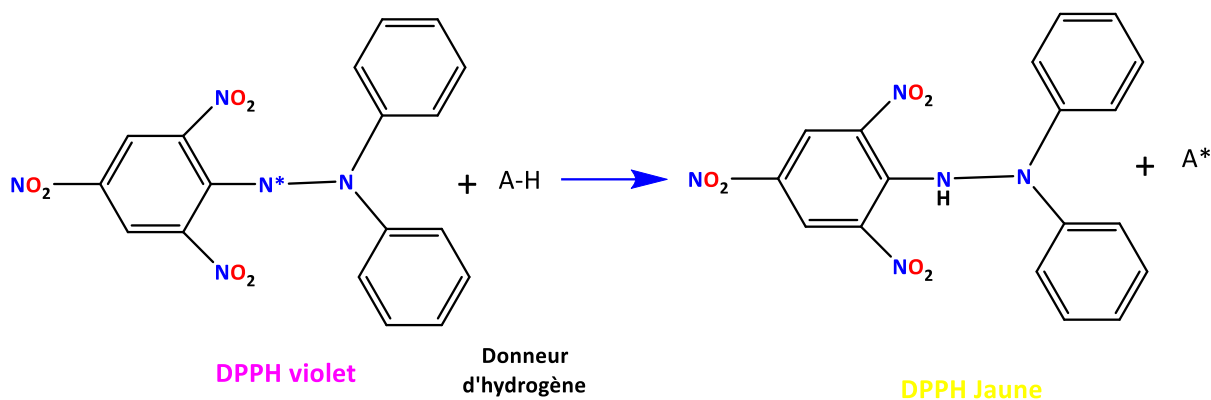


Figure 5 : réaction de la radical DPPH avec un donneur d'hydrogène A (antioxydante).
(Sirivibulkovit, 2018)

Préparation de la solution de DPPH

Une solution de DPPH méthanolique est préparée à 250 µM.

Protocole

500µl d'extrait dilué deux fois par méthanol dans chaque tube avec différentes concentrations sont mélangées avec 500µl de solution méthanolique de DPPH.

Tous les tubes sont bien mélangés et incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30min. lecture de l'absorbance à 517nm contre un blanc (figure 06).

A₀ ou le contrôle est composé de 500µl de solution DPPH + 500µl de méthanol. Est préparé dans la même manière de l'extrait.

L'activité antioxydante du standard (vitamine C de concentration 0,01g/l) a été mesurée suivant la procédure citée précédemment. (Blagojević, et *al.*, 2021)

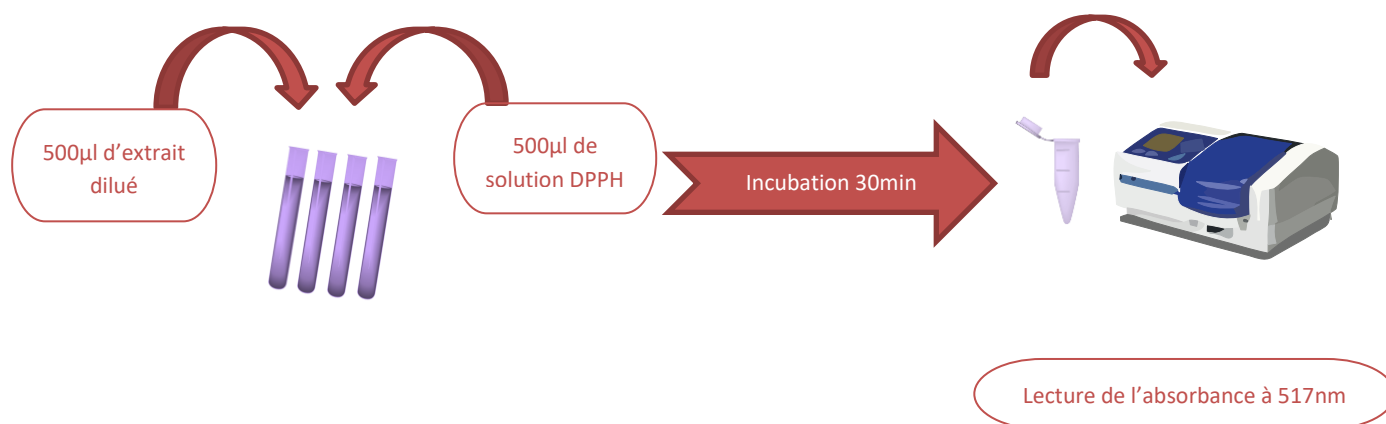


Figure 6 : Schéma du Protocole de test DPPH.

Calcul de IC₅₀

Le pourcentage d'inhibition I% est calculé à partir de la relation suivante : (Gali & Bedjou, 2019)

$$I\% = \frac{A_c - A_e}{A_c} \times 100\%$$

Où : **A_c**: Absorbance du control en absence de l'antioxydant après 30 min d'incubation.

A_e: Absorbance des échantillons mesurés après 30 min d'incubation.

II.4.2 Test de phosphomolybdate

Principe

C'est un test colorimétrique de mesure de la capacité antioxydante totale non enzymatique, en utilisant le phosphomolybdate d'ammonium, basée sur la réduction de molybdate Mo⁺⁶ au molybdène Mo⁺⁵ par un composé antioxydant. Ceci conduit à la formation d'un complexe phosphate/Mo⁺⁵, de couleur verte détectable en spectrophotométrie en mesurant le changement de l'absorbance à 695 nm. (Cheurfa & Allem, 2016)

Préparation de la solution de phosphomolybdate

Préparation de la réactive qui contient (0,6 M) d'acide sulfurique, (28 mM) phosphate de sodium et (4 mM) molybdate d'ammonium.

Protocole

200µl d'extrait dilué avec l'eau distillée de chaque tube avec différentes concentrations sont mélangés avec 2ml de solution de phosphomolybdate déjà préparée.

Tous les tubes sont bien mélangés et incubés dans un bain marie à 90°C pendant 90min. lecture de l'absorbance à 695nm contre un blanc (200µl eau distillé +2ml réactif) (figure 07). L'activité antioxydante du standard (vitamine C) a été mesurée suivant la procédure citée précédemment. (Abdel-Wahab, et al., 2018)

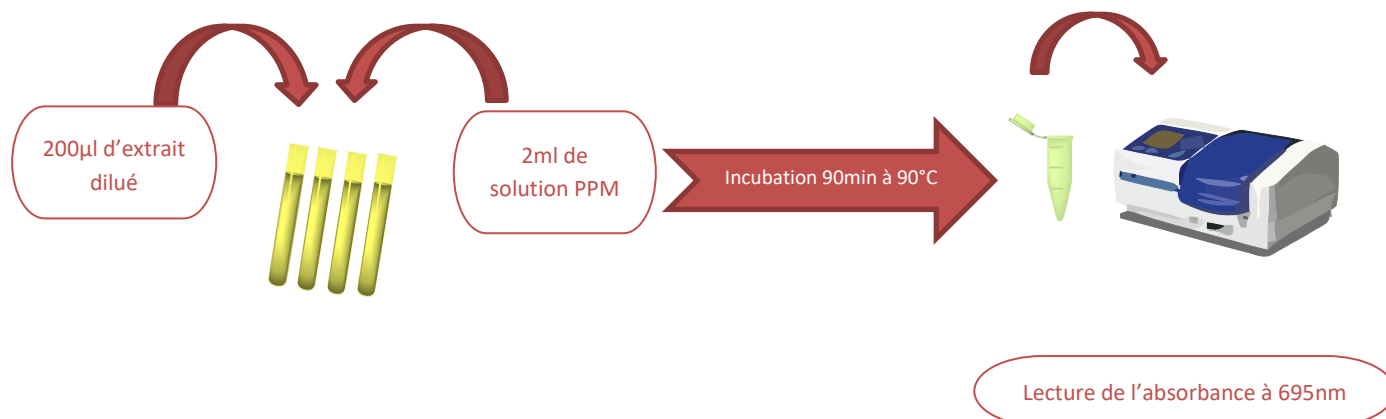


Figure 7 : Schéma du Protocole de test PPM.

II.5 Evaluation de l'activité antibactérienne

Ce test est réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie de l'hôpital universitaire Colonel Lotfi -Laghouat-

L'activité antibactérienne de l'extrait des alcaloïdes de la plante *Ruta graveolens* a été déterminée par la méthode de diffusion par disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries. Nous avons utilisé la technique de dilution en milieu liquide pour calculer la CMI.

II.5.1 Méthode de diffusion sur gélose (sur disque)

C'est une méthode qui consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antibactérienne de l'extrait d'alcaloïde de la plante en des disques sur un milieu solide (boîte de Pétri), en présence des germes testés.

La diffusion de l'extrait dans la gélose nous a permis de suivre l'inhibition et la croissance des germes qui se traduira par une zone claire autour de disque dite zone d'inhibition.

Et permis de classées les bactéries selon leur zone d'inhibition comme suit :

Sensible : l'infection provoquée par la souche testée répondra probablement au traitement par cet antibiotique (diamètre>13mm)

Résistant : l'infection provoquée par la souche testée ne répondra probablement pas au traitement à cet antibiotique. (Diamètre < 6mm)

Intermédiaire : la réponse au traitement est imprévisible (diamètre < 13mm). (Mohammadi, et al., 2014)

Souches bactériennes utilisées

Nous avons testé l'activité de l'extrait avec deux souches des bactéries *Escherichia coli* (gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (gram positif), ces souches issues des prélèvements des malades de l'hôpital (Figure 9 et 10).



Figure 8 : la souche utilisée de *E.coli* en milieu gélose nutritif. *Staphylococcus aureus*

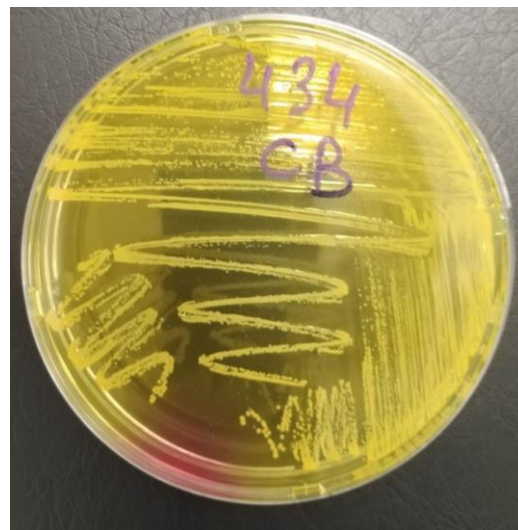


Figure 9 : la souche utilisée de *S.aureus* en milieu chapman

Cocci à GRAM positif, de la famille des Micrococcaceæ, immobile et disposées en grappe de raisins, présente sur le corps et les muqueuses, et souvent responsable d'infections graves communautaires et nosocomiales (20 % des cas). Cette bactérie est responsable d'infections des plaies, de la peau et du sang. Elle peut entraîner aussi des abcès, des ostéites, des endocardites, des gastroentérites et des infections pulmonaires. L'espèce Staphylocoque doré acquiert facilement des résistances aux antibiotiques. (Jenul & Horswill, 2019)

Escherichia coli

Est un bacille à gram négatif, de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm). C'est un saprophyte normal du tube intestinal de l'homme et des

animaux. C'est l'un des agents responsables de septicémies, de suppurations, de diarrhées et même de dysenteries. (Jang, et *al.*, 2017)

Milieu de culture utilisé

Nous avons utilisé le milieu de gélose Mueller Hinton (MH), qui est fondue et coulée dans des boîtes de Pétri de 9 cm de façon à obtenir une épaisseur de 4 mm, Les boîtes sont séchées à l'étuve avant emploi pendant une heure. Les boites sont stériles sous l'hôte avec UV.

Préparation de l'inoculum bactérien de chaque bactérie

Raclar à l'aide d'un écouvillon stérile quelques colonies bien isolées à partir d'une culture pure, puis procéder à des dilutions, émulsionner ces colonies dans 5ml d'eau physiologique jusqu'à l'obtention d'une absorbance à 625nm entre 0,08 et 0,1, pour une concentration de 0,5 Mac Ferland (10^8 CFU/ml), puis on agite au vortex pendant quelques secondes bien homogénéiser la suspension bactérienne. (Rahal, 2011).

Protocole expérimental

Tremper l'écouvillon dans l'inoculum et frotter sur la totalité de la surface gélosée, en stries serrées. Passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose, en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum. Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes.

Les disques du papier wattman n°4 stérilisés sont déposés délicatement à l'aide d'une pince préalablement flambée au bec Bunsen sur la gélose inoculée, puis imprégnés à l'aide d'une micropipette par 20 µl de chaque concentration de l'extrait pure, dilués deux fois et dix fois respectivement 65,5mg/ml, 32,75mg/ml et 6,55mg/ml. Nous utilisons le disque de la gentamicine comme un contrôle positif et le DMSO comme un contrôle négatif. Les boites de pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante pendant 30min, puis incubées à l'étuve à une température de 37°C pendant 24h.

L'activité antibactérienne a été évaluée par la mesure de diamètre d'inhibition autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse à travers le fond de la boîte de Petri fermée,

correspond à l'absence de la croissance et plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible. (Rahal, 2011)

II.5.2 Détermination de CMI par technique de dilution en milieu liquide

L'organisation mondiale de la santé OMS a donné une définition très précise de la concentration minimale inhibitrice CMI, c'est la concentration la plus faible de l'agent antimicrobienne capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu, après une période d'incubation donnée. (Allouni, 2018)

Il existe trois techniques de détermination de la valeur de CMI : technique de dilution en gélose, technique en dilution en milieu liquide et technique d'E-test, dans ce travail nous avons utilisé la deuxième technique. La CMI est indiquée par le tube qui contient la plus faible concentration de produit et où aucune croissance n'est visible. Classifier les bactéries dans la catégorie R, I ou S selon le résultat. (Rahal, 2011)

Protocole expérimental

Nous avons réparti dans des tubes stériles 700 μ l de milieu MH liquide, 50 μ l de suspension bactérienne 0,5MF et on ajoute 250 μ l d'extrait, chaque concentration déposée dans un tube. (Figure 10)

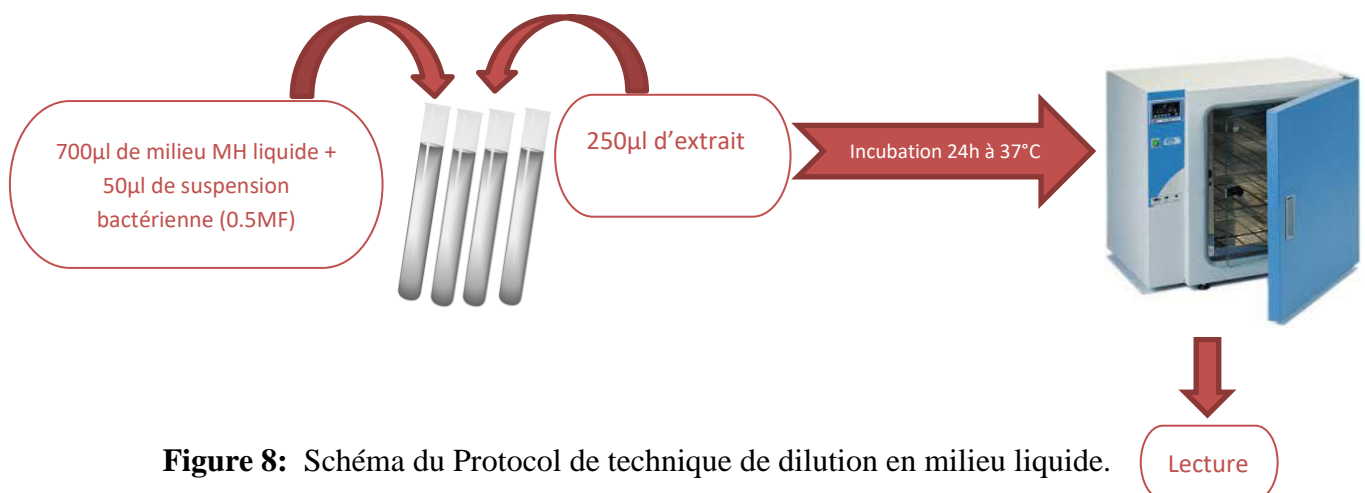


Figure 8: Schéma du Protocole de technique de dilution en milieu liquide.

On réalise à partir de la solution mère, les dilutions semi-logarithmiques de raison 2 ; on obtient des concentrations intermédiaires allant de 409,37 μ g/ml à 3275 μ g/ml, après avoir bien agité au vortex, on recouvre les tubes avec leur bouchon, et on incube pendant 18 à 24h (Rahal, 2011).



Résultat et discussion

III.1 Le rendement de l'extraction

La préparation de l'extrait à partir de la partie aérienne d'un *Ruta graveolens* a été effectuée par macération dans l'éthanol suivi d'une extraction liquide – liquide. Le rendement de fraction, leur couleur ainsi que leur aspect sont consignés dans le tableau 5.

Tableau 7: Le rendement, couleur et aspect de l'extrait brut de la plante *Ruta graveolens*.

Solvant	Aspect	Couleur	Masse de résidu sec	Rendement %
Ethanol	Visqueux	Blanc	1,31 g	13,1 %

La masse d'alcaloïde extrait à partir de la partie aérienne de notre plante *Ruta graveolens* est 0,655g dans 5g de la poudre végétale, représente une teneur de 13,1% de la masse, nous pouvons juger que ce rendement est important en comparaison avec des études antérieurs sur des plantes du même genre (tableau 8).

Tableau 8: Comparaison des rendements d'alcaloïdes de différentes plantes du genre *Ruta* avec lieu et période de récolte.

Les plantes	Lieu de récolte	Période de récolte	Partie de la plante	Rendement en Alcaloïdes	Référence
<i>Ruta montana</i> L	Grarem - Mila-	Décembre – Avril 2013	P aérienne	14,28%	(Chaibeddra & Zellagui, 2014)
<i>Ruta tuberculata</i> Forsk	Oued Souf	Mars 2012	P aérienne	0,05%	(Chaibeddra & Zellagui, 2014)
<i>Ruta montana</i>	Beni Aziz -Sétif-	Aout - septembre 2016	P aérienne	0,26%	(Allouni, 2018)
<i>Ruta chalpensis</i>	Ain tolba – Ain Temouchent	December 2009- Mai 2010	Les feuilles	2,39%	(Cherif & Alou, 2015)
<i>Ruta graveolens</i>	Hassi rmel - LAGHOUAT	Mars 2020	P aérienne	13,1%	

Au regard du tableau précédent (tableau 8) et l'histogramme suivant (figure 11), nous remarquons que toutes les plantes du genre *Ruta* récoltées dans différentes régions d'Algérie, contiennent des alcaloïdes dans leur composition et ont donné une teneur variante entre 0,05% à 14,28%. Parmi les rendements d'alcaloïdes, Celui le plus élevé a été marqué avec *Ruta montana* de Mila (14,28%) suivi par notre plante (13,1%), *Ruta chalpensis* (2,39%), *Ruta montana* de Sétif (0,26%) et en fin le rendement le plus faible avec *Ruta tuberculata* (0,05%).

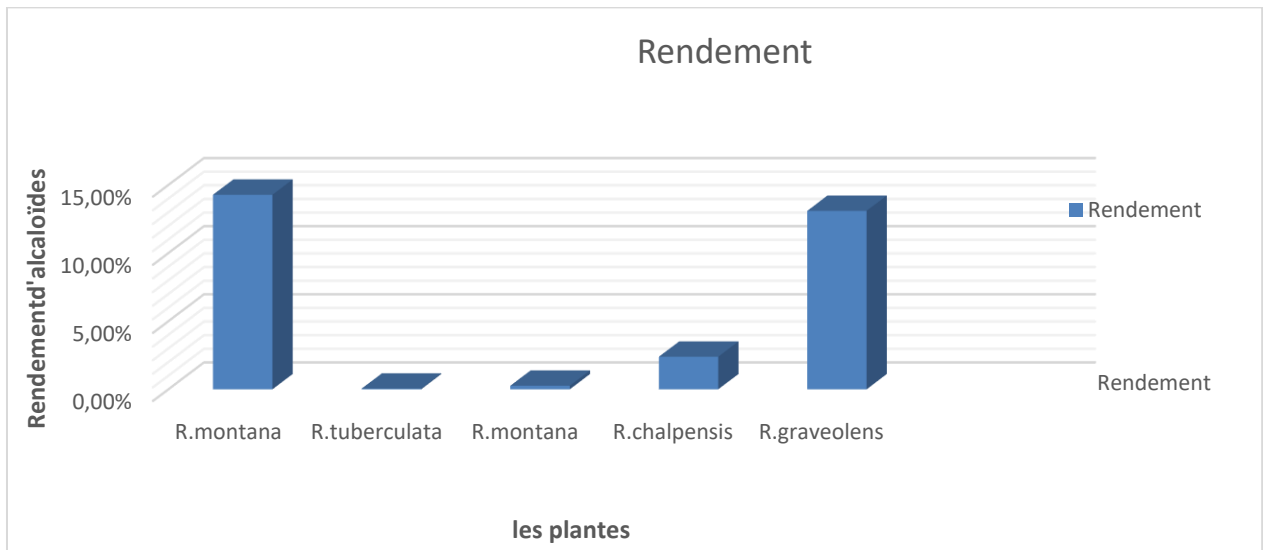


Figure 9: Histogramme représentant une comparaison des rendements d'alcaloïdes de différentes plantes du genre *Ruta*.

Nous remarquons aussi, que le rendement de notre plante est élevé par rapport à celui des plantes *Ruta montana*, *Ruta tuberculata* et *Ruta chalpensis*, et plus au moins similaire avec le rendement de *Ruta montana* L de Mila.

Le teneur d'alcaloïdes dans les plantes du genre *Ruta* est variable d'une plante à l'autre. Ceci, pourrait-être expliqué par la différence de biosynthèse des alcaloïdes d'une espèce à l'autre. Aussi, par la région de récolte et la période de récolte.

III.2 Evaluation de l'activité antioxydante

III.2.1 Résultat du test de DPPH

Le test de DPPH c'est un test colorimétrique, basé sur le changement de la coloration de la solution en présence de l'antioxydant, ce changement est mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517nm.

Les résultats obtenus de ce test, nous ont permis de tracer les graphes présentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en alcaloïdes, les graphes sont représentés dans les figures 12 et 13.

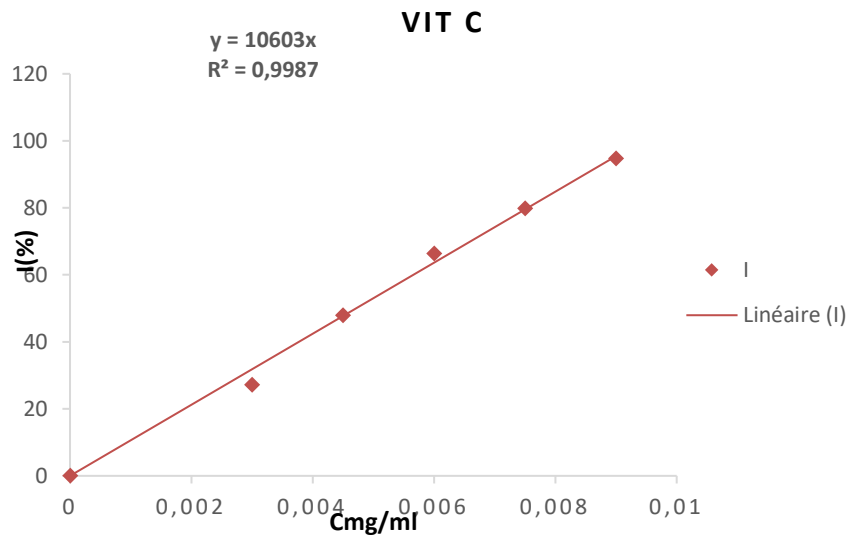


Figure 10: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de concentration de l'acide ascorbique.

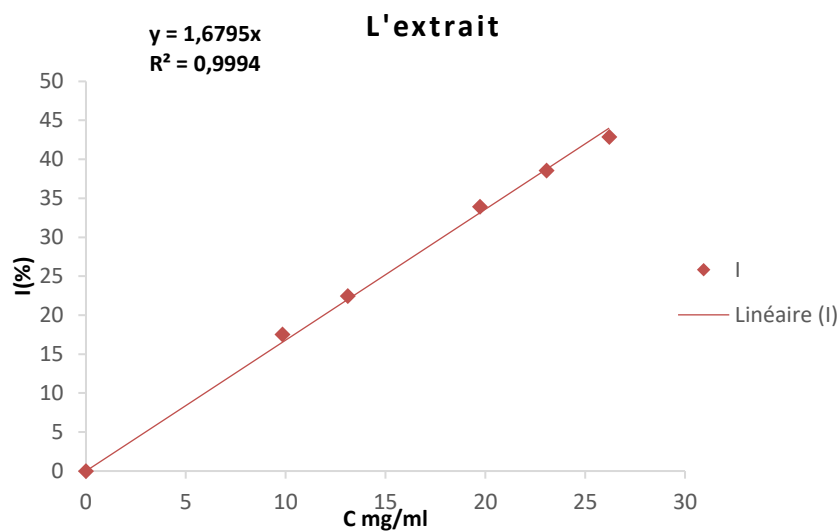


Figure 11: Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction de concentration des alcaloïdes de la plante *Ruta graveolens*.

Dans le but d'une comparaison entre le pouvoir antioxydant de l'extrait et le standard, les valeurs d'IC₅₀ ont été calculées sachant que ce paramètre est défini comme étant la concentration de l'extrait nécessaire pour réduire la concentration initiale de DPPH à 50% dans les conditions expérimentales exprimés en mg/ml. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydant est grande, Ce paramètre est utilisé pour la comparaison entre l'activité antioxydante de notre extrait avec celle des références.

Nous avons déterminé la concentration d'inhibition IC₅₀, de notre extrait et le standard, à partir des équations des régressions linéaires des graphes. Les valeurs sont représentées dans le tableau suivant (tableau 9) :

Tableau 9: Le pourcentage d'inhibition à 50% de l'extrait et le standard.

Extraites	IC ₅₀ mg/ml
L'acide ascorbique	0,004±0,0001
L'extrait de la plante	29,66±3,72

Nos résultats ont permis de déterminer la capacité antioxydante de notre extrait à neutraliser le radicale stable DPPH présent dans le milieu réactionnel. Les valeurs de concentration d'inhibition IC augmentent avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de la plante, donc l'augmentation de concentration d'alcaloïdes, ce qui signifie que notre extrait riche en alcaloïdes possède une capacité antioxydante.

Notre extrait possède un potentiel antioxydant faible (IC₅₀=29,66±3,72 mg/ml) comparable avec celui des antioxydants utilisés comme référence dans ce test vitamine C (0,004±0,0001mg/ml).

Une comparaison de notre résultat avec des études sur des plantes du même genre de différentes régions est présentée dans le tableau ci-dessous (tableau10)

Tableau 10: la concentration d'inhibition de différentes espèces de *Ruta* de différentes régions.

Les plantes	Lieu de récolte	Période de récolte	Partie de la plante	IC ₅₀ mg/ml	Référence
<i>Ruta chalpensis</i>	Adekar Bejaïa	May 2016	P aérienne	>0,40	(Gali & Bedjou, 2019)
<i>Ruta montana</i>	Beni Aziz -Sétif-	Aout - septembre 2016	Fruits et feuilles	0,09	(Allouni, 2018)
<i>Ruta chalpensis</i>	Ain tolba – Ain Temouchent	Décembre 2009- Mai 2010	Les feuilles	4,92	(Cherif & Alou, 2015)
<i>Ruta graveolens</i>	Hassi Rmel - LAGHOUAT	Mars 2020	P aérienne	29,66	

Les résultats des IC₅₀ des plantes présentées dans le tableau 10 montrent que les valeurs de l'IC₅₀ varient globalement de 0,09 mg/ml à 29,66 mg/ml. La plus forte activité a été enregistrée pour *Ruta montana* (0,06mg/ml), par contre l'activité la plus faible a été enregistrée pour notre extrait (29,66mg/ml).

D'après les valeurs d'IC₅₀ dans le Tableau 10, on s'aperçoit que toutes les plantes de genre *Ruta* ont montré des activités antiradicalaires inférieures à celles déterminées pour les antioxydants standards (Vit C). L'activité antiradicalaire peut être affectée par de nombreux facteurs tels que, la polarité du solvant la procédure d'extraction et la variation des espèces utilisées. Nous avons remarqué que notre extrait d'alcaloïdes de la plante *Ruta graveolens* possède une faible activité antioxydante par rapport les extraits d'alcaloïdes des autres plantes du même genre *Ruta montana* et *Ruta chalpensis*, et en générale les trois plantes récoltées dans des régions différente possèdent une activité antioxydante faible.

III.2.2 Résultat du test de phosphomolybdate (PPM)

L'utilisation du test PPM, dans notre étude, nous a permis de déterminer la capacité réductrice. D'ailleurs, ce test est souvent utilisé pour l'étude de l'activité antioxydante des extraits des plantes et cela, en raison de sa disponibilité (réactif à faible cout).

Les résultats sont mesurés à une longueur d'onde de 695nm. Les courbes exprimant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en alcaloïdes issus de l'extrait de plante *Ruta graveolens* et de la vitamine C sont présentées dans les figures ci-après. (Meshginfar, et al.,2018)

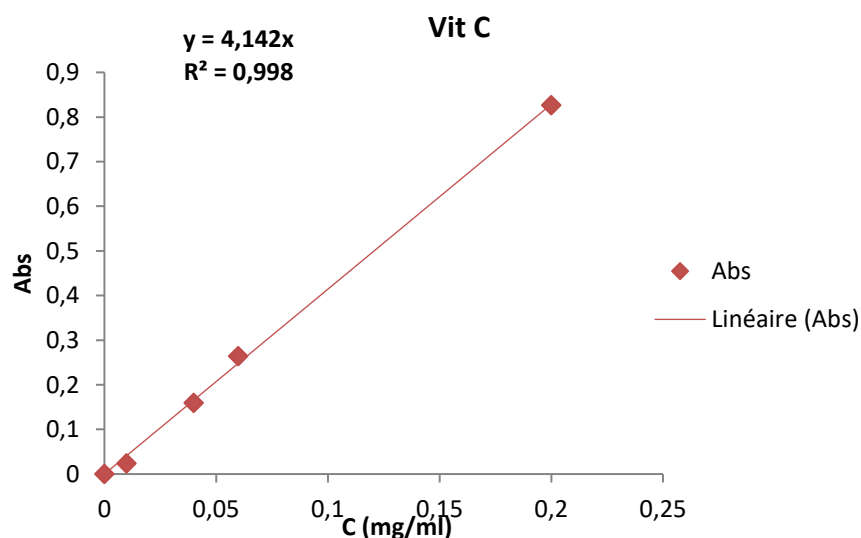


Figure 12: Courbe représentant l'absorbance en fonction de la concentration en standard VitC

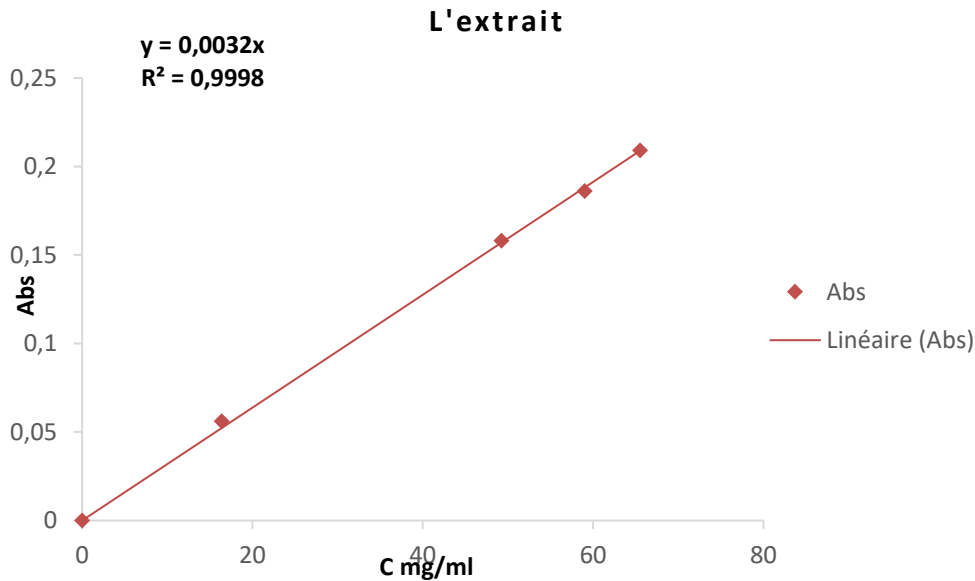


Figure 13: Courbe représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en alcaloïdes de l'extrait du *Ruta graveolens*.

L'évaluation de l'activité antioxydante de notre extrait a été référée à celle d'acide ascorbique (vitamine C). Donc, à partir des pentes tirées des graphes ci-dessus, nous avons calculé le paramètre $AaEA_C$ de notre extrait.

$$AaEA_C = 0,0007 \pm 0,002$$

La valeur $AaEA_C$ désigne la concentration de la solution standard de la vitamine C possédant la capacité antioxydante équivalente à une solution de 1 mM de la substance étudiée (extrait). Lorsque la valeur de $AaEA_C$ est élevée, le pouvoir antioxydant de l'extrait est important. (Adrian & Frangne, 1991)

D'après ce résultat, et dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de notre extrait étudié par le test PPM, nous avons comparé la valeur de $AaEA_C$ trouvée par rapport au composé standard à savoir le vitamine C. Nous avons observé que ce dernier présente une capacité réductrice plus forte par rapport à celle de notre extrait.

D'après le résultat de $AaEA_C$, nous remarquons que notre extrait (les alcaloïdes) ayant des propriétés antioxydantes négligeables qui se manifestent par une valeur inférieure à un qui est égale à $0,0007 \pm 0,002$.

D'autre étude sur La partie aérienne du *Ruta chalepensis* récoltée en mai 2016 dans la région d'Adekar Bejaïa (Gali & Bedjou, 2019) montre une capacité intermédiaire des alcaloïdes de 0,05 par rapport au notre extrait mais qui reste faible à celle de la Vit C.

III.3 Evaluation de l'activité antibactérienne :

Beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels extraits des plantes. Lors de cette étude, Nous avons évalué l'activité antibactérienne de notre extrait d'alcaloïdes du *Ruta graveolens* à l'encontre de deux souches bactériennes (*staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) par la méthode de diffusion par disques et la technique de dilution en milieu liquide pour déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI.

III.3.1 Méthode de diffusion par disques

Est une technique qualitative basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions en mm après l'incubation de 24h des boîtes de pétrie, Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 16 pour la boîte de *staphylococcus aureus* et sur la figure 17 pour la boîte de *Escherichia coli*.

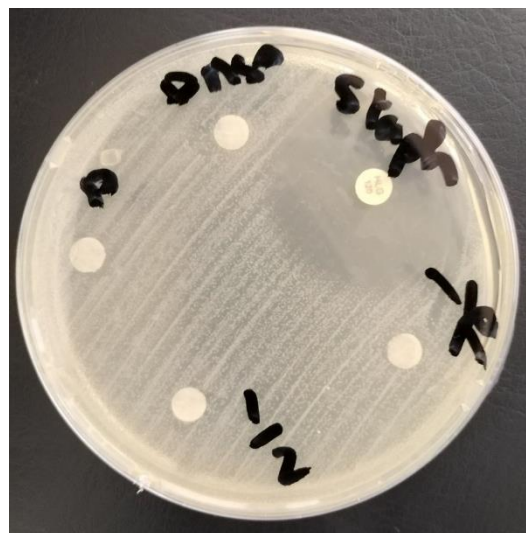


Figure 14: Zone d'inhibition de notre extrait sur la boîte de *S.aureus* après l'incubation.

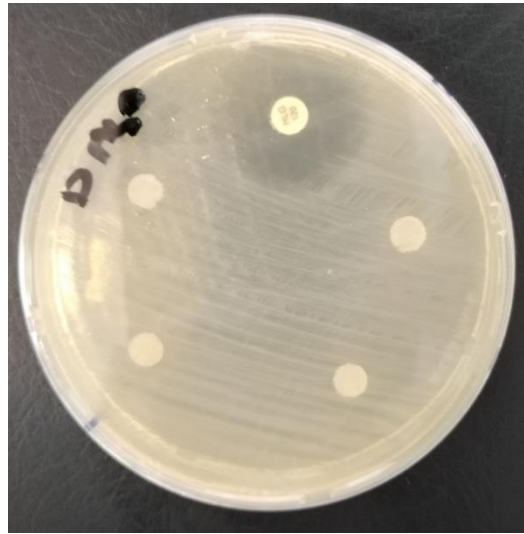


Figure 15: Zone d'inhibition de notre extrait sur la boîte de *E.coli* après l'incubation.

Nous avons mesuré les diamètres des zones d'inhibition de croissance des cultures bactériennes dans chaque boîte de pétrie, dans la boîte d'*E.coli* aucune ouverture de disque a été obtenue mais dans la boîte de *S.aureus* une petite ouverture seulement dans le disque de l'extrait pure de diamètre de 6mm.

Le diamètre de zone d'inhibition nous permis de classer les bactéries en : sensible, intermédiaire et résistante, donc on peut classer *E.coli* en bactérie résistante et *S.aureus* en bactérie intermédiaire (Rahal, 2011)

Les résultats montrent que notre extrait d'alcaloïdes de *Ruta graveolens* ne présente aucune activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et une activité faible contre *Staphylococcus aureus*.

III.3.2 Détermination de CMI

Nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice CMI de notre extrait d'alcaloïde contre la souche *S.aureus*, par la technique de dilution en milieu liquide dans quatre tubes de concentration différente entre 409,37 μ g/ml à 3275 μ g/ml.

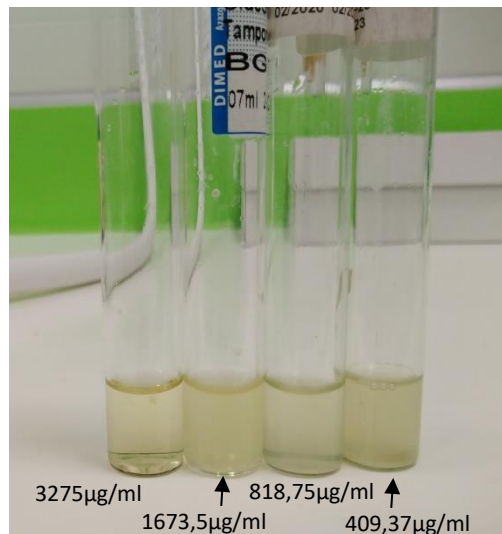


Figure 16: les tubes de dilution en milieu liquide.

Après 18 h d'incubation (figure 18), nous remarquons que seulement le tube de l'extrait pure (3275µg/ml) est clair ceci s'explique par l'inhibition de la croissance bactérienne, mais les autres tubes présentent un trouble qui est dû à la croissance bactérienne, donc pas d'inhibition de croissance. De ce fait, la concentration minimale d'inhibition de notre extrait est 327,5µg/ml.

Des études réalisées par (Harish Kumar, et *al.*, 2014), sur l'activité antibactérienne de l'extrait d'alcaloïdes des feuilles du *Ruta graveolens* récolté dans l'Inde, contre les deux souches bactérienne utilisées dans notre étude, ont montré que cet extrait possède une activité antibactérienne contre *S.aureus* avec une zone d'inhibition de 6mm (le diamètre de disque 3-4mm) et aucune activité contre *E.coli* a été présenté, pas de zone d'inhibition.

Des études sur l'activité d'alcaloïde d'une plante du même genre : *Ruta montana* de Sétif sur les deux bactéries, ont montré une zone d'inhibition de 12 mm avec *S.aureus*, et une zone d'inhibition de 18,83mm avec *E.coli* à la concentration de 50mg/ml et une CMI=3,12mg/ml, (Allouni R. , 2018). Les travaux de (Gali, L., & Bedjou, F,2020), sur les alcaloïdes de *Ruta chalpensis* à l'encontre des deux souches, les résultats ont montré que l'extrait ne possède aucune activité antibactérienne avec *E.coli*, et une grande activité avec *S.aureus* de zone d'inhibition 25,5±0,7 mm à la concentration de 50mg/ml et de CMI=27,51mg/ml.

L'extrait d'alcaloïdes de *Ruta montana* possède un grand effet inhibiteur de la croissance bactérienne pour les deux bactéries testées, ce qui signifie la présence d'une bonne activité antibactérienne, et pour l'extrait de *Ruta chalpensis* possédant une activité seulement contre la souche *S.aureus* ; (Teklit & Tanveer, 2015) qui ont travaillé sur les alcaloïdes des feuilles de *Ruta graveolens* d'Ethiopia, ils sont montrés que leur extrait possède une activité contre les deux souches *E.coli* et *S.aureus* avec zone d'inhibition de 24 mm, 14 mm respectivement. Par contre notre extrait d'alcaloïdes de *Ruta graveolens*, possède une activité contre *S.aureus* et aucune activité vis-à-vis *E.coli*.



Conclusion Et perspective

Conclusion et perspective

L'objectif de la présente étude est double. Le premier objectif étant l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait d'alcaloïdes de la plante *Ruta graveolens* en utilisant deux tests DPPH et phosphomolybdate. Le second objectif est l'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur gélose contre deux souches bactérienne *Escherichia coli* (gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (gram positif) ainsi que la détermination de la CMI par dilution en milieu liquide.

En premier lieu, l'évaluation de l'activité antioxydante par les tests *in vitro* a révélé que notre extrait manifeste une très faible activité.

Par la suite, nous avons étudié la propriété antibactérienne par la méthode de diffusion sur disque. Nous avons constaté que notre extrait a une activité antibactérienne faible sur *Staphylococcus aureus* et aucune activité à l'encontre *Escherichia coli*.

Notre perspective d'avenir est d'inviter les chercheurs scientifiques à ne pas adopter les alcaloïdes de cette plante comme une riche source d'antioxydants naturels et en adoptant ses autres extraits dans ces études tels que les flavonoïdes, les tanins et les composés phénoliques. Et d'orienter vers L'étude d'autres propriétés biologiques d'alcaloïdes de cette plante à savoir la propriété anti hyperglycémique et d'autres.

Dans notre travail, nous avons étudié l'activité antibactérienne et antioxydante sur la partie aérienne de la plante, nous suggérons de réaliser des études sur l'extrait d'alcaloïdes pour chaque organe : tige, feuilles, fleurs ...etc. ou le pourcentage de sa présence varie entre eux.

Etant donné que cette déférence est également due à son emplacement (montagne, oued, plaines...), nous invitons les chercheurs de travailler sur les plantes d'autres régions de même espèce et de faire ces études d'alcaloïdes sur des plantes de même genre et sur des plantes de différents genres de la même famille dans le cadre de la recherche de sources naturelles des antioxydants car il y a des chercheurs qui ont mené des études sur l'activité antioxydante des plantes du genre *Ruta* qui ont donné de bons résultats.

Enfin, nous espérons d'étudier d'autres activités de cette plante dans nos études à l'avenir, dans le cadre de la réalisation de notre doctorat.

The page features decorative red lines in the corners. In the top right, there are two parallel horizontal lines that turn 90 degrees into two parallel vertical lines. In the bottom left, there are two parallel vertical lines that turn 90 degrees into two parallel horizontal lines. The word "Annexe" is centered in a large, bold, dark red serif font.

Annexe

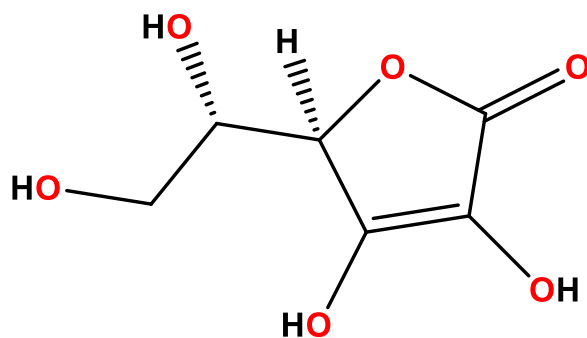


Figure 01 : Structure de l'acide ascorbique traité par chemDraw

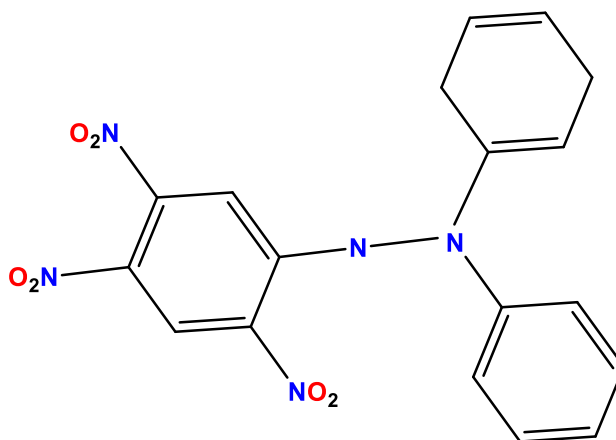
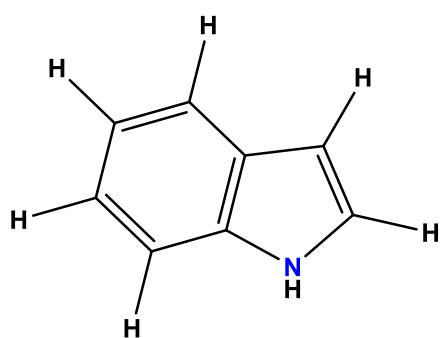
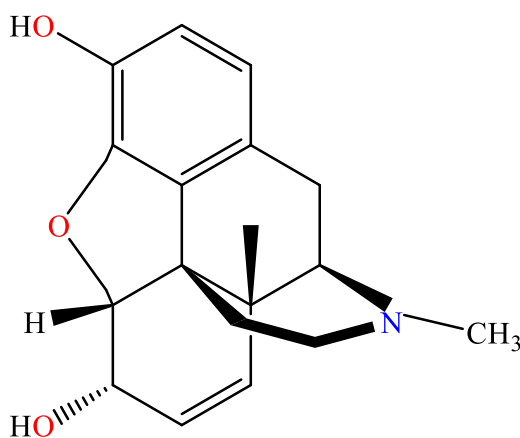


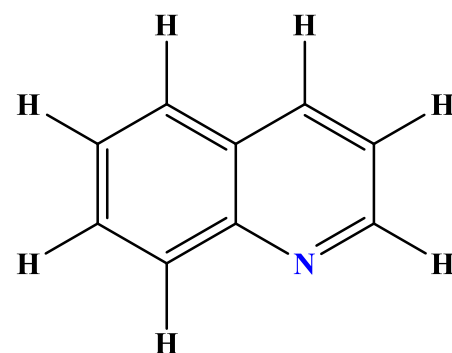
Figure 02 : Structure de DPPH traité par chemDraw



Indole



Morphine



Quinoline

Figures 03 : Structure des différents composés des alcaloïdes traité par chemsDraw



Bibliographie



- Abdel-Wahab, N., Attia, E., Desoukey, S., Elkhayat, E., Fouad, M., & Kamel, M. (2018). Evaluation of in vitro antioxidant activities and total phenol content of different extracts of the fungus *Ulocladium chartarum* isolated from *Draceana* leaf. *Journal of advanced Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, , 1(2), 75-77.
- Adrian, J., & Frangne, R. (1991). *La science Alimentaire de A à Z*, . Paris: Ed Lavoisier.
- Ahmed OM, M. A. (2010). Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects and the probable mechanisms of action of *Ruta graveolens* infusion and rutin in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia croatica*.
- Allouni, R. (2018). Etude des aspects morphologiques, phytochimiques et pharmacotoxicologiques de la plante *Ruta montana* . Doctorat en Sciences Université Ferhat Abbas Sétif 1 .
- A-Mahmoud MS, E. A.-M. (2003). Anticonceptive and antifertility activities of various *Ruta graveolens* extracts in femaie rats. *Acta Pharmaceutical Turcica* , 45:203-213. .
- Attia EZ, A. E.-B. (2018). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Futur J Pharm Sci*, 4(2):254–64.
- Badhusha, S. (2020). Traditional uses, Phytochemistry and Ethanopharmacology of *Ruta graveolens* Linn: A review. *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, 1-4.
- Bayoud, B., Djilani, S., Legseir, L., Ouahrani, M., & Djilani, A. (2007). Antibacterial activity of methanol extracts and total alkaloids of *Datura stramonium* and *Ruta graveolens*. *Accelerating the world's research*.
- Benarous, K. B., Tahria, D., Sebaaa, M., & Yousfia, M. (2015). Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies. . *Bioorganic chemistry*, 62, 1-7.
- BENMENNI, D. (2017). Contribution à l'évaluation du pouvoir antioxydant par le DPPH de quelques métabolites secondaires (Tanins, flavonoïdes et alcaloïdes) de la racine de *Carlina acaulis* de la région de Tlemcen . Doctoral dissertation (U. A. Belkaid, Interprète) Tlemcen, Biologie et Environnement, Algérie , p12.

- Biskup, E. L. (2009). Evaluation of biological activities of *Rhaponticum carthamoides* extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12), 1092-1098.
- Blagojević, B., Agić, D., Serra, A. T., Matic, S., Matovina, M., Bijelić, S., & Popović, B. M. (2021). An in vitro and in silico evaluation of bioactive potential of cornelian cherry (*Cornus mas* L.) extracts rich in polyphenols and iridoids. *Food chemistry*, 335, 127619.
- Bougoffa-Sadaoui, K., Gontier, E., Telliez, M. S., Lequart-Pillon, M., Ouadid-Ahidouch, H., & Maiza-Benabdesselam, F. (2016). Characterization of isoquinolin alkaloids from *Fumaria agraria* and evaluation of their antiproliferative activity against human breast cancer cell lines. *Phytotherapie*, 14(3), 188-195.
- Bouharb, H., El Badaoui, K., Zair, T., Chakir, S., & Alaoui, T. (2014). Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Biosciences*, 78, 6685-6693.
- Bouvry, C. (2020). *Utilisation d'α-aminonitriles pour la synthèse d'alcaloïdes, de phénanthropipéridines et d'aza-spirocycles*. Doctoral dissertation, Rennes 1.
- Bouyahya, A., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. (2017). Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*. *Phytothérapie*, 15(6), 379-383.
- Carvalho, L. S. (2019). In vitro schistosomicidal activity of the alkaloid-rich fraction from *Ruta graveolens* L.(Rutaceae) and its characterization by UPLC-QTOF-MS. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Celia, K. S. (2015). Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles de *Calamintha officinalis* et *Abies numidica*. Université A. MIRA, Bejaia.
- Chaibeddra, Z., & Zellagui, A. (2014). Etude comparative des substances bioactives chez *Ruta montana* L. et *Ruta tuberculata* forsk. Magister Université El Arbi Ben M'Hidi-Oum El Bouaghi.
- Cherif, N. E., & Alou, H. (2015). Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* de la région de Bordj Bou Arreridj. Master Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bou Arreridj.
- Cheurfa, M., & Allem, R. (2016). Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie in vitro. *Phytothérapie*, 14(3), 181-187.

De Queiroz, A. C.-J.-M. (2014). Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic areas in northeastern Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.

Desmier, T. (2016). Les Antioxydants de nos jours: Définition et applications. DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE UNIVERSITÉ DE LIMOGES.

Dhale, D. A. (2010). Standardization of Homoeopathic Drug *Ruta graveolens* L. *Journal of Phytology*, 2(3).

Eman Zekry, A., Rehab, M. A.-B., Samar, Y. D., Mahmoud, A. E., Mokhtar, M. B., & Mohamed, S. (2018). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Future Journal of Pharmaceutical sciences*.

Fadaeinasab, M., Taha, H., Fauzi, P. N., Ali, H. M., & Widyawaruyanti, A. (2015). Anti-malarial activity of isoquinoline alkaloids from the stem bark of *Actinodaphne macrophylla*. *Natural product communications*, 10(9).

Faridi, B., Zellou, A., Touati, D., Alaoui, K., & Cherrah, Y. (2014). Toxicité aiguë et activité anti-inflammatoire des graines de *Delphinium staphysagria*. *Phytothérapie*, 12(3), 175-180.

Gali, L., & Bedjou, F. (2019). Antioxydant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South African Journal of Botany*, 120, 163-169.

Gantait, S., Das, A., Mitra, M., & Chen, J. T. (2021). Secondary metabolites in orchids: Biosynthesis, medicinal uses, and biotechnology. *South African Journal of Botany*, 139, 338-351.

GUERDOUH, A. (2017). Effet du Solvant sur L'extraction Liquide-Liquide du Cuivre(II) et du Chrome(III) par L'acide Laurique et La Salicylidèneaniline. Doctorat LMD en : Chimie Industrielle. Université Mohamed Khider - Biskra. Doctorat LMD en : Chimie Industrielle. Université Mohamed Khider - Biskra.

Guillouty, A. (2016). Plantes médicinales et antioxydants . Doctoral dissertation, Université Toulouse III-Paul Sabatier).

Hamidi, A. (2013). Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*. Doctoral dissertation, Université de Ouargla-Kasdi Merbah.

HAMMA, S., NOURI, N., FERGANI, I., LEKHAL, A., & CHERIET, S. (2015). Biologie des espèces réactives et Stress oxydant. *journal algérienne de médecine*, p6-20.

Harish Kumar, K., Shanmugavadivu, M., Ranjithkumar, R., & Selvam, K. (2014). Antibacterial Activity of Different Solvent Extracts of Medicinal Plant: Ruta Graveolens L. *International Journal of Biosciences and Nanosciences*, pp. 9-11.

Iserin, P., Masson, M., Restellini, J., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., & Vican, P. (2001). *Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins*. Ed Larousse.

Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of applied microbiology*, 123(3), 570-581.

Jenul, C., & Horswill, A. (2019). Regulation of Staphylococcus aureus virulence. *Microbiology spectrum*, 7(2), 7-2.

KASSI, A., BALLO, D., KABRAN, A., SISSOUMA, D., & ADJOU, A. (2020). Evaluation du pouvoir antioxydant et de la teneur en polyphénols totaux de six plantes médicinales utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires. *Journal Applied Biosciences*, 153, 15788-15797.

Khori, V. N. (2008). Prolongation of AV nodal refractoriness by Ruta graveolens in isolated rat hearts: Potential role as an anti-arrhythmic agent. *Saudi medical journal*, 29:357-363.

Konaté, D., Coulibaly, O., SIDIBE, L., Diallo, O., Diall, H., & Diakité, F. (2019). Infection néonatale bactérienne précoce en 2016 au CHU Gabriel Touré de Bamako. *Article Original* .

Koné, K. P. (2018). *Applications des techniques de chromatographie et de spectroscopie dans l'identification des métabolites secondaires de trois plantes antidiabétiques et antihypertensives de la pharmacopée ivoirienne* . Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique Felix Houphoët Boigny-Yamoussoukro.

Li, M. C., Sun, W., Cheng, W., Liu, D., Liang, H., Zhang, Q. Y., & Lin, W. (2016). Four new minor brominated indole related alkaloids with antibacterial activities from *Laurencia similis*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(15), 3590-3593.

Meshginfar, N., Mahoonak, A., Hosseinian, F., Ghorbani, M., & Tsopmo, A. (2018). Production of antioxidant peptide fractions from a by-product of tomato processing: Mass

spectrometry identification of peptides and stability to gastrointestinal digestion. *Journal of food science and technology*.

Mohammadi Motamed, S., Shahidi Motlagh, S., Bagherzadeh, H., Azad Forouz, S., & Tafazoli, H. (2014). Evaluation of antioxidant activity of *Ruta graveolens* L. extract on inhibition of lipid peroxidation and DPPH radicals and the effects of some external factors on plant extract's potency. *Research Journal of Pharmacognosy*, 45-50.

Moradi, M. T., Karimi, A., Rafieian-Kopaei, M., & Fotouhi, F. (2017). In vitro antiviral effects of *Peganum harmala* seed extract and its total alkaloids against Influenza virus. *Microbial pathogenesis*, 110, 42-49.

Moroh, J.-L. A. (2013). Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Doctoral dissertation, Université de Bretagne occidentale-Brest.

Oliva, A. M. (2003). Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(4), 890-896.

Orlanda, J. F. (2015). Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L.(Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. *South African Journal of Botany*, 99, 103-106.

Ozenda, P. (1977). *flore du sahara*. paris-Franc: ed-2.

Pandey P, M. A. (2011). Antioxidant property, total Phenolic content and inhibition of α -amylase activity of *Ruta graveolens* L. leaves extract. *J. Pharm. Res*, 4:1735-7.

Parray SA, B. J. (2012). *Ruta graveolens*: from traditional system of medicine to modern pharmacology: an overview. *Am J Pharm Tech Res*, 2(2):239-52.

Rahal, K. (2011). *Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS*. INSP Algérie.

Rahmani, K., & Boulanouar, F. Z. (2019). Etude de l'activité antioxydante de l'ail. Génie des procédés Pharmaceutique Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana.

Raji, P., Samrot, A., Keerthana, D., & Karishma, S. (2019). Antibacterial activity of alkaloids, flavonoids, saponins and tannins mediated green synthesised silver nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Cluster* .

Randrianarivelo, R. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar *Cinnamosma fragrans*, alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Doctoral dissertation, Université d'Antananarivo.

Ratheesh, M., & Helen, A. (2007). Anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* Linn on carrageenan-induced paw edema in rats. *African Journal Biotechnology*, vol. 6, no. 10, pp. 1209–1211.

Rethy B, Z. I. (2007). Investigation of cytotoxic activity on human cancer cell lines of arborinine and furanoacridones isolated from *Ruta graveolens*. *Planta medica*.

Reza, M., Ahmad, M. R., Rahman, M., & Alam, M. T. (2020). Suddab (*Ruta graveolens* Linn.) the Blessed Medicinal plant of Unani System of medicine: Literature Review. *American Journal of Pharmacy & Health Research*.

Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry science*, 98(4), 1791-1804.

Sirivibulkovit, K. N. (2018). Based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical sciences*, 34(7), 795-800.

Teklit, G. A., & Tanveer, M. S. (2015). Phytochemical Screening and Evaluation of Antibacterial Activity of *Ruta graveolens* L. - A Medicinal Plant Grown around Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Natural Products Chemistry & Research*.

Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2019). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1-12.

Thawabteh, A., Juma, S., Bader, M., Karaman, D., Scrano, L., Bufo, S., & Karaman, R. (2019). The biological activity of natural alkaloids against herbivores, cancerous cells and pathogens. *Toxins*, 11(11), 656.

Togola, I., Konaré, M. A., Diakité, M., Diarra, N., Tounkara, F., Sanogo, R., & Dembélé, D. (2019). Evaluation de la teneur en alcaloïdes totaux à différents stades de développement de *Datura innoxia* Mill., une plante utilisée dans la médecine traditionnelle. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*.

Valentina, P., Dora, F., Martina, J., Maja, M., & Stela, J. (2019). Assessment of Total Phenolic Content, In Vitro Antioxidant and Antibacterial Activity of *Ruta graveolens* L. Extracts Obtained by Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents. *plants*.

Wang, H.-T., Yang, Y.-C., Xia, M., Ying, W., & Rui, H. (2018). Cytotoxic gelsedine-type indole alkaloids from *Gelsemium elegans*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 20:4, 321-327.

(2017, Aout 13). Récupéré sur Ecosostenibile: <http://antropocene.it/en/2017/08/13/ruta-graveolens/>

(2020). Récupéré sur la bardane: <https://www.la-bardane-07.com/2020/02/07/la-rue-officinale-ruta-graveolens/>