

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la santé-
LMBAFS

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER II EN BIOLOGIE

Spécialité : Nutrition et santé

Thème

**Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des
polyphénols de la rue fétide *Ruta graveolens***

Présenté par

BELAID Ahlam

BELLIL Hafida Nawel

Soutenues publiquement le 16/09/2017

Devant le jury composé de:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| - Présidente : Keddari Soumia | Maître de conférences A à l'Université de Mostaganem |
| - Examineurs : Boualem Malika | Maître de conférences B à l'Université de Mostaganem |
| - Promotrice : Mokhtar Meriem | Maître de conférences A à l'Université de Mostaganem |

Année Universitaire : 2016/2017

Résumé

Abstract

Dédicace

Remerciements

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction1

I.1. Description botanique3

I.2. Composition chimique.....4

I.2.1. Huile
essentielle4

I.2.2. Coumarines5

I.2.3. Flavonoïdes6

I 2 4 Alcaloïde.....8

I 3 Activités biologiques.....9

I.3.1. Activité anticancéreuse.....9

I.3.2. Action sur la
peau.....9

I.3.3. Activitéantioxydante.....1
0

I.3.4. Activité anti-inflammatoire et antispasmodique Erreur ! Signet non
défini.....11

I 4 Toxicité.....12

I.4.1. Activités mutagène et carcinogène 12

I.4.2. Action sur les
enzymes.....12

I.4.3. Action sur la sphère génitale.....13

I.4.4.	
Phototoxicité.....	13
Chapitre II: matériel et méthode	
II.1. Origine de la plante	14
II.2. Extraction des poly phénols.....	14
II.3.Détermination de rendement d'extraction	14
II.4.Dosage des poly phénols totaux.....	15
II. 4. 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	15
II. 4. 2. Calcul des polyphénols totaux.....	15
II. 5. 1. Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	15
II. 5. 2. Calcul des flavonoïdes des totaux.....	15
II.6.Evaluation de l'activité anti oxydante	16
II. 6. 1. Test de réduction du radical stable DPPH.....	16
II. 6. 2. Test de B-carotène.....	16
II.7. L'activité anti inflammatoire.....	16
II. 7. 1. Test de la dénaturation d'albumine.....	16
II. 7. 2. Test de stabilisation de la membrane des érythrocytes.....	17
III.1. Calcul de rendements d'extraction	18
III.2.Dosage des polyphénole totaux	18
III.2. 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	18
III.2.2. Quantification des polyphénols totaux	18
III.3. Dosage des flavonoïdes totaux	20
III.3. 1. Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	20
III. 3. 2. Quantification des flavonoïdes totaux.....	21
III.4. Evaluation de l'activité anti oxydante	21
.III. 4. 1. Test DPPH	21

III.	4.	2.	Test	de	B-
carotène					24
III.5.Evaluation de l'activité anti inflammatoire					25
III. 5. 1. Test de la dénaturation d'albumine					26
III.5. 2. Test de stabilisation de la membrane des érythrocytes (SME)					27
Conclusion					
Référence bibliographique					

Remerciements

Nous remercions tout d'abord mon Dieu tout puissant qui nous a donné la force et le courage pour terminer ce travail ;

Au terme de ce travail, il m'est à la fois un plaisir et un devoir de remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail

*En premier lieu, nous voudrions remercier chaleureusement madame **Mokhtar Meriem** Maître de conférences B à l'Université de Mostaganem, pour nous avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail et de bien vouloir accepter de le diriger avec beaucoup de compréhension. Nous leur en sommes infiniment reconnaissants.*

Nous remercions aussi les membres du jury pour leur obligeance en examinant ce travail :

*- Présidente : **Keddari Soumia** Maître de conférences A à l'Université de Mostaganem*

*- Examineurs : **Boualem Malika** Maître de conférences A à l'Université Mostaganem*

Nous remercierons également tous nos enseignants, nos collègues et les personnels de la faculté des sciences de la nature et de la vie

En fin, juste un petit mot pour nous dire Merci**

Résumé

Le but de ce travail est le dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux de la rue des jardins (*Ruta graveolens*) et l'évaluation de son activité antioxydante et anti-inflammatoire. Le contenu en polyphénols et des flavonoïdes totaux a été dosé par des méthodes colorimétriques. Les résultats obtenus ont montré que *Ruta graveolens* renferme une bonne teneur en polyphénols et flavonoïdes ($4,163 \pm 0,0394$ mgEAG/gE et $1,397 \pm 0,033$ mgEQ/gE respectivement). L'activité antioxydante est évaluée par deux tests: DPPH, beta carotène. Selon les résultats, les polyphénols de *Ruta* présente un bon effet antioxydant vis-à-vis du radical DPPH et b-carotène ($5,61 \pm 0,139$ mg EAA/g E et $1,99 \pm 0,21$ mg EAA/g E). En ce qui concerne le pouvoir anti-inflammatoire, deux tests ont été utilisés: la dénaturation d'albumine et stabilisation de la membrane des érythrocytes. Les polyphénols de cette plante ont pu inhiber la dénaturation des protéines ($0,118 \pm 0,138$ mg EI/g E) et constituent un bon stabilisateur de la membrane des érythrocytes ($4,629 \pm 0,101$ mg ED/g E).

Mots clé : *Ruta graveolens*, polyphénols, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire.

Abstract

The aim of the current work was to quantify the total flavonoid and polyphenol content of *Ruta graveolens*, and the evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activities of its polyphenols. According to the results, this plant is rich in polyphenols and flavonoids ($4,163 \pm 0,0394$ mgEAG/gE and $1,397 \pm 0,033$ mgEQ/gE respectively). For the antioxidant activity, two tests were used, DPPH and b-carotene. Polyphenols of *Ruta* possess a good activity with values of $5,61 \pm 0,139$ mg EAA/g E and $1,99 \pm 0,21$ mg EAA/g E). After that, the anti-inflammatory activity of this plant polyphenols was explored by two tests: Inhibition of albumin denaturation and human red blood cell membrane stabilization method. *Ruta graveolens* polyphenols had inhibited the denaturation of albumin ($0,118 \pm 0,138$ mg EI/g E) and also were able to stabilize the membrane of human red blood cell ($4,629 \pm 0,101$ mg ED/g E).

Keywords: *Ruta graveolens*, polyphenols, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

Liste des tableaux

Tableau n° 1: Caractères différentiels des espèces.	04
Tableau n° 2: Principaux constituants de <i>Ruta sp.</i>	05
Tableau n°3 : Polyphénols et flavonoïdes totaux de <i>R. graveolens.</i>	20
Tableau n° 4: Activité antioxydante des polyphénols de <i>Ruta graveolens.</i>	22
Tableau n° 5: Activité anti-inflammatoire des polyphénols de <i>Ruta graveolens.</i>	27

Liste des figures

Figure n°1 : <i>Ruta graveolens</i> L.	03
Figure n° 2: Les principales classes de composés phénoliques	07
Figure n°3 : Exemples d'alcaloïdes	09
Figure n° 4: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	19
Figure n° 5: Courbe d'étalonnage de quercétine	20
Figure n° 6 : Courbe d'étalonnage de trolox (test DPPH)	22
Figure n°7: La courbe d'étalonnage de l'Acide ascorbique (test B-carotène)	24
Figure n°8: Courbe d'étalonnage de l'ibuprofen	27
Figure n° 9: Courbe d'étalonnage de Diclofenac	28

Liste des abréviations

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

% : Pourcent

UV: Ultra violet

g : Gramme

ml: Millilitre

nm: Nanomètre

µl : Microlitre

µg : Microgramme

HE : huiles essentielles

MS : matière sèche

V/V : Volume à Volume

GR : globules rouges

HCl : acide chloridrique

H₃PMo₁₂O₄₀ : l'acide phosphomolybdique

H₃PW₁₂O₄₀ : l'acide phosphotungstique

W₈O₂₃ : bleu d'oxyde de tungstène

Mo₈O₂₃ : molybdène

Mg : milli gramme

G : gramme

Min : minute

mL : milli liter

mM: milli mol

MeOH : méthanol

C° : degré Celsius

HE : huile essentielle

AG : acide gallique

E : Extrait

Q : quercitrine

T : trolox

B-C : beta carotène

ATP : Adénosine triphosphate

EROs : espèces réactives dérivées de l'oxygène

ERAs : espèces réactives dérivées de l'azote

L : litre

O₂ : oxygène

OH : hydroxyle

ON : nitrosyle

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène

HOCl : Acide hypochloreux

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SME : stabilisation de la membrane des érythrocytes

CRP : La protéine C réactive

IL-6 : L'interleukine 6

IL-8 : L'interleukine 8

IL-13 : L'interleukine 13

IFN- α : Interférons α .

AA : acide arachidonique

NOS : Nitric Oxide Synthase

LPS : lipopolysaccharide

NF- κ B : Nuclear Factor Kappa Beta

Introduction

Introduction

Au cours de la dernière décennie, une réelle prise de conscience de l'importance d'une alimentation riche en fruits et légumes est apparue, en particulier dans le cadre de la prévention de maladies métaboliques telles que les pathologies cardiovasculaires, l'obésité ou le diabète de type II.

Une consommation élevée de fruits et légumes a pu être associée à la diminution du risque de développement de maladies neuro-dégénératives, cardiovasculaires ou de cancer dans de nombreuses études épidémiologiques.

De multiples constituants et micronutriments de ces aliments tels que les fibres, les vitamines, les minéraux, jouent potentiellement un rôle dans cet effet protecteur. Les polyphénols sont des micronutriments particulièrement abondants dans les fruits, les céréales et les légumes ainsi que dans des boissons comme le thé, le café, le vin ou les jus de fruits.

La consommation moyenne de polyphénols par l'homme est couramment estimée à 1 g par jour. Les effets biologiques des polyphénols ont été évalués dans de nombreuses études et souvent associés à leurs propriétés antioxydantes intrinsèques.

De récentes études ont montré que ces micronutriments pouvaient agir indirectement sur le stress oxydant en stimulant l'expression et l'activité des systèmes de défense. Toutefois, il est désormais admis que leurs effets ne se limitent pas à leurs propriétés antioxydantes directes ou indirectes et de récentes données ont suggéré que les polyphénols avaient la capacité d'agir sur l'expression des gènes ainsi que sur de nombreuses voies de signalisation impliquées dans des processus pathologiques comme l'inflammation.

Les études portant sur le métabolisme de ces composés ont montré que les polyphénols sont faiblement absorbés au niveau de l'estomac ou de l'intestin grêle et qu'ils sont présents en grande quantité dans la lumière du côlon où ils pourraient exercer des effets antioxydants et anti-inflammatoires.

L'activité antioxydante des extraits de plantes a constitué la base de nombreuses applications incluant les procédés de conservation des aliments et les thérapies naturelles. En effet, plusieurs composés polyphénoliques extraits à partir de *Ruta graveolens* ont montré un bon pouvoir antioxydant et d'excellentes capacités à inhiber les réactions oxydatives ainsi que un super pouvoir anti-inflammatoire.

Dans ce contexte, ce travail a eu pour objectif l'étude de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des polyphénols de la rue des jardins (*Ruta graveolens*).

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I.1. Description botanique

La famille des *Rutaceae* est constituée d'environ 700 espèces spontanées, présentes dans les régions tempérées et chaudes. Il existe une soixantaine d'espèces dans le genre *Ruta* dont certaines se trouvent sur le pourtour méditerranéen : *Ruta angustifolia* Pers. ; *Ruta chalepensis* L. ; *Ruta montana* L. ; *Ruta corsica* DC3 et *Ruta graveolens* L (Hammiche et Azzouz, 2013).

Toutes sont des plantes vivaces à fleurs jaunes, caractérisées par une odeur forte, fétide, nauséuse, due à une huile essentielle contenue dans d'énormes poches sécrétrices. Malgré des différences morphologiques peu marquées, chaque espèce possède des caractères propres qui aident à son identification (tableau 1).

Ruta graveolens L appelée communément rue fétide, rue des jardins, herbe de grâce, rue officinale, ou rue commune est un arbrisseau de la famille des *Rutaceae*, du genre *Ruta* (Figure 1). C'est une plante méditerranéenne semi arbustive, d'un mètre de haut environ, très ramifiée et ligneuse à la base. La floraison s'étend de mai à août. Ses fleurs regroupées en corymbe, sont composées de 4 à 5 pétales jaunes verdâtres soudés à la base (Doerper 2008 ; Sarembaud, 2017).



Figure 1: *Ruta graveolens* L. (Hammiche et Azzouz, 2013).

Tableau 1 : Caractères différentiels des espèces (Hammiche et Azzouz, 2013).

Nom scientifique	Port	Feuille/folioles	Fleur	Fruit/capsule
<i>Ruta chalepensis</i> Rue d'Alep	- Feuillage léger - Base ligneuse - 80 cm-1 m	- Vert jaunâtre - Segments : oblongs (plus larges à la partie supérieure)	Pétales concaves, frangés (franges dressées)	- Allongé (6-7 mm) - Lobes aigus réunis au sommet - Pédoncule > fruit
<i>Ruta graveolens</i> Rue commune	- Touffes denses - Tiges ± ligneuses - 80 cm	- Vert glauque - Folioles à peine ovales, presque égales	Pétales entiers, denticulés, concaves où se logent les étamines	- ± globuleux - Lobes arrondis - Pédoncule > fruit
<i>Ruta montana</i> Rue de montagne	- Tiges grêles - 40 cm	- Vert glauque - Segments fins (très découpée)	Pétales en spatule, à peine dentés	- Globuleux - Lobes arrondis - Pédoncule court (4 mm)
<i>Ruta angustifolia</i> Rue à feuille étroite	- Feuillage peu dense, glanduleux à la partie supérieure - 30-60 cm	Segments étroits, couverts d'un duvet court, peu abondant	- 8-10 mm - Pétales à longues franges	- Grande taille - Lobes aigus rapprochés au sommet

I.2. Composition chimique

La rue de jardin renferme de nombreux composés appartenant à différentes classes chimiques: alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes et une huile essentielle. Les chercheurs ont pu identifier dans *Ruta graveolens* L. plus de 100 composés. La nature et les teneurs de ces composés sont très variables selon l'espèce, le stade de développement et la distribution géographique.

I.2.1. Huile essentielle

Les HE sont des composés organiques naturels complexes de structures organiques très variées. Le terme « huiles » vient de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme « essentielles » désigne l'odeur dégagée par la plante productrice (Chemat et al., 2013 ; Bouyahya et al., 2016).

Les HE sont biosynthétisées par des plantes odorantes dites aromatiques comme métabolites secondaires. Ces plantes se caractérisent par la présence de structures sécrétrices des HE bien spécialisées telles que les poils sécréteurs (*Lamiaceae*), les poches sécrétrices (*Myrtaceae*) et les canaux sécréteurs (*Apiaceae*). Ces structures dotées d'un caractère physiologique sécrétoire bien défini, qui diffèrent selon l'organe végétal en question. Ces structures sont également impliquées dans le stockage des HE (Bouyahya *et al.*, 2016).

Elles possèdent des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératrices et anticancéreuses. Ces dernières années, de nombreuses études ont révélé l'efficacité des HE et de leurs constituants chimiques comme source de nouveaux produits naturels bioactifs.

L'huile essentielle de la rue de jardin, présente principalement dans les parties aériennes, représente 0,1 à 0,7 % de matière sèche (MS). Elle renferme, selon le cas, jusqu'à 90 constituants dont les principaux sont des cétones aliphatiques (De Feo *et al.*, 2002 ; Hammiche et Azzouz, 2013) (tableau 2).

Tableau 2 : Principaux constituants de *Ruta sp.*

Huile essentielle	Coumarines	Alcaloïdes
2-undécane (méthylnonylcétone), 2-nonane (méthylheptylcétone), 2-décane (méthyl-octylcétone), alcools (nonanol), esters	Psoralène, bergaptène, xanthotoxine, isopimpinelline, daphnorétine, daphnorine, ombelliférone, scopolétine, gravelliférone, rutaculine, chalepsine, chalépine, marmésine, rutarétine, rutarine, rutamarine	- Dérivés des quinoléines : gravéoline, gravéoline, arborine - Dérivés des furoquinoléines : dictamine, ptéléine, kokusaginine, skimmianine, fagarine - Dérivés de l'acridone : arborinine, acridinone, gravacridone, rutacridone, furacridone

I.2.2. Coumarines

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata*. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques sont isolés dans plus de 800 espèces de plantes et dans les microorganismes. Dans les plantes, on les rencontre chez les *Apiacées*, les *Astéracées*, les *Fabacées*, les *Rosacées*, les *Rubiacées*, les *Rutacées* et les *Solanacées* (Mokhtar, 2015).

Ce sont, essentiellement, des coumarines simples ou des dimères, des furocoumarines et des dihydrofurocoumarines. Il a été isolé, de la rue commune, plus de 40 coumarines et dérivés. Le principal constituant des coumarines est un glucoside, la rutarine (0,9 %) (Eilert, 1994 ; Hammiche et Azzouz, 2013).

Les plus communes des furanocoumarines sont : les psoralènes, bergaptène (5-méthoxypsoralène), xanthoxine (8-méthoxypsoralène), isopimpinelline (5,8-méthoxypsoralène) et rutarétine (dihydrofuranocoumarine).

Les espèces du genre *Ruta* renferment 0,4 à 1,7 % (MS) de furocoumarines. Dans *Ruta graveolens*, les teneurs sont maximales dans les péricarpes au moment de la fructification (jusqu'à 1,5 % de MS). Les feuilles renferment 0,36 % de MS et les tiges 0,2 % de MS (Milesi et al., 2001 ; Hammiche et Azzouz, 2013).

Plusieurs de ces composés sont communs à *Ruta graveolens*, *Ruta chapelensis*, *Ruta montana* (tableau 2). L'héraclénol et la rutamontine ont été identifiés dans les parties aériennes de *Ruta montana*, dans la région de Mila, en Algérie (Kabouche et al., 2003). Par ailleurs, le psoralène y a été déterminé à un taux de 3,5 %, dans la région d'Oran (Kambouche et al., 2008).

I.2.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés polyphénoliques (figure 2) les plus abondants contenus dans les végétaux. Leur structure comprend un squelette composé de deux cycles aromatiques (A et B) porteurs de plusieurs fonctions phénol et réunis par une chaîne de trois

atomes de carbone, ces derniers étant le plus souvent engagés dans un hétérocycle avec un atome d'oxygène (Stoclet et Schini-Kerth, 2011 ; Mokhtar, 2015).

Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes. Dans les aliments, ils sont souvent présents sous forme d'hétérosides (Guignard, 1996 ; Mokhtar, 2015).

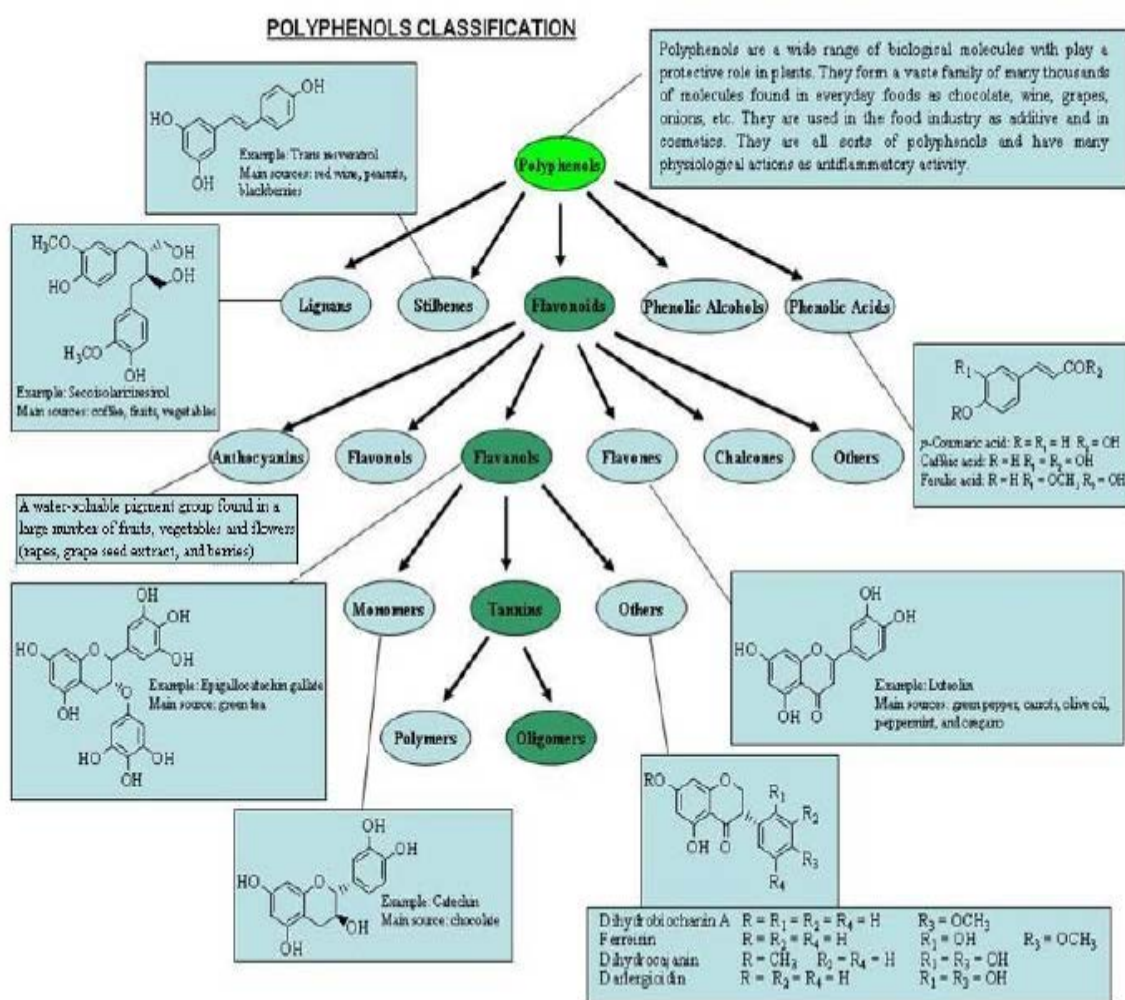


Figure 2 : Les principales classes de composés phénoliques (Ferrazzano et al., 2011).

Parmi les glycosides isolés, la rutine, ou rutoside, est un flavonoïde naturel de type flavonol ; c'est un rhamnoglucoside du quercétol, relativement fréquent dans la nature, qui a été extrait, pour la première fois, de *Ruta graveolens* où sa teneur est de 1 à 5 % (Eilert, 1994 ; Hammiche et Azzouz, 2013). Il existe dans les trois espèces. Les feuilles sont riches en gossypétine, kaempférol et isorhamnétine.

I.2.4. Alcaloïdes

Bruneton (1999) définit un alcaloïde comme « un composé organique hétérocyclique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées ». Représentant un groupe fascinant de produits naturels, ils constituent un des plus grands groupes de métabolites secondaires avec près de 10 000 à 12 000 structures différentes.

Les alcaloïdes sont rattachés aux quinoléines (quinoléine– quinolone), aux quinazolines (quinazoline et quinazolone), aux furoquinoléines et aux dérivés de l'acridone. Les deux groupes essentiels sont constitués par les furoquinoléines et les dérivés de l'acridone.

Les principaux représentants du premier groupe sont les skimmianine, gamma-fagarine, dictamnine, kokusaginine. Parmi les alcaloïdes de l'acridone, l'arboritine est commune dans les parties aériennes ; rutacridone et gravacridonediol sont présents dans la racine (Eilert, 1994).

Environ une centaine d'alcaloïdes de l'acridone ont été isolés de différentes espèces de *Rutaceae*. Ils sont de couleur jaune et présentent une fluorescence jaune brillant sous UV, permettant leur détection. Ces alcaloïdes sont présents, uniquement, dans la famille des *Rutaceae* (Junghanns et al., 1998).

Les quinoléines sont généralement de distribution restreinte et centrée sur la famille des *Rutaceae*. Les teneurs en alcaloïdes sont estimées de 0,4 à 1,4 % des constituants de *Ruta graveolens*. La plupart des alcaloïdes sont communs à *Ruta graveolens*, à *Ruta chape-lensis*, à *Ruta montana*.

Certains alcaloïdes de type dihydrofuroquinoléine quater-naire, comme le ribalinium, le platydesminium, ou de type pyrannoquinoléine comme le rutilinium existent également chez *Ruta chapelensis*, *Ruta montana* et *Ruta corsica*. Ils sont considérés comme de bons « marqueurs » du genre *Ruta* (Hammiche et Azzouz, 2013).

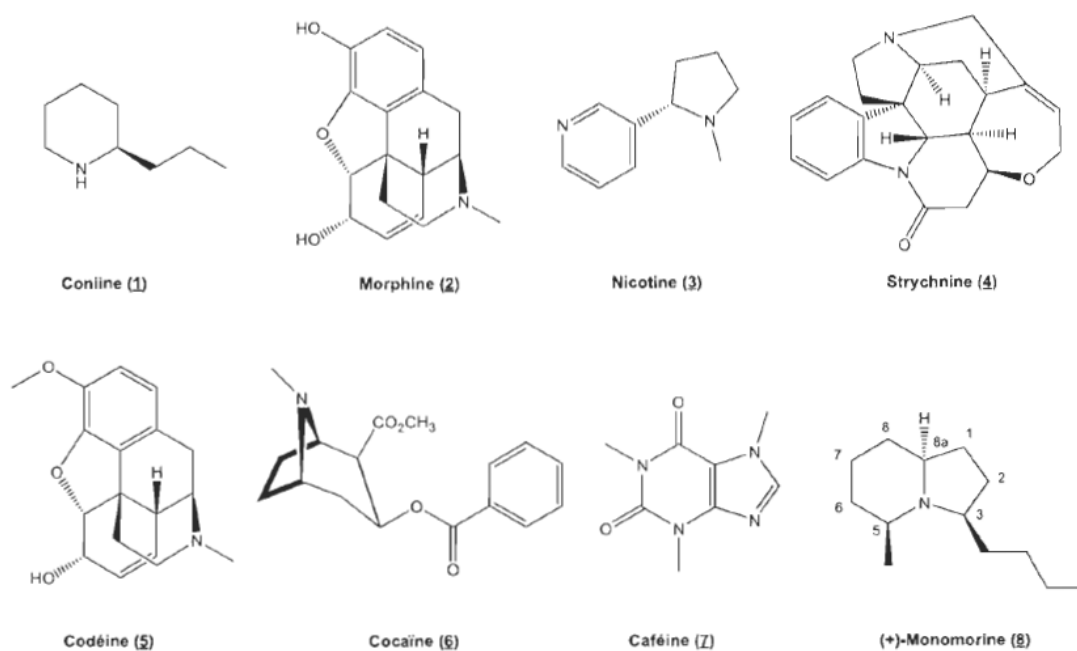


Figure 3 : Exemples d'alcaloïdes Bruneton (1999).

I.3. Activités biologiques

Les métabolites secondaires, en particulier les coumarines et les alcaloïdes, sont responsables de la plupart des activités biologiques comme de la toxicité. Les études pharmacologiques récentes semblent confirmer plusieurs propriétés attribuées à ces espèces.

I.3.1. Activité anticancéreuse

Des alcaloïdes de type des acridones et des furanoacridones, isolés de *Ruta graveolens*, ont été testés sur des cellules de cancers humains (HeLa, MCF7, A431). L'arborinine a développé une inhibition supérieure aux autres sur les trois lignées cellulaires.

Les furacridones dont la cytotoxicité est fonction de leur liposolubilité ont montré une capacité à induire l'apoptose de manière dose-dépendante, ce qui suggère qu'elles auraient des propriétés anticancéreuses (Réthy *et al.*, 2007).

Un extrait de *Ruta graveolens* s'est révélé cytotoxique vis-à-vis de cultures cellulaires cancéreuses (DLA, EAC). Il a été constaté une réduction des radicaux hydroxyles et une inhibition de la peroxydation lipidique, aux basses concentrations (Preethi *et al.*, 2006).

I.3.2. Action sur la peau

Certaines furocoumarines en particulier la xanthotoxine, sont responsables d'une repigmentation de la peau sous l'action des rayons UV. Cet effet est lié à la stimulation de la synthèse de la mélanine par deux mécanismes : par accroissement de la synthèse des mélanosomes et par accroissement de l'activité mitotique des mélanocytes cutanés, ce qui conduit à leur prolifération. Les principales applications issues de ces propriétés ont été le traitement du vitiligo et le développement de crèmes bronzantes (Hammiche et Azzouz, 2013).

I.3.3. Activité antioxydante

L'oxygène est un élément essentiel pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique. Mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxiques : les radicaux libres organiques.

Les radicaux libres ne sont pas toujours néfastes ; en fait, ils permettent au corps de contrôler la tonicité des muscles lisses, de combattre les inflammations et de lutter contre les bactéries. Cependant, l'opération bénéfique des radicaux libres dépend d'un équilibre délicat qui peut être détruit par de nombreux facteurs, notamment les polluants présents dans l'air que nous respirons et l'eau et les aliments que nous consommons. Les rayons ultraviolets du soleil, d'autres radiations, la fumée de tabac, l'exercice excessif et le stress sont également des facteurs qui augmentent considérablement la présence des radicaux libres dans notre système (Descheemaeker, 2004).

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats.

Ruta graveolens est une espèce très riche en métabolites secondaires (flavonoïdes, coumarines, alcaloïdes, huiles essentielles...) ce qui explique son pouvoir antioxydant (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2006; Raghav *et al.*, 2006).

I.3.4. Activité anti-inflammatoire et antispasmodique

La réponse inflammatoire est habituellement une réponse physiologique de l'hôte à une agression d'origine exogène (cause infectieuse, traumatique...) ou endogène (par exemple ischémie-reperfusion...) (Henson, 2005 ; Barning, 2016).

Cette réponse inflammatoire a comme but de limiter l'agression et débute habituellement par une phase d'initiation avec la libération précoce de différents médiateurs suite au signal de danger d'origine exogène ou endogène.

Puis suit une phase d'amplification et d'entretien pendant laquelle il existe une mobilisation et une activation d'effecteurs. Cette étape implique un recrutement cellulaire, avec un afflux de leucocytes polymorphonucléaires, une activation des cellules résidentes des tissus agressés, et une libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires.

En conditions physiologiques, la réponse inflammatoire est suivie d'une phase de résolution, avec disparition des cellules inflammatoires et restauration de l'intégrité des tissus agressés (Barning, 2016).

L'administration orale, à des souris, d'un extrait de feuille de *Ruta chalepensis*, avant injection d'endotoxine, a protégé les animaux de la toxémie expérimentale et mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires remarquables de cette espèce (Iauk *et al.*, 2004).

L'action d'extraits de *Ruta graveolens* sur les cellules macrophages murines a montré une inhibition significative, dose-dépendante, des médiateurs de l'inflammation (Raghav *et al.*, 2006).

Les propriétés antispasmodiques sont dues aux furocoumarines : psoralène, bergaptène et xanthotoxine et aux alcaloïdes dont les plus actifs sont des dérivés de l'acridone à l'exemple de l'arborinine (Hammiche *et Azzouz*, 2013).

I.4. Toxicité

I.4.1. Activités mutagène et carcinogène

Certaines furocoumarines, associées à des rayonnements UV, présentent une activité mutagène vis-à-vis de micro-organismes fongiques ou bactériens. L'addition des dérivés du psoralène peut affecter également les acides gras insaturés membranaires ainsi que certaines protéines. Des tests effectués sur *Salmonella typhimurium* ont mis en évidence l'activité mutagène des alcaloïdes de type gravacridone d'un extrait de racines de *Ruta graveolens* (Viola *et al.*, 2009).

D'autres furocoumarines activent la croissance de certaines cellules tumorales. Ces expériences, *in vitro*, tendent à impliquer ces furocoumarines comme molécules potentiellement carcinogènes (Housman *et al.*, 2002 ; Pang *et al.*, 2017).

I.4.2. Action sur les enzymes

Les furocoumarines linéaires sont des inhibiteurs d'enzymes de type cytochrome P450 dans le foie de mammifères ou chez les insectes. Ces enzymes sont impliquées dans la détoxification de xénobiotiques. Ainsi, lors d'une prise médicamenteuse, associée à une consommation d'aliments contenant des furocoumarines comme le jus de pamplemousse, intervient une inhibition des enzymes hépatiques, ce qui conduit à une accumulation, potentiellement toxique, du médicament chez le sujet (Ho *et al.*, 2001 ; Hammiche *et Azzouz*, 2013).

I.4.3. Action sur la sphère génitale

Des extraits bruts de *Ruta chalepensis*, testés sur des rats femelles, ont mis en évidence l'activité anti-fertilité des coumarines identifiées avec développement, chez 70 % des animaux, des follicules kystiques.

L'administration, per os, l'extrait de *Ruta* pendant quatre jours à des souris conduit à la formation d'une forte proportion d'embryons anormaux, 36,7 et 63,6 % pour les extraits à 10 et 20 % (Gutiérrez-Pajares et al., 2003).

Le rôle des extraits de rue sur les organes sexuels et les hormones mâles a également fait l'objet de recherches. Il est fait état, pour la première fois, du rôle de *Ruta graveolens* dans la motilité des spermatozoïdes. L'administration orale, durant 30 jours, d'extraits aqueux de *Ruta* à des rats mâles a conduit à une diminution de plusieurs paramètres : densité et motilité des spermatozoïdes, volume des testicules, taux de testostérone et FSH (Sharma et al., 2017).

I.4.4. Phototoxicité

Les furocoumarines sont photosensibilisantes et causent de graves dommages cutanés, en particulier le 5-méthoxypsoralène (bergaptène) et le 8-méthoxypsoralène (xanthotoxine), composés volatils présents dans les HE de *Ruta montana* et *Ruta graveolens*. Plusieurs cas de réactions phototoxiques sont signalés chez l'homme, à la suite de contact cutané avec des espèces appartenant à la famille des *Rutaceae* (plus particulièrement, le genre *Ruta* : *Ruta graveolens* et *Ruta chalepensis*) et d'exposition aux UV (Hammiche et Azzouz, 2013).

CHAPITRE II :

Matériels et méthodes

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

II. 1. Origine de la plante

La rue fétide (*Ruta graveolens* L.) a été récoltée en mois de mars 2017, au niveau de Mazagran dans la wilaya de Mostaganem.

II. 2. Extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols a été effectuée selon la méthode de [Mokhtar et al. \(2014\)](#). 100g de feuilles fraîches broyées de *Ruta graveolens* a été mélangée avec 200 mL de 0.05% (v/v) HCl/solvant (10:90) dans un sonicateur pendant 30min. Deux extractions ont été effectuées, la première avec le méthanol et la deuxième avec l'acétate d'éthyle. Les deux extraits ont été par la suite filtrés avec un papier Whatman (No. Z146374-100EA) et combinés. Le mélange a été évaporé avec un rotavapor à une température de 40°C.

II. 3. Détermination de rendement d'extraction :

Le rendement de l'extraction des polyphénols a été exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$R = (M_1 / M_0) \times 100$$

R : rendement de l'extraction en %

M₁ : masse en gramme de l'extrait final.

M₀ : masse en gramme de la matière végétale initiale.

II. 4. Dosage des polyphénols totaux

II. 4. 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été effectuée en lisant l'absorbance des différentes concentrations (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 µg/mL) de l'acide gallique à une longueur d'onde de 725 nm.

II. 4. 2. Calcul des polyphénols totaux

Le contenu en polyphénols totaux de l'extrait de *Ruta graveolens* a été déterminé selon la méthode colorimétrique de [Gutfinger \(1981\)](#) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) et l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) de ce réactif en un mélange bleu d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}).

Un volume de 100 µL de l'extrait est mélangé avec 4,9 ml d'eau distillée et 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3 minutes, 1 mL de solution de carbonate de sodium (35% p/v) est additionnée et le mélange a été complété par de l'eau distillé pour avoir un volume final de 10 mL. Après 30 min d'incubation en obscurité, l'absorbance a été mesurée à 725 nm. La teneur en phénols totaux de l'extrait est déterminée graphiquement et exprimée en termes d'équivalent d'acide gallique (mg /g d'extrait).

II. 5. Détermination des flavonoïdes totaux

II. 5. 1. Courbe d'étalonnage de la quercétine

La courbe d'étalonnage de la quercétine a été effectuée en lisant l'absorbance des différentes concentrations de quercétine (15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 µg/mL) à une longueur d'onde de 415 nm.

II. 5. 2. Calcul des flavonoïdes des totaux

Le taux des flavonoïdes totaux a été estimé selon la méthode de [Dowd](#) adaptée par [Arvouet-Grand et al., \(1994\)](#). Elle se base sur les propriétés chélatrices de l'ion aluminium. 500 µL de l'extrait phénolique a été mélangé avec le même volume du chlorure d'aluminium

(2%). Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 415 nm contre un blanc qui contient l'échantillon sans le chlorure d'aluminium. Le taux des flavonoïdes a été exprimé par mg d'équivalent de quercétine / g d'extrait.

II. 6. Evaluation de l'activité antioxydante

Différentes techniques sont employées pour mesurer l'activité antioxydante des polyphénols de *R. graveolens*. Dans notre étude, on s'est basé sur deux méthodes : DPPH et beta carotène.

II. 6. 1. Test de réduction du radical stable DPPH°

La capacité à piéger le radical DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) des polyphénols a été évaluée selon le protocole décrit dans la littérature par [Siracusa et al. \(2011\)](#). Un volume de 37.5 µL d'extrait a été ajouté à 1.5 mL de solution de DPPH (0.1 mM). Après 20 min d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 517 nm. Les résultats sont exprimés en mMol Trolox équivalent par gram d'extrait.

II. 6. 2. Test de B-carotène

Un échantillon de 2 mg de B-carotène a été dissous dans 1 mL de chloroforme. Ensuite 2 mg d'acide linoléique, 200 mg tween (80), et 50 mL d'eau oxygéné ont été ajoutés. Un volume de 0,2 mL d'extrait est mélangé avec 5 mL de solution préparée et les tubes sont déposés dans un bain marie à 50C° pendant 2h. L'absorbance a été mesurée à 470 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard (6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL) ([Kouamé et al., 2009](#)).

II. 7. L'activité anti inflammatoire

L'effet *in-vitro* anti-inflammatoire des polyphénols de la rue des jardins a été mesuré par les tests suivants :

II. 7. 1. Test de la dénaturation d'albumine

Un volume de 1 mL de l'extrait a été mélangé avec 1 mL de solution d'albumine (1mM). Après 15 min d'incubation (27°C), les tubes sont incubés à une température de 60°C

pendant 10 min. L'absorbance est mesurée à 660 nm. L'ibuprofène est utilisé comme standard. Les résultats sont exprimés en mMol ibuprofène équivalent par gram d'extrait.

II. 7. 2. Test de stabilisation de la membrane des érythrocytes

La solution de globules rouges (GR) est préparée en mélangeant un volume de sang avec un volume de solution d'ALSEVER (2% dextrose, 0,8% citrate de sodium, 0,05% acide citrique et 0,42% chlorure de sodium dans 100 mL d'eau distillé). Après 5min de centrifugation à 3000g. Un volume de 0,5 ml de l'extrait ou du standard (diclofenac) est ajouté à un 1 mL du tampon phosphate (PH = 7,4), 2 ml de solution hypo saline (0,36%) et 0,5 mL de la solution GR. Après 30 min d'incubation à 37°C, en effectue une centrifugation pendant 20 min à 3000g. L'absorbance est mesurée à 560 nm. Le Diclofenac a été utilisé comme standard. Les résultats sont exprimés en mMol Diclofenac équivalent par gram d'extrait (Yoganandam *et al.*, 2010).

Chapitre III :

Résultats et discussions

Les métabolites secondaires se définissent comme les molécules produites par des organismes vivants (plantes, champignons, bactéries...) ne jouant pas de rôle direct pour les fonctions vitales de l'organisme, c'est-à-dire la nutrition, la croissance, et la reproduction. Ces métabolites peuvent être classés en plusieurs grandes familles, dont les plus importantes en termes de nombre de structures connues sont les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes...).

La rue des jardins, *Ruta graveolens*, est une plante très riche en principes actifs, particulièrement les polyphénols. Le but de ce travail était l'évaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des polyphénols de *Ruta graveolens*.

III.1. Calcul du rendement de l'extraction

Après l'extraction des polyphénols selon la méthode de [Mokhtar *et al.* \(2014\)](#), le rendement a été calculé selon le rapport entre la masse de l'extrait final par rapport à la matière végétale initiale. Le pourcentage obtenu est de l'ordre de 1.86 %.

III.2. Dosage des polyphénols totaux

III.2. 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été effectuée en lisant l'absorbance des différentes concentrations de ce standard à une longueur d'onde de 725 nm ; le coefficient de corrélation obtenu était : $R^2 = 0.999$; et l'équation est égale à $Y = 0.004 X + 0.031$ (figure 4).

III.2.2. Quantification des polyphénols totaux

Les plantes sont connues pour produire un grand nombre de composés à faible poids moléculaire dont la structure ne fut que récemment déterminée ; et ceci malgré leur exploitation et leur utilisation ancestrale, comme médicaments ou aliments ([Garcia- Pérez, 2008](#)). Parmi ces molécules on a les polyphénols, qui sont un groupe de composés phytochimiques, présents en grande quantité dans les fruits, les légumes et les produits naturels ([Vauzour, 2014](#)).

Le contenu en polyphénols totaux de l'extrait de *Ruta graveolens* a été déterminé selon la méthode colorimétrique de [Gutfinger \(1981\)](#) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Pour cela, la courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été utilisée.

Les résultats (tableau 3) ont été exprimés en μg d'équivalent de l'acide gallique par g d'extrait. Les résultats sont présentés dans le tableau 3. L'extrait de *Ruta graveolens* est très riche en polyphénols avec 4.163 ± 0.0394 mg EAG/g d'extrait. Ce taux est légèrement inférieur à celui trouvé par [Proestos et al. \(2006\)](#) (4.3 ± 0.4 mg EAG/g). [Djeridane et al. \(2006\)](#) ont rapporté que les feuilles de *R. graveolens* contenaient 3.13 mg GAE/g de polyphénols totaux.

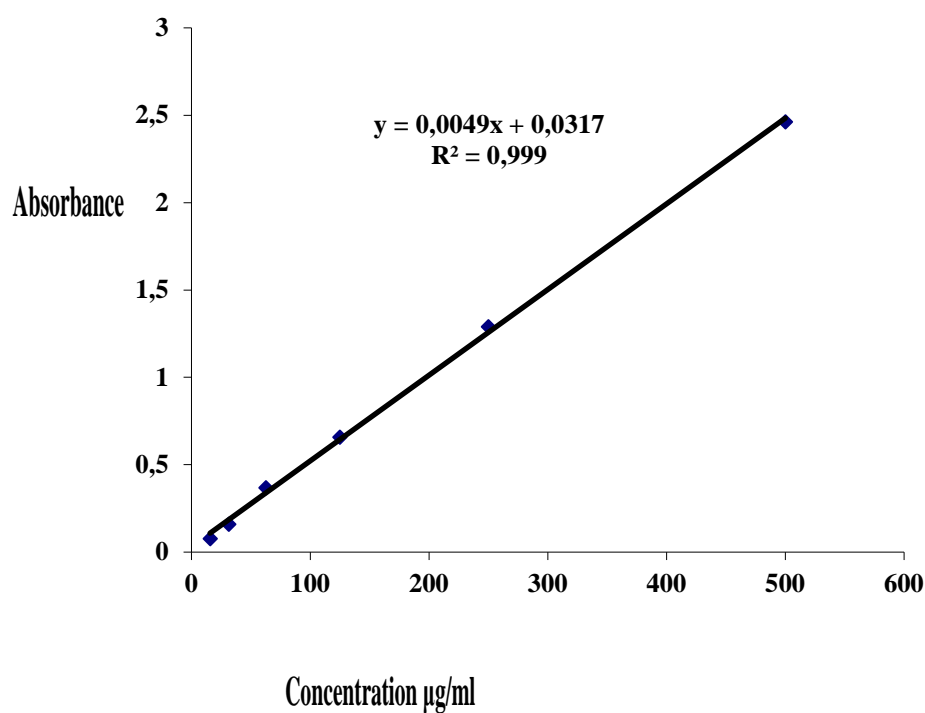


Figure 4: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

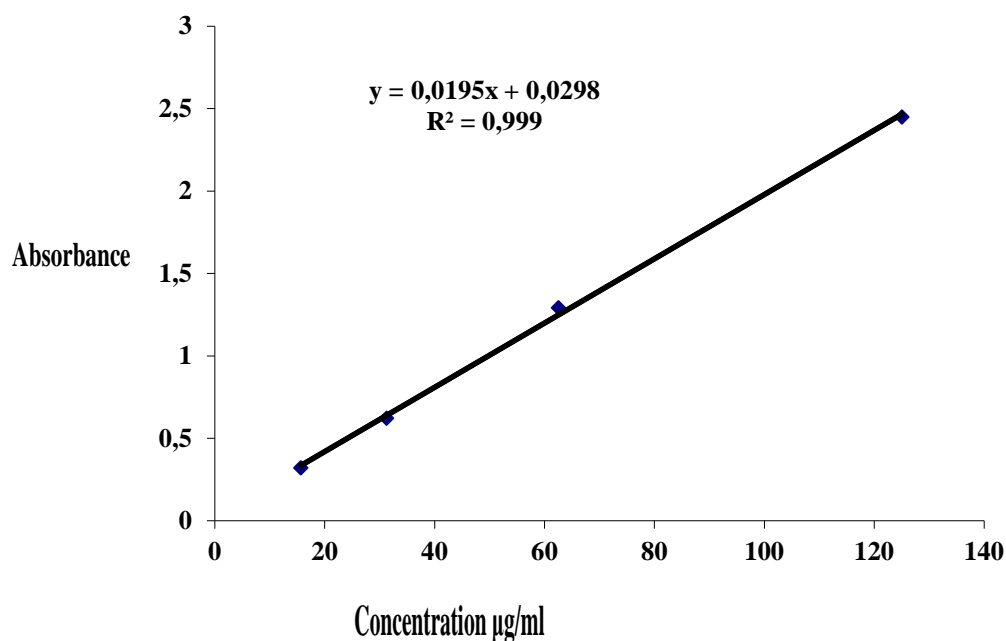
Tableau 3 : Polyphénols et flavonoïdes totaux de *R. graveolens*.

	Polyphenols totaux (mg EAG/g E)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g E)
<i>R. graveolens</i>	4,163 ± 0,394	1,397 ± 0,033

III.3. Dosage des flavonoïdes totaux

III.3. 1. Courbe d'étalonnage de la quercétine

La courbe d'étalonnage de la quercétine a été effectuée en lisant l'absorbance des différentes concentrations de quercétine à une longueur d'onde de 415 nm. Le coefficient de corrélation R^2 était 0,999 et l'équation $Y = 0,019x + 0,029$ (figure 5).

**Figure 5** : Courbe d'étalonnage de quercétine

III. 3. 2. Quantification des flavonoïdes totaux

Il existe dans les aliments plusieurs centaines de polyphénols (plus de 500 y ont été caractérisés aujourd'hui), principalement des flavonoïdes. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes. Dans les aliments, ils sont souvent présents sous forme d'hétérosides (Stoclet et Schini-Kerth, 2011).

Le taux des flavonoïdes totaux a été estimé selon la méthode de Dowd adaptée par Arvouet-Grand *et al.*, (1994). D'après les résultats présentés dans le tableau 2, l'extrait de *Ruta graveolens* une bonne quantité en flavonoïdes ($1,397 \pm 0,033$ mg EQ/g E). Cette valeur est plus que trois fois à celle trouvée par Diwan *et al.* (2012) qui ont trouvé 0.4 mg EQ/g E.

III. 4. Evaluation de l'activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Sanchez-Moreno, 2002 ; Popovici *et al.*, 2009 ; Mokhtar *et al.*, 2015).

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode universelle, unique et fiable traduisant la capacité antioxydante. En effet, pour juger de l'effet antioxydant global d'un extrait d'une ressource végétale ou alimentaire, l'utilisation de plusieurs tests d'activité est nécessaire (Rezaire, 2012). L'activité antioxydante de l'extrait phénolique de la rue des jardins a été évaluée selon deux tests : DPPH et beta carotène.

III. 4. 1. Test DPPH

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl- picrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la

capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Sanchez-moreno et al, 1998).

La courbe d'étalonnage (figure 6) a été réalisée en utilisant le trolox comme standard et les résultats du test de DPPH sont exprimés en mM trolox équivalent. Selon les résultats (tableau 4), les polyphénols de *Ruta* présente un bon effet antioxydant vis-à-vis du radical DPPH.

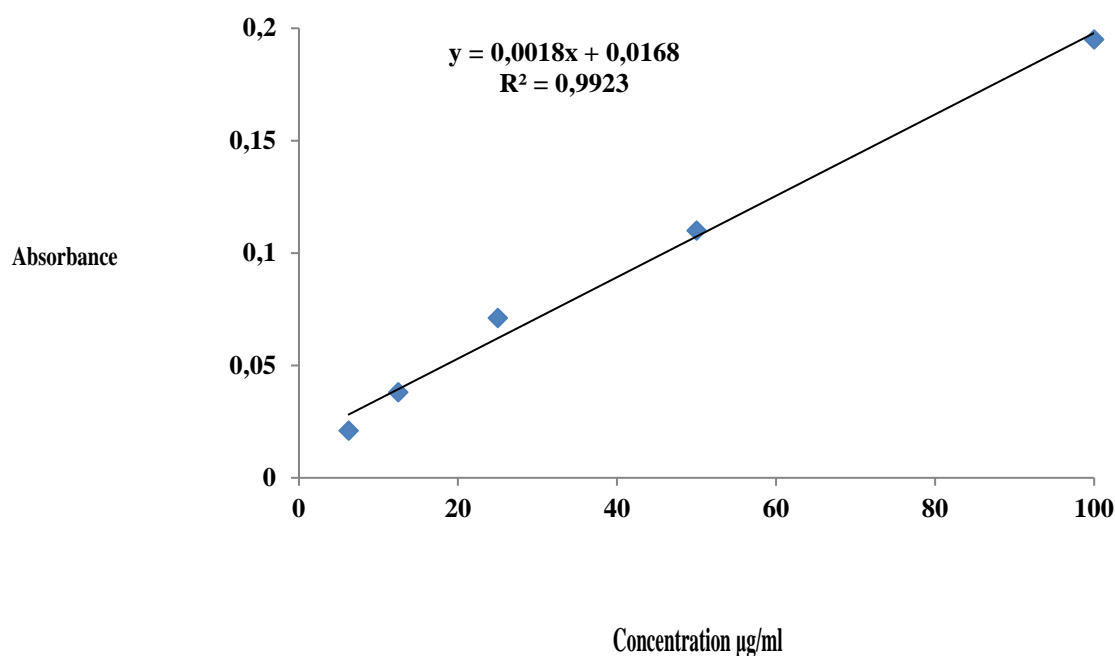


Figure 6: Courbe d'étalonnage de trolox (test DPPH)

Tableau 4 : Activité antioxydante des polyphénols de *Ruta graveolens*.

Test	DPPH (mg TE/g E)	B-carotène (mg B-CE/g E)
<i>R. graveolens</i>	5,61±0,139	1,99±0,21

L'oxygène est indispensable à la vie des organismes aérobies qui en utilisent la majeure partie comme substrat de la chaîne respiratoire pour la production d'ATP. Ce métabolisme induit la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (EROs) et de l'azote (ERAs) en équilibre avec les systèmes antioxydants (Darvesh *et al.*, 2010).

Le stress oxydant, défini comme le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants et leur élimination par les antioxydants, joue un rôle central dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, le diabète de type 2, les pathologies neurodégénératives, les maladies inflammatoires chroniques intestinales ou encore la dégénérescence maculaire (Khandhadia *et al.*, 2010).

Il a également été montré que le stress oxydant jouait un rôle central dans l'initiation, la progression et la malignité de nombreux cancers (Grek *et al.*, 2010). Afin de maintenir l'homéostasie redox de la cellule, il existe de nombreux systèmes de défense antioxydante endogènes ou exogènes, enzymatiques ou non (Rezaie *et al.*, 2012).

Un antioxydant biologique se définit comme une substance qui, lorsqu'elle est « présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat ». L'effet antioxydant des fruits et légumes est dû en partie à des micronutriments tels que les polyphénols, les vitamines C et E, les caroténoïdes... (Rice-Evans *et al.*, 1995).

Historiquement, les actions biologiques des polyphénols ont été attribuées à leurs propriétés antioxydantes, que ce soit par leur capacité réductrice intrinsèque ou par leur influence sur le statut redox intracellulaire (Halliwell, 2006).

Les polyphénols, et en particulier les flavonoïdes, sont d'excellents piègeurs d'espèces réactives directement issues de l'oxygène (O_2^{\bullet} , HO^{\bullet} , NO^{\bullet} , H_2O_2 , $HOCl$, RO^{\bullet} et ROO^{\bullet}) provenant de biomolécules telles que les lipoprotéines, les protéines et les acides oligonucléiques (ADN, ARN).

III. 4. 2. Test de B-carotène

Le test de blanchiment de B-carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique est une méthode rapide basée principalement sur le principe que l'acide linoléique, qui est un acide gras insaturé, s'oxyde par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produits par l'eau oxygénée.

Le produit formé lancera l'oxydation du B-carotène, ce qui conduira à la décoloration. Les antioxydants diminuent le degré de décoloration, qui est mesurée à 470 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme standard dans ce test. La courbe d'étalonnage est effectuée en lisant l'absorbance à une longueur d'onde de 470 nm (figure 7).

Les résultats confirment que les polyphénols de la rue des jardins ont une bonne activité antioxydante (tableau 4). [Alam et al. \(2017\)](#) ont trouvé que l'activité antioxydante de différentes plante de la rue des jardins variait entre 0.32 et 0.75 mg B-CE/g E.

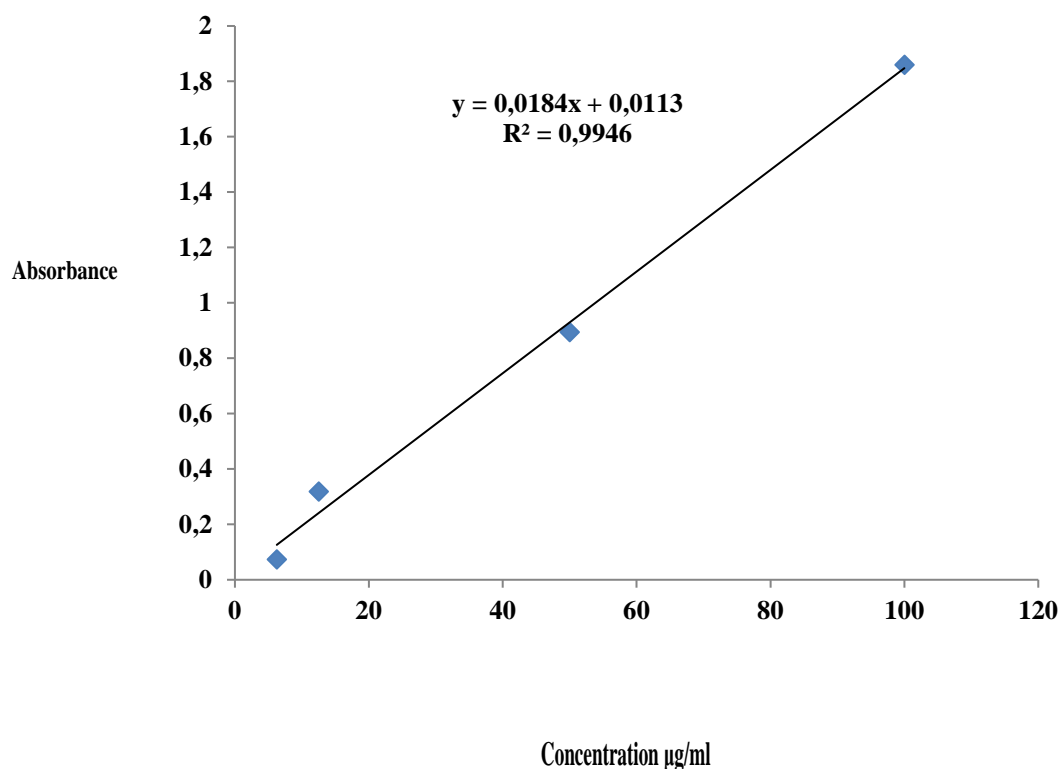


Figure 7: La courbe d'étalonnage d'acide ascorbique dans le test de B-carotène

Les polyphénols ayant des stœchiométries élevées ont une capacité importante à piéger les radicaux libres par transferts multiples d'atomes H ou d'électrons du phénol de départ et de certains de ses produits d'oxydation, comme dans le cas de la quercétine et la rutine (Goupy et al., 2009; Achat, 2013).

Cette faculté, tant étudiée et si reconnue, est fréquemment citée comme étant une clé pour la prévention et/ou la réduction du stress oxydatif en lien direct avec des maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, la carcinogénèse et les maladies neurodégénératives.

Les propriétés antioxydantes des polyphénols varient en fonction de leur structure chimique. Les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des polyphénols. Les polyphénols porteurs d'un groupement catéchol (un noyau aromatique porteur de deux fonctions hydroxyles adjacentes) ont un potentiel antioxydant élevé. Ainsi, tous les flavonoïdes portant une hydroxylation en 3' et 4' possèdent une activité antioxydante significative (Darvesh et al., 2010).

De plus, une hydroxylation supplémentaire en 5' comme sur la myricétine augmentera cette activité comparativement à des composés comme la quercétine qui en sont dépourvus. L'hydroxylation du noyau B joue donc un rôle important dans l'activité antioxydante des flavonoïdes (Shahidi et al., 2003) tandis que l'hydroxylation en 5 et 7 sur le cycle A a peu d'influence.

La glycosylation en 3 des flavonoïdes par des mono- ou disaccharides réduit leur activité antioxydante comparativement à leurs aglycones (ainsi le rutoside est moins actif que la quercétine).

III. 5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un ensemble de réactions générées par l'organisme en réponse à une agression subie. Celle-ci peut être d'origine extérieure comme une blessure, une

infection, un traumatisme, ou provenir de l'intérieur de l'organisme lui-même comme dans des pathologies auto-immunes.

Les réactions inflammatoires sont déclenchées dans le seul but de défendre l'organisme. Lorsqu'elles sont visibles, elles se manifestent classiquement par 4 signes cliniques : une rougeur, une douleur, une tuméfaction et une augmentation de la chaleur à leur niveau.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée selon deux tests : la dénaturation d'albumine et stabilisation de la membrane des érythrocytes.

III. 5. 1. Test de la dénaturation d'albumine

L'albumine est la protéine la plus abondante (60%) dans le sang. Elle est fabriquée par les hépatocytes (les cellules du foie), mais peut aussi provenir de l'alimentation (on la trouve par exemple dans le blanc d'œuf ou encore dans le lait). Elle est coagulable sous l'action de la chaleur, des acides minéraux, de l'alcool, de l'éther. Cette protéine est soluble dans l'eau et dans les solutions faiblement concentrées de sel.

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation. La production d'antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatiques qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (Bagad *et al.*, 2011).

L'ibuprofène a été utilisé comme standard et les résultats ont été exprimés en mMol ibuprofène équivalent par gram d'extrait (figure 8). Selon les résultats obtenus, l'extrait phénolique de *Ruta graveolens* possède une bonne activité anti-inflammatoire équivalente à $0,118 \pm 0,138$ mg EI/g E.

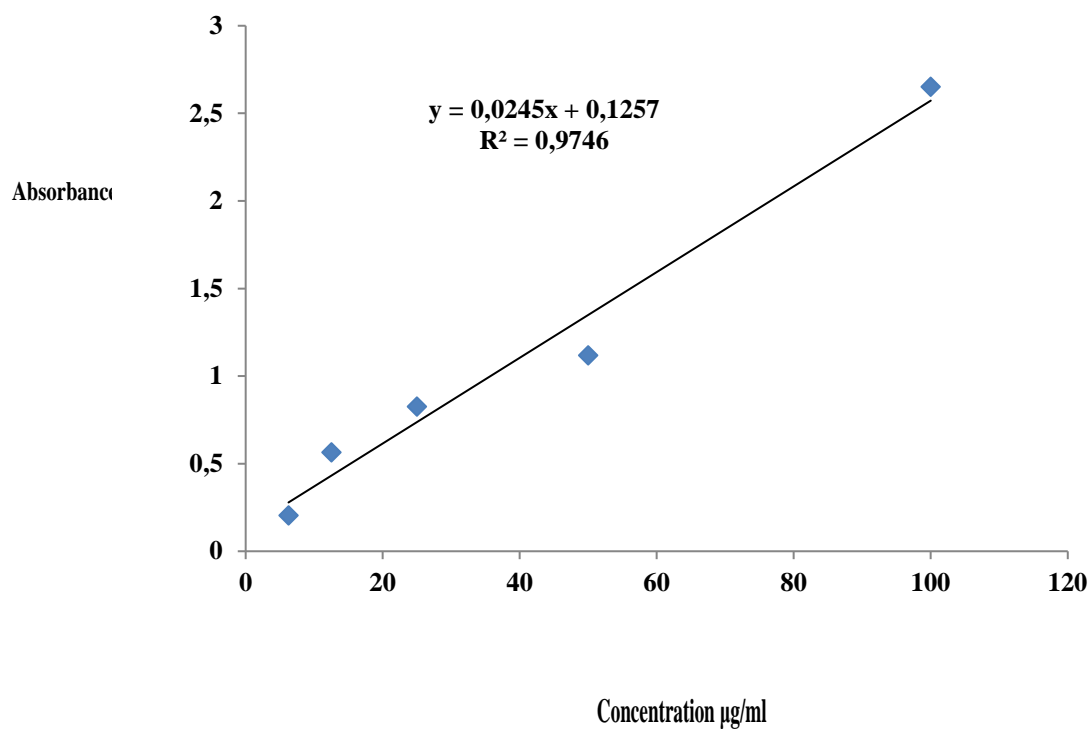


Figure 8: Courbe d'étalonnage d'ibuprofène

Tableau 5: Activité anti-inflammatoire des polyphénols de *Ruta graveolens*

Test	Albumine (mg EI/g E)	SME (mg ED/g E)
<i>R. graveolens</i>	0,118±0,138	4,629±0,101

III.5. 2. Test de stabilisation de la membrane des érythrocytes (SME)

Les lysosomes sont des organites cellulaires de 0,2 à 0,5 micron présents dans le cytosol de toutes les cellules eucaryotes, animales, à l'exception des hématies (« globules rouges »). Ils ont pour fonction d'effectuer la digestion intracellulaire grâce à une quarantaine

d'enzymes, dont des lipases, des protéases, des nucléases, des glycosidases, des phosphatases et des sulfatases.

Comme résultat de réponse inflammatoire, les enzymes lysosomales sont libérées. Ces enzymes engendrent plusieurs désordres. La membrane des érythrocytes est analogue à la membrane lysosomale et sa stabilisation implique que l'extrait peut aussi bien stabiliser les membranes lysosomales (Leelaprakash and Mohan Dass, 2011).

Le diclofénac a été utilisé comme standard (figure 9), et les résultats sont reportés dans le tableau 5. Les polyphénols de la rue des jardins (*Ruta graveolens*) exercent un bon effet stabilisateur de la membrane des érythrocytes supérieur à celui du diclofénac ($4,629 \pm 0,101$ mg ED/g E).

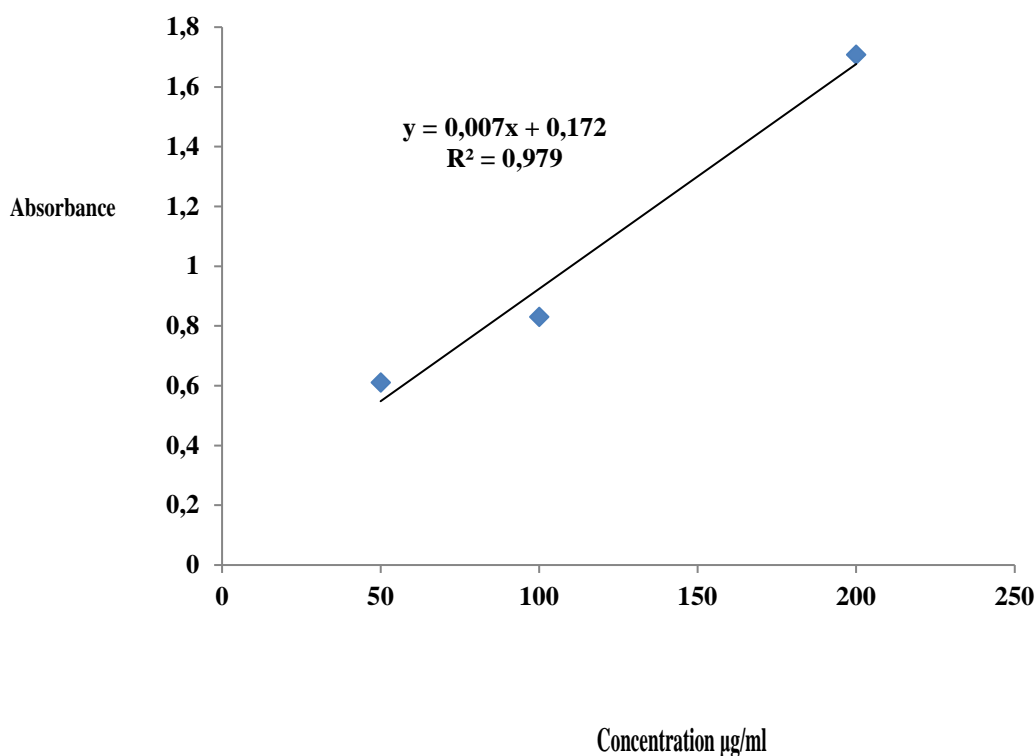


Figure 9: Courbe d'étalonnage de la Diclofénac

Les propriétés antioxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant le principal phénomène expliquant leurs effets protecteurs. Cependant, de nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation.

Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation (CRP, IL-6) dans le plasma (Salas-Salvado *et al.*, 2008), que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines (IL-8, IL-13 et IFN- α) circulantes (Karlsen *et al.*, 2007).

Des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de montrer que les polyphénols pouvaient agir sur les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) : phospholipase A2, cyclooxygénase et lipoxygénase. Ils agissent également sur la production de NO en modulant l'activité des NOS.

Une inhibition de ces enzymes par les polyphénols réduit ainsi la production d'AA, de NO, de prostaglandines et de leucotriènes, médiateurs de l'inflammation (Guo *et al.*, 2009). Des études menées *in vitro* ont également montré que des flavonoïdes comme la lutéoline ou l'apigénine inhibaient la production de cytokines telles que IL-4, IL-5 et IL-13, que la quercétine inhibait la production de TNF- α par des macrophages stimulés au lipopolysaccharide (LPS), que le kaempférol inhibait l'expression et la sécrétion du TNF- α , de l'IL-1 β ou de l'IL-6 dans les mastocytes (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2010).

De plus, il est maintenant connu que les polyphénols exercent leur activité anti-inflammatoire en agissant *in vitro* et *in vivo* sur l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Santangelo *et al.*, 2007).

Conclusion

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents chimique contre les maladies, les herbivores et les prédateurs mais aussi comme des agents médicinaux tels que les antioxydants.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires d'une plante très répandu sur les rives de la Méditerranée, la rue des jardins *Ruta graveolens*.

Cette plante contient beaucoup de substances responsables de ses vertus médicinales. Parmi ces composés, l'on cite particulièrement les flavonoïdes, les alcaloïdes, les coumarines, et les huiles essentielles. La rue est particulièrement connue pour ses propriétés fortifiantes, emménagogues, digestives, calmantes et vermifuges.

Dans un premier lieu, une extraction des polyphénols à partir des feuilles fraîches à permis d'avoir un rendement de 1.86%. Ensuite, les polyphénols et flavonoïdes totaux présents dans cet extrait ont été dosés par des méthodes colorimétriques. Selon les résultats, *R. graveolens* a un bon contenu en polyphénols et en flavonoïdes totaux avec des teneurs de $4,163 \pm 0,0394$ mgEAG/gE et $1,397 \pm 0,033$ mgEQ/gE respectivement.

Après le dosage des principes actifs, nous nous sommes intéressés sur les vertus biologiques de cette plante, et plus précisément, l'activité antioxydante et anti-inflammatoire. L'activité antioxydante a été évaluée avec deux tests : DPPH et B-carotène. Ces deux tests ont montré que les polyphénols de *R. graveolens* ont un bon pouvoir antioxydant.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée selon deux tests : la dénaturation d'albumine et stabilisation de la membrane des érythrocytes. Selon les résultats, les polyphénols de la rue des jardins ont pu protéger l'albumine de la dénaturation et ont un bon pouvoir stabilisateur de la membrane des érythrocytes.

Tous ces résultats indiquent bien que les polyphénols de cette plante pourraient être utilisés comme des antioxydants ou bien pour lutter contre l'inflammation. Sur le plan des perspectives, une étude analytique par chromatographie est importante pour identifier ces polyphénols responsables de ces activités biologiques. Nous considérons aussi qu'une étude *in vivo* est indispensable pour explorer ces résultats.

Références bibliographiques

Alam BS, Alam SQ, Weir JC, Gibson WA. Chemopreventive effects of b carotene and 13-cis-retinoic acid on salivary gland tumors.. *Nutr Cancer*. 2017 ; 6 : 4-12.

Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A., Legret P., 1994 - Standardization d'une extrait de propolis et identification des principaux constituents, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, p. 462-468

Barning C. (2016). Médiateurs lipidiques pro-résolvant dans l'inflammation allergique. *Revue Française d'Allergologie*, 56 (1), 38-42.

Bouyahya A, Abrini J, Bakri Y, Dakka N. (2016). Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action. *Phytothérapie*. DOI 10.1007/s10298-016-1058-z.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. Paris, 647-673.

Chemat F, Abert-Vian M, Fernandez X. (2013). Microwave assisted extraction of essential oils and aromas. In: Chemat F (ed). *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice*. Springer, New York, pp 53–66.

De Feo V, De Simone F, Senatore F. (2002). Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. *Phytochemistry*, 61 (5): 573–8.

Doerper S. (2008). Modification de la synthèse des furocoumarines chez *Ruta graveolens* L. par une approche de génie métabolique. Thèse de l'université de Nancy.

Eilert U (1994) *Ruta*. In: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Band 6. Drogen P-Z. Springer Verlag, Berlin.

Djeridane, A., Yous, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 97: 654-660.

Eilert U (1994) *Ruta*. In: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis. Band 6. Drogen P-Z. Springer Verlag, Berlin.

Gutiérrez-Pajares JL, Zúñiga L, Pino J (2003) *Ruta graveolens* aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. : *Reprod Toxicol* 17(6): 667–72.

Gonzalez-Trujano ME, Carrera D, Ventura-Martinez R, Cedillo Portugal E, Navarrete A. (2006). Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. In mice. *J. Ethnopharm.* 106, 129–135.

Grek CL, Tew KD (2010). "Redox metabolism and malignancy." *Curr Opin Pharmacol*, 10:362-368

Hammiche V, Azzouz M. (2013). Les rues : ethnobotanique, phytopharmacologie et toxicité. *Phytothérapie*, 11:22-30.

Henson P.M. (2005). Dampening inflammation. *Nat Immunol*, 6 (12): 1179-1181.

Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S (2001) Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Pharm Sci* 4: 217–27.

Housman TS, Rohrback JM, Fleischer ABJ, Feldman SR (2002) Phototherapy utilization for psoriasis is declining in the United States. *J Am Acad Dermatol* 46: 557–9

Iauk L, Mangano K, Rapisarda A, Ragusa S, Maiolino L, Musumeci R, Costanzo R, Serra A, Speciale A. (2004). Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta chalepensis* L., a plant with anti-inflammatory properties. *J Ethopharmacol* 90: 267–72

Junghanns KT, Kneusel RE, Groger D, Matern U (1998) Differential regulation and distribution of acridone synthase in *Ruta graveolens*. *Phytochemistry* 49: 403–11

Kabouche Z, Benkiki N, Seguin E, Bruneau C. (2003). A new dicoumarinyl ether and two rare furocoumarins from *Ruta montana*. *Fitoterapia*, 74(1–2): 194–6.

Kambouche N, Merah B, Bellahouel S. (2008). Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. *J Med Food*, 11(3): 593–5.

KOUAMÉ J., GNOULA C., PALÉ E., BASSOLÉ H., GUISSOU I P., SIMPORÉ J., NIKIÉMA J B., 2009. Etude des propriétés cytotoxiques et anti-radicalaires d'extraits de feuilles et de galles de *Guiera senegalensis*. J. F. Gmel (Combretaceae). Science et technique, Sciences de la santé. Vol 32 (1 et 2) :14p.

Milesi, S., Massot, B., Gontier, E., Bourgaud, F., Guckert, A. (2001). *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins. Plant Science, 161: 189–99.

Mokhtar M. (2015). Identification et propriétés biologiques des principes actifs du piment (*Capsicum annum* L.). Thèse de L'Université de Mostaganem.

Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R (2006) Anti-tumour activity of *Ruta graveolens* extract. Asian Pac J Cancer Prev 7(3): 439–43.

Pang GX, Niu C, Mamat N, Aisa HA. (2017). Synthesis and in vitro biological evaluation of novel coumarin derivatives containing isoxazole moieties on melanin synthesis in B16 cells and inhibition on bacteria. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27 : 2674–2677.

Prakash Yoganandam G, Ilango K, Sucharita De. Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of various extracts of *Punica Granatum* L. (Lythraceae) International Journal of Pharm Tech Research. 2010; 2(2):1260-1263.

Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.-J.E. et Komaitis, M. 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. Food Chemistry, 95: 664 – 671.

Raghav SK, Gupta B, Agrawal C, Goswami K, Das HR. (2006) Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. J Ethopharmacol 104(1–2): 234–9

Rice-Evans C.A., N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley & J.B. Pridham, 1995.- The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavoids. Free Rad.Res., 22, 375-383.

Réthy B, Zupkó I, Minorics R, et al. (2007) Investigation of cytotoxic activity on human cancer cell lines of arborinine and furanoacridones isolated from *Ruta graveolens*. Planta Med 73(1): 41–8.

Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A ., Saura-Calixto F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998., 76(2), 270-276.

Sarembaud A. (2017). *Ruta graveolens*, a useful homeopathic medicine for musculoskeletal disorders. *La Revue d'Homéopathie*. Volume 8, Issue 2 , Pages 23-26.

Sharma M, Arya D, Bhagour k, Gupta RS. (2017). Natural aphrodisiac and fertility enhancement measures in males: A review. *Current Medicine Research and Practice*, 7(2), 51-58.

Stoclet, V. Schini-Kerth J.-C. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, Volume 69, Issue 2, March 2011, Pages 78-90

Viola G, Salvador A, Vedaldi D, Dall'Acqua F, Bianchi N, Zuccato C, Borgatti M, Lampronti I, Gambari R. (2009). Differentiation and apoptosis in UVA-irradiated cells treated with furocoumarin derivatives. *Natural Comp. Role Apopt. Cell Sign. Pathw.*, 1171, 334-344.