

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الجيلالي بونعاما خميس مليانة

Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana

Faculté des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Matière



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention d'un diplôme de **Master** en Sciences de matière

Caractérisation et l'étude de l'effet thérapeutique de la plante

***Atriplex Halimus* (Algérien)**

Spécialité: chimie pharmaceutique

Thème :

Soutenue publiquement le : **25/06/2018**

Présenté par :

M^{elle} : Benallou Farah

M^{elle} : Tefret Imene

Devant le jury composé de :

- | | | | |
|---------------|--------------------|--------|-------|
| ➤ Président | HACHAMA kamal | M.C.A. | U.K.M |
| ➤ Examinateur | MEKHANEG Benyoucef | M.A.A | U.K.M |
| ➤ Encadreur | ADDAD Djelloul | M.A.A | U.K.M |

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant toute chose, nous remercions notre créateur Allah, Grand et Miséricordieux, le tout puissant pour la volonté, la santé et le courage qu'il nous a donnés pour mener ce travail à terme.

Nous remercions les membres de jury, chacun a son nom, d'accepter de juger

Notre travail. Mr **Hachama Kamel** , Mr **Mekhaneg Benyoucef**.

Nous commençons par exprimer nos profondes reconnaissances et nos vifs Remerciements à notre encadreur Mr **Addad Djelloul**. Qui nous a honoré en Acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa Disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Nous vous exprimons nos respects et nos gratitude.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont aussi à Mr Ingénieur **Tajire Balkasam** et docteur **Chamate Smail**. Membre de centre de recherche D'analyse physique et chimique de bous mail – Tipas Pour son soutien lors de la pratique au Laboratoire.

Nombreux sont qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à L'aboutissement de ce travail.

Nous remercions encore les membres de laboratoire biologique de Blida et Laboratoire génie des procédés de l'université de Djilali bounaama khmis milaina. et qui mis à mes disposition matérielles nécessaires pour la réalisation de ce Travail tout au long la période de stage.

Nos profonds respects et de nos vives reconnaissances pour nous avoir fait bénéficié de votre expérience et de vos rigueurs

Scientifiques et professionnelles.

Enfin à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de modeste travail.

Farah et imene



Dédicace

A mon père

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller

Toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras et pour son

Enseignement continu.

A ma mère

Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son

Écoute permanente et son soutien.

Mes chers parents que Dieu vous garde.

A mes chers frères et sœurs : Ahmed ,Nouha ,romaissa et yacine,

Pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

A mes fidèles amies Mohamed H, mokhtar R, Hadjare S, Sabrina H, Salima A,

Abd alkader B, Fatima A, Nourdine R, à mes collègues, à toute ma famille

Paternelle BENALLOU et maternelle ANNANE

A la personne que j'ai trouvé au moment difficile de ma vie « Mohammed.F » pour

sa patience et de m'avoir tenu la main jusqu'à la dernière ligne de ce mémoire pour

son encouragement et son soutien

A ma cher binôme Imene et sa famille

A mon cher encadreur Mr Addad djelloul

A mes amies de kHmis Miliana et d'université

A tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail je voudrais adresser mes

Remerciement à tous ceux qui j'ai oublié de nommer

En fin, à tous ceux qui m'aime

FARAH

Dédicace

*Je dédie ce modeste mémoire : à mon père BENOUCHEF et ma
Chère mère FATIMA qui dieu la bénisse, pour leur bonté leur
Générosité et encouragement*

Aussi je dédie ce travail

À Mes frère Maklfi, Ahmed, Mohamed, et Abdelkader

À Mes sœurs : Saida, Houria, Souad, Fadhila, Maryam, Fatiha

À mes oncles et mes tantes, ma grande famille

*Men amis : Fatiha, Hannan, Hadjar, Souhila,
Hamida, Iman, Nadjet, Rafika, Khadidja, Kenza, et Djamila*

Mon binôme : Farah

À mon cher encadreur Mr Addad djelloul

À mes amies de khemis Miliana et d'université

En fin, à tous ceux qui m'aime

Imene

ملخص

هذه مدكرة تهتم بدراسة نبتة طبية *Atriplex halimus* (قطف حلمي) المتواجدة في شرق الجنوب الجزائر بتحديد في وادسوف حيث يتم استخراج الزيوت الطيارة عن طريق تقنية التقطير البخاري والاستخلاص بالمحاليل الطيارة . إستنتجنا أن كمية الزيت المتواجدة في النبتة و المستخلصة عن طريق عملية التقطير ضعيف جدا حيث قدرت 0.01 % معايرة الزيت الطيار بواسطة الكروماتوجرافي الغازي و تحت الأحمر أعطت 13 مركب عبر الكروماتوجرافي الغازي تم تحديد المركبات الرئيسية *Phytol et undecylic acid* 31.6% و 26.6% . تم معايرة المستخلصات بالمحاليل الطيارة بطريقة الفصل الكروماتوجرافي السائل HPLC وتحت الأحمر IR. نتائج المؤشرات الفيزيائية (الأس الهيدروجين مؤشر الانكسار والكثافة النوعية) والمؤشرات الكيميائية المقاسة (الحموضة لتصبين و الاستر) مطابقة لنتائج المنظمة الفرنسية AFNOR. كما أجرينا اختبارات مضادة للبكتيريا للعينة على ثلاثة أنواع من بكتيريا من خلال تقنية Aromatogramme *Pseudomonas aeruginosa et Escherichia coli et klebsiella pneumoniae* ومنها استنتجنا أن هذا المستخلص له تأثير ضعيف على جميع البكتيريا المجرب عليها. كما قمنا بدراسة فعالية المستخلص المائي لنبتة *Atriplex halimus L* في تخفيض نسبة سكري مجرب على الأرناب لأليفة بنسبة مئوية. كلمات البحث: قطف حلمي ، الزيوت طيارة ، IR, HPLC, CPG ، المؤشرات الفيزيائية، المؤشرات الكيميائية Aromatogramme مضادة للبكتيريا ، تخفيض نسبة سكري.

Résumé

Les travaux présents dans cette mémoire contribuent à la valorisation d'une plante médicinale *Atriplex halimus* qui est se trouve dans sud Est de l'Algérie et plus précisément à Oued Souf, dont l'extraction des huiles essentielles est réalisée par la technique d'hydrodistillation et d'extraction par les solvants volatiles

Le rendement d'huile essentielle extrait dans cette plante de 0.01% par hydrodistillation est très faible, macération 6.3% et soxhlet 14.74%.

L'huile essentielle a été analysée par chromatographie en phase gazeuse CPG et infrarouge IR. les résultats de l'analyse CPG montrent 13 composants différents dont les composés majoritaires sont *Phytol* (31.6%) et *undecylic acid* (26.6%).

Les extraits par les solvants volatiles sont analysés par de chromatographie liquide haute pression HPLC et infrarouge IR.

Les résultats des caractérisations physiques (pH, la densité et l'indice de réfraction) et les caractérisations chimiques (indice d'acide, saponification et l'ester) mesurés sont conformes aux normes d'AFNOR.

Les tests antibactériens réalisés par la technique d'aromatogramme par les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli et klebsiella pneumoniae*, ont permis de constater que notre extrait a une très faible activité antibactérienne sur les trois bactéries.

L'activité hypoglycémie de l'extrait aqueux brut d'*Atriplex halimus* à été test sur les lapins domestique par un pourcentage.

Mots clé : *Atriplex Halimus*, huile essentielle, CPG, HPLC, IR. Caractérisation physique, caractérisation chimique, aromatoigramme et antibactérien, L'activité hypoglycémie.

Summary

The works present in this thesis contribute to the valorization of a medicinal plant *Atriplex halimus* which is found in south-east of Algeria and more precisely in Oued Souf, whose extraction of essential oils is carried out by the technique of hydrodistillation and extraction with volatile solvents.

The yield of essential oil present in this plant and extracted by hydrodistillation is very low 0.01%, macération 6.3% et soxhlet 14.74%.

The essential oil was analyzed by GC gas chromatography and infrared IR. The results of the GC analysis show 13 different found components whose major compounds are Phytol (31.6%) and undecylic acid (26.6%).

The volatile solvent extracts are analyzed by high pressure liquid chromatography HPLC and infrared IR.

The results of the physical characterizations (pH, density and refractive index) and the chemical characterizations (acid number, saponification and ester) measured comply with AFNOR standards.

The antibacterial tests carried out by the aromatoigram technique by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, made it possible to note that our extract has a very weak antibacterial activity on the three bacteria.

The hypoglycemic activity of the crude aqueous extract of *Atriplex halimus* L was tested on domestic rabbits consequence of the percentage.

Keywords: *Atriplex halimus* , Essential oil , CPG, HPLC, IR. Physical characterization,

Chemical characterization, aromatoigram and antibacterial, Hypoglycemia activity.

Liste de Figure

Fig.01: Plante d' <i>Atriplex halimus</i>	06
Fig. 02: principe de la technique d'hydro distillation.....	13
Fig.03: montage de l'entrainement à la vapeur d'eau.....	14
Fig.04 : montage du soxhlet	15
Fig.05 : montage de micro-onde	16
Fig.06: général de la procédure expérimentale.....	19
Fig.07 : Mapp Algérie représenté localisation de A.Halimus de El Oued- souf (El-Oued).20	
Fig.08 : Le PH mètre	21
Fig.09: pycnomètre de C.R.P.C.....	22
Fig.10: Réfractomètre de Carl Zeiss.....	22
Fig.11: la chromatographie en phase gazeuse CPG.....	23
Fig.12: Les organes d'une chaine HPLC.....	24
Fig.13: Spectroscope IRTF(ALPHA).....	25
Fig.14: le spectrophotomètre UV-Visible de la boratoire C.R.A.P.C	25
Fig.15 : lapin domestique.....	26
Fig.16: Montage de l'Hydro distillation (Clvenger) et ampoule à décantation employé pour l'extraction des huiles essentielles.....	28
Fig.17: extraction par solvant (Rota vapeur) de C.R.PC.....	29
Fig.18: montage du soxhlet	30
Fig.19 : mesure par pycnomètre	33
Fig.20: chromatographie en phase gazeux de (CRAPC).....	36
Fig.21: Procédure du test de la sensibilité aux antimicrobiens par la méthode de disques.....	42
Fig.22: préparation d'extrait aqueux dans la plaque chauffant	43
Fig.23: Test la glycémie de lapin	44
Fig.24: le gavage d'extrait aqueux d'A. Halimus.....	45

Fig.25: préparation le mesure de gavage	45
Fig.26: l'extrait méthanoïque d' A. Halimus	46
Fig.27: l'extrait éthanoïque d' A. Halimus.....	46
Fig.28: chromatogramme en phase gazeuse d'huile essentielle d' A. Halimus.....	51
Fig.29: chromatogramme en phase liquide d'extrait méthanoïque d' A. Halimus.....	53
Fig.30 : chromatogramme en phase liquide d'extrait méthanoïque d' A. Halimus.....	53
Fig.31 : spectre IR d'huile essentielle d' A. Halimus.....	56
Fig.32: spectre IR d'extrait d' A. Halimus	57
Fig.33: Courbe de balayage	61
Fig.34: Courbe étalonnage	62
Fig.35 : la glycémie des 4 lapins de la 1 ^{ière} semaine	63
Fig.36: Test de la tolérance orale des lapins au glucose.....	65
Fig.37: Évolution du poids des lapins durant les troisièmes semaines de traitement.....	65
Fig.38: Effet de l'extrait sur la glycémie des lapins pendant 4 heures.....	66

Liste de Tableau

Tableau 1 : Répartition des espèces d' <i>Atriplex</i> dans le monde.....	04
Tableau 2. Classification classique et phylogénétique du genre <i>Atriplex</i>	05
Tableau 3: les coordonnées géographiques des stations de récolte.....	20
Tableau 4: présente le matériel essentiel utilisé dans la réalisation.....	21
Tableau 5: les souches bactériennes utilisées.....	40
Tableau 6: Caractéristiques organoleptiques d'extrait	46
Tableau 7 : rendement d'HE de <i>A. Halimus</i>	47
Tableau 8 : présente le rendement d'extraction en huile essentielle à partir de la plante de menthe dans l'Algérie et la Libye et le Maroc par la méthode d'hydro distillation.....	47
Tableau 9: Rendement d'huile essentielle de différentes plantes en Algérie par d'hydrodistillation.....	47
Tableau 10: rendement d' <i>A. Halimus</i> par macération et Soxhlet	48
Tableau 11: Rendement en concrètes de différents types de plantes en Algérie par la méthode de Soxhlet (par solvant).....	49
Tableau 12: Caractéristiques physiques de l'extrait <i>A. Halimus</i>	49
Tableau 13 : identification probable de l'huile essentielle d' <i>A. Halimus</i> par CPG.....	51
Tableau 14: Analyse par HPLC de l'extrait éthanoïque et méthanoïque <i>A. Halimus</i>	54
Tableau 15 : les indices de l'extrait <i>A. Halimus</i>	58
Tableau 16: les résultats des indices de saponification et d'acide et ester.....	59
Tableau 17: les résultats de test antibactérien sur les trois souches bactériennes.....	60
Tableau 18: balayage de la longueur d'onde λ	61
Tableau 19: l'étalonnage par différentes concentrations	62
Tableau 20: l'absorbance de concentrations différentes de sucre dans l'extrait aqueux.....	62
Tableau 21: représente la glycémie de deux lapins à 12 h et 24 h dans le cas de toxicité	64

Liste de Tableau

Tableau 1 : Répartition des espèces d' <i>Atriplex</i> dans le monde.....	04
Tableau 2. Classification classique et phylogénétique du genre <i>Atriplex</i>	05
Tableau 3: les coordonnées géographiques des stations de récolte.....	20
Tableau 4: présente le matériel essentiel utilisé dans la réalisation.....	21
Tableau 5: les souches bactériennes utilisées.....	40
Tableau 6: Caractéristiques organoleptiques d'extrait	46
Tableau 7 : rendement d'HE de <i>A. Halimus</i>	47
Tableau 8 : présente le rendement d'extraction en huile essentielle à partir de la plante de menthe dans l'Algérie et la Libye et le Maroc par la méthode d'hydro distillation.....	47
Tableau 9: Rendement d'huile essentielle de différentes plantes en Algérie par d'hydrodistillation.....	47
Tableau 10: rendement d' <i>A. Halimus</i> par macération et Soxhlet	48
Tableau 11: Rendement en concrètes de différents types de plantes en Algérie par la méthode de Soxhlet (par solvant).....	49
Tableau 12: Caractéristiques physiques de l'extrait <i>A. Halimus</i>	49
Tableau 13 : identification probable de l'huile essentielle d' <i>A. Halimus</i> par CPG.....	51
Tableau 14: Analyse par HPLC de l'extrait éthanoïque et méthanoïque <i>A. Halimus</i>	54
Tableau 15 : les indices de l'extrait <i>A. Halimus</i>	58
Tableau 16: les résultats des indices de saponification et d'acide et ester.....	59
Tableau 17: les résultats de test antibactérien sur les trois souches bactériennes.....	60
Tableau 18: balayage de la longueur d'onde λ	61
Tableau 19: l'étalonnage par différentes concentrations	62
Tableau 20: l'absorbance de concentrations différentes de sucre dans l'extrait aqueux.....	62
Tableau 21: représente la glycémie de deux lapins à 12 h et 24 h dans le cas de toxicité	64

Sommaire

Introduction générale	01
------------------------------------	-----------

Chapitre I : Généralité sur l'*Atriplex*

I.1. Généralité sur l' <i>Atriplex</i>	03
I.1.1. <i>Atriplex</i> dans monde	03
I.1.2. <i>Atriplex</i> en Algérie.....	03
I.1.3. Propriétés écologiques de l' <i>Atriplex</i>	04
I.1.4. Intérêt fourrager.....	05
I.1.5. Description taxonomique.....	05
I.1.6. Systématique.....	06
I.1.7. Origine.....	06
I.1.8. Description.....	06
I.1.9. Nutrition d' <i>Atriplex. Halimus</i>	07
I.1.10. composition d' <i>A. Halimus</i>	07
I.1.11. Utilisation d' <i>Atriplex halimus</i> et les domaines d'application.....	07
I.2. Les huiles essentielles.....	08
I.2.1. Définition des huiles essentielles.....	08
I.2.2. Répartition, localisation des huiles essentielles dans les plantes.....	08
I.2.3. Composition chimique des huiles essentielles.....	08
I.2.4. Les composés aromatiques.....	09
I.2.5. Conservation des huiles essentielles.....	09
I.2.6. Domaine d'utilisation d'huile essentielle.....	10
I.2.7. Toxicité des huiles essentielles.....	10
I.2.8. Activité biologique des huiles essentielles.....	10
I.2.9. Activité antimicrobien des huiles essentielles.....	10
I.2.10. Aperçus sur le mode d'action des huiles essentielles.....	11
I.3.1. Tests phytochimiques	11

Chapitre II : les procédés d'extraction des huiles essentielles

II.1. Introduction	12
II.2. Différentes techniques d'extraction des huiles essentielles.....	12
II.3. Principales méthodes d'extraction.....	12

II.3.1. Hydro distillation	12
II.3.2. Distillation à vapeur.....	13
II.3.3. Distillation par entrainement à la vapeur d'eau.....	13
II.3.4. Extraction à froid.....	14
II.4. Méthodes d'obtention des extraits volatiles.....	14
II.4.1. Extraction par solvant volatile	14
II.4.2. Extraction assistée par micro-onde.....	15
II.4.3. Extraction par dioxyde de carbone (fluide supercritique).....	16

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III.1. Matériel	20
III.1.1. Matériel végétale	20
III.1.2. Matériel de laboratoire et produits utilisés	21
III.1.3. Matériel d'extraction.....	21
III.1.3.1. Matériel de caractérisation.....	21
III.1.3.2. pH mètre.....	21
III.1.3.3. pycnomètre.....	22
III.1.3.4. refractomètre	22
III.1.3.5. Chromatographie en phase gazeuse CPG.....	23
III.1.3.6. Chromatographie liquide à haute performance HPLC	23
III.1.3.7. infrarouge IR.....	24
III.1.3.8. Spectrophotométrie UV-visible.....	25
III.1.4. Matériel biologique	26
III.2. Méthodes.....	27
III.2.1. Séchage des plantes.....	27
III.2.2. Extraction des huiles essentielles	27
III.2.2.1. Principe d'hydrodistillation.....	27
III.2.2.2. Mode opératoire.....	28
III.2.2.3. Principe de Rotavapeur.....	29
III.2.2.5. Principe d'ultrasonique-cleaner	30
III.2.2.6. Extraction par solvant (Soxhlet).....	30
III.2.2.7. Préparation des échantillons.....	31
III.2.2.8. Elimination et recyclage du solvant organique	31

III.3. Caractéristiques organoleptiques d'huiles essentielles d'A. Halimus.....	32
III.3.1. Détermination du rendement en huile essentielle	32
III.3.2. Calcule du rendement par macération et soxhlet	32
III.4. Etude de caractérisations chimiques et physiques.....	33
III.4.1. Caractéristiques physique	33
III.4.1.1. Mesure de PH.....	33
III.4.1.2. Mesure la densité de 20C°	33
III.4.1.3. Indice de réfraction.....	34
III.4.1.3.1. Mode opératoire	34
III.4.1.4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	35
III.4.1.5. Chromatographie liquide à haute performance (pression) ou HPLC.....	36
III.4.1.6. Spectrométrie infrarouge.....	37
III.4.2. Caractérisation chimiques	38
➤ III.4.2.1. Indice de saponification.....	38
➤ III.4.2.3. Indice d'acide.....	39
III.4.2.3.1. Mode opératoire	39
➤ III.4.2.4.Indice d'ester	39
III.5. Les souches bactériennes testées.....	40
III.5.1. Conservation de souche.....	40
III.5.2. Méthode de diffusion à partir d'un disque solide (aromatogramme).....	40
III.5.3. Mode opératoire.....	40
a-Repiquage des souches	40
b-Préparation des disques.....	41
c-Coulage des boites de pétri.....	41
d-L'ensemencement	41
e-Imprégnation des disques	41
f-Incubation.....	41
g-Lecture des résultats.....	42
III.6. Etude la photochimique et activité de l'extrait aqueux de l'A. Halimus sur le glucose.	43
III.6.1. Matériel végétal.....	43
III.6.2. Spectrophotométrie UV-visible.....	43
III.6.2.1. Mode opératoire	44
III.6.3.1. Régime alimentaire.....	44

III.6.3.2. Prélèvement du sang.....	44
III.6.3.3. Toxicité d'extrait.....	45
III.6.3.4 Test de tolérance au glucose	45

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.2.Extraction des l'extrait d'A. Halimus.....	46
IV.2.1.Caractéristique organoleptiques d'extrait d' <i>A. Halimus</i>	46
IV.2.2.Rendement d'extraction	47
IV.2.2.1. Extraction par macération et soxhlet.....	48
IV.3.Caractérisations physiques	49
➤ IV.3.1.PH	49
➤ IV.3.2.Densité relative.....	49
➤ IV.3.3.L'indice de réfractomètre.....	50
IV.3.4.Chromatographiques en phase gazeuse CPG	50
IV.3.5.Analyse de chromatographie de liquide de haute pression (HPLC).....	53
IV.3.6.Spectroscopie infrarouge (IR).....	56
a- l'Analyse IR d'huile essentielle d'A. Halimus	56
b-Analyse IR de l'extrait d'A. Halimus	57
IV.5.Caractéristique chimique de extrait A. Halimus.....	58
➤ IV.5.1.Indice de saponification.....	58
IV.6.L'étude de l'activité biologique.....	60
IV.6.1.Etude de l'activité antimicrobienne d'extrait A. Halimus	60
IV.7. Activité de l'extrait aqueux sur le glucose l'A. Halimus	61
IV.7.1.Introduction	61
IV.7.2. La concentration d'extrait aqueuse A. Halimus.....	61
IV.7.2.Régime alimentaire.....	63
IV.7.3.Toxicité d'extrait de l'A. Halimus.....	63
IV.7.4.Test de tolérance orale au glucose	64
IV.7.5.Evolution du poids des lapins	65
IV.6.7. Test à court terme.....	66
Conclusion générale	
Annexe	70
Référence bibliographique	

Introduction générale

Introduction

Introduction

De nos jours, les plantes médicinales sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. Les traitements par les plantes tiennent une place prépondérante et connaissent un nouvel engouement vu la part croissante d'utilisation des plantes médicinales.

Le règne végétal est une source présumée inépuisable d'une immense variété de médicaments potentiels. La valorisation de ces ressources naturelles végétales passe essentiellement par l'extraction et l'analyse chimique. Les plantes médicinales contiennent une grande diversité de composés différents. Parmi lesquels certains peuvent exercer une activité biologique.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources végétales par des recherches scientifiques afin de retrouver les molécules porteuses de l'effet thérapeutique de la plante médicinale spontanée à la région sud-est Algérie à Oud-Souf *Atriplex halimus*. Cette plante bien percer le mystère de milieux Médicinales. Le choix des plantes étudiées repose simplement sur une tradition ancestrale d'utilisation et il n'y a que peu de recherche scientifique.

Dans ce mémoire, on propose d'étudier une Plante Médicinales et Aromatique (PAM), qui poussent à l'état spontané dans le sud-est d'Algérie. L'étude ont va préciser la détermination la caractérisation botanique de cette espèce puisque il ya plusieurs espèce différent d'*Atriplex* en Algérie. En ayant une connaissance sur les propriétés chimiques et biologiques de produit naturel à l'échelle moléculaire, on pourra être en mesure de mieux exploiter la ressource naturelle et de créer de stratégie innovante pour une gestion durable de la flore algérienne.et

Applique Différentes méthodes d'extraction peuvent être envisagées, La composition chimique des huiles essentielles présente un intérêt important des domaines chimistes et biologistes. L'est réservée à l'évaluation des propriétés pharmacologiques de huile essentielle et les caractérisations physique et chimique, et des extraits bruts aptitudes à inhiber la croissance bactérienne et on a étudié l'activité hypoglycémie des extraits aqueux de notre plante reconnue traditionnellement pour son utilisation réponde chez les diabétiques [1]. La détermination des propriétés chimique et biologique qui permet de les caractériser et de mettre en évidence une éventuelle application en pharmacie, en cosmétique.

Introduction

Le manuscrit comporte deux parties principales :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres :

- ✓ Le premier chapitre est consacré à l'étude bibliographique d'espèce sélectionnée. Cette section est intéressée à l'étude botanique et chimique détaillée de la plante choisie.
- ✓ Le deuxième chapitre a fait l'objet d'étude chromatographique. Notamment, on a utilisé les méthodes d'analyses pour caractériser les extraits par CPG, HPLC.
- ✓ Le troisième chapitre résume succinctement la biologie des produits naturels issus de la biomasse. Cette partie résume la méthodologie suivie lors de l'évaluation des propriétés pharmacologiques d'un principe actif extrait de plante.

Dans la deuxième partie de ce travail, on a présenté en détail des résultats obtenus. La première section de cette partie rapporte les protocoles expérimentaux et les techniques de caractérisations, mis en œuvre pour déterminer la composition chimique de l'extrait ainsi que les méthodes utilisées pour évaluer les activités biologiques. La composition chimique d'extrait de cette espèce sélectionnée est décrite. Ensuite, cette section fait partie de la partie expérimentale rapporte l'analyse qualitative d'extrait étudiées. Les activités antibactériennes d'extrait d'*Atriplex Halimus* ont été exposées dans cette partie.

A la fin de la deuxième partie, on a présenté les essais phytochimiques réalisés sur les extraits aqueux à savoir les résultats phytochimique et l'identification par polyphénols. Une évaluation de l'activité hypoglycémique des extraits aqueux est ensuite réalisée. On a terminé ce travail par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Chapitre I :
Généralité sur Atriplex

I.1. Généralité sur l'*Atriplex*

Les *Atriplex* sont des plants arbustes vivaces et halophytes présent dans la plupart des régions du globe, ce développe sur les surface riche en chlorures et nitrates (terrains salés) [2].

Les *Atriplex* comprennent environ **417** espèces de **48** dans le bassin méditerrané, et **5** espèces employés pour le fourrage [3], ils se distinguent :

- ❖ *Atriplex nummularia* : en raison de productivité élevé
- ❖ *Atriplex halimus* : en raison de sa grande rusticité et sa facilité d'implantation.
- ❖ *Atriplex canescens* : en raison de sa haute productivité et son adaptation au sol sableux.
- ❖ *Atriplex glauca* : en raison de sa facilité d'implantation par semis direct et de son rôle antiérosif.
- ❖ *Atriplex mollis* : en raison de son adaptation au sol hydro morphes salés. [4]

I.1.1. *Atriplex* dans monde

Atriplex se trouve dans la plus part des régions du monde en grande Bretagne, la Sibérie, l'Alaska, la Patagonie, la Norvège et l'Afrique du sud [5]. L'espèce *A. Halimus* est spontanée dans les payé du nord de l'Afrique et proche d'orient jusqu'a Iran ver le sud. En Europe cette espèce présente dans les régions méditerranéens en Bulgarie, et aussi le massif de l'Hoggar [6].

I.1.2. *Atriplex* en Algérie

En Algérie l'*Atriplex* spontané dans les étages bioclimatiques et les régions arides et semi-arides, elle est présente dans les zones (Tiaret, Tbessa, Msila, Saida, Djelfa, Boussaâda, Biskra, Batna). *Atriplex* se rencontre aussi sur le Sahara, particulièrement dans la région de Béchar où les nappes longent les dépressions d'Oued [7].

Atriplex halimus est utilisée comme fourrage hebdomadaires des troupeaux et spécialement pour les ovines [8].

Tableau 1 : Répartition des espèces d'*Atriplex* dans le monde [9]

Pays ou régions	Nombre d'espèces et/ou sous-espèces	Pays ou régions	Nombre d'espèces et/ou sous espèce
Australie	78	Baja	25
		Californie(Mexique)	
Bassin-méditerranéen	50	Afrique du nord	22
Europe	40	Texas	20
Proche orient	36	Afrique du sud	20
Mexique	35	Iran	20
Argentine	35	Syrie	18
Californie	32	Palestine & Jordanie	17
Chili	30	Algérie & Tunisie	17

I.1.3. Propriétés écologiques de l'*Atriplex*

L'*Atriplex* présente une bonne tolérance aux conditions défavorables du milieu :

Atriplex halimus résiste à la salure et se développe normalement avec des concentrations de chlorure de sodium (NaCl) voisins de celles de l'eau de mer atteignant 30g/L [10].

L'*Atriplex* supporte des températures minimales de 5 à 10 C° [11], elle peut porter jusqu' à -10 C° [12]. cette espèce peut s'adapter à des milieux divers [13].

C'est une espèce spontanée ou cultivée dans les étages bioclimatiques humide, semi-aride et aride [14], elle prospère dans les sols sableux et limoneux [15].

L'*Atriplex halimus* s'adapte à tous types de sol argileux marneux et pousse parfaitement hors sols salés, elle préfère les sols limoneux [16].

I.1.4. Intérêt fourrager

L'*Atriplex* ont une très grande résistance à la sécheresse et constituent une réserve fourragère importante .ils sont utilisés pour l'alimentation des ovins, les caprins, et les camélidés [17]

Leur richesse en protéines (10 à 20% MS) fait d'eux des aliments qui offrent la possibilité de réaliser des préparations de concentrés riches en azote.

Ils ont généralement une teneur riche en sodium et potassium du fourrage augmente la consommation des animaux .d'*Atriplex halimus* en tant que plante fourrage dans les régions qu'exigent moins d'eau que les autres fourrages ou l'accès est l'eau difficile. [18].

I.1.5. Description taxonomique :

Tableau 2. Classification classique et phylogénétique du genre *Atriplex* [19].

Classification classique	
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Caryophyllidae
Ordre	Caryophyllale
Famille	Chenopodiaceae
Genre	<i>Atriplex</i>
Classification phylogénétique	
Ordre	Caryophyllale
Famille	Amaranthaceae

I.1.6. Systématique

D'après le Chadefaut et Emberger (1960), la systématique d'*Atriplex halimus* suivant [20].

Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous classe	<i>Apétales</i>
Série	<i>Hermaphrodites</i>
Ordre	<i>Centrospermales</i>
Famille	<i>Chénopodiaceae</i>
Genre	<i>Atriplex.</i>
Espèce	<i>Atriplex halimus</i> L.



Fig.01: Plante d'*Atriplex halimus*

Nom vernaculaire français : **arroche halime** ou **pourpier de mer**.

Nom arabe : **G'ttaf**

I.1.7. Origine

L'espèce est spontanée englobe les pays de l'Afrique du nord du proche et Moyen-Orient, et se développe dans l'ensemble de la région méditerranéenne.

Il préfère dans le Sahara septentrional et les montagnes du Sahara central et dans l'Europe méridional .elle est spontané sur le sol salin [21].

I.1.8. Description

L'A. Halimus est une plante cultivée surtout en climat aride et semi-aride [22].

D'A. Halimus est un arbuste vivace pouvant se développer au ras du sol elle prend un port très net, et caractérise par une hauteur pouvant atteindre jusqu'à 4 mètres [23].

La plante adulte est très ramifiée, ayant un aspect blanc argenté, à tige dressée d'une couleur blanche-grisâtre, à racine blanchâtre s'orientant horizontalement pivotante en surface atteindre 3 à 5 fois la longueur de tige [24].

les feuilles d'*Atriplex halimus* sont persistantes de 2 à 6 cm de long, alternes, simples entières, avec un court pétiole, ovale arrondies lorsqu'elles sont jeune, triangulaires plus au moins lancéolées ensuite, vert argenté et plus ou moins charnues, luisantes couvertes de poils vésiculaires blanchâtres très riches en sel [25].

Les fleurs sont monoïques jaunâtres, elles se regroupent en panicule allongées terminales et nues. Ces inflorescences portent souvent des fleurs mâles à cinq pétales et cinq sommets et des fleurs femelles à la base dépourvue de périanthe [26].

Les fruits composés par les deux bractéoles, arrondies en rênne, dentées ou entières, lisses ou tuberculeuses et droites. La graine est verticale, lenticulaire de couleur brune foncée de

2 mm de diamètre environ. [27], ils possèdent à leur base des valves fructifères cornées à la base 0,3 à 0,4 cm de longueur et de 0,4 à 0,5 cm de largeur, furfuracé et papyracées [28].

Atriplex Halimus est une espèce halophyte la période de fleurissant et fructifiant à partir du mois d'avril jusqu'en novembre car espèce très polymorphe. Elle préfère les sols frais, riches en humus [29].

Il existe deux sous-espèces d'*Atriplex halimus*

- ❖ La première *Atriplex halimus L. subsp Halimus*: est généralement très feuillée et se rencontre sur les zones du littoral semi-aride à humide : c'est un arbuste très ramifié malgré atteindre trois mètre de haut. [29]
- ❖ la seconde *Atriplex halimus L. subsp Scweinfurthii*: est caractérisée par des rameaux florifères long et nus dépourvus de feuilles; c'est une sous espèce plus strictement liées aux zones arides et désertiques ou saharienne. [30]

I.1.9. Nutrition d'*Atriplex. Halimus*

A. *Halimus* contiennent 32,10% de matière sèche, la Matière organique 74,30%, 25,70% minérale, et de protéines qui haute Valeur brute (20,40%), Les plus hauts niveaux Cendres (28,3%), Moins la fibre brute (14,8%) et 4,1% des lipides. [31]

I.1.10.composition d'*A. Halimus*

Les feuilles sont riches en protéines et iode, gomme, vitamines C, A et D et en chrome, saponines, acide oxalique, carotène et oligo-éléments (fer, magnésium, potassium, sodium, phosphore et calcium) dans toute la plante [32].

L'extrait aqueux de l'*A. Halimus* ainsi que le jus pressé des feuilles provoquent un effet hypoglycémique chez des rats normaux et diabétiques. [33]

I.1.11. Utilisation d'*Atriplex halimus* et les domaines d'application

➤ a- En médecine

Atriplex contient différentes espèces, utilisées de plusieurs façons, elles sont importantes dans le domaine médical, il a un effet antidiabétique, comme *Atriplex halimus* [34].

Les vertus d'*Atriplex halimus* : diurétique, tonique, stimulant, anti-dépression, anti-fatigue et anti-inflammatoire.

Selon de Laouedj Mustapha qui a mené une recherche sur la plante, elle contient l'acide rosmarinique (un principe actif); les ions de K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺ et NaCl qui luttent contre le cancer et les kystes [33].

Certains chercheurs sur les animaux, testent les effets de chrome, des preuves considérables indiquent que le chrome peut améliorer le contrôle de glycémie, en particulier le diabète de type 2 [35].

I.2. Les huiles essentielles

I.2.1. Définition des huiles essentielles

L'huile essentielle est un produit obtenu à partir de matière première végétale, soit par distillation sèche, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques.

L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par un procédé physique. [36]

Les huiles essentielles (= essences = huiles volatiles) sont : «des produits de composition

Généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et

Plus ou moins modifiés au cours de la préparation.»[37]. Il s'agit de mélanges de composés

Aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation à la vapeur ou des solvants.[38] Elles sont odorantes et très volatiles[39]

I.2.2. Répartition, localisation des huiles essentielles dans les plantes

Les huiles essentielles sont rencontrées dans diverses familles botaniques, elles sont

Largement répandues dans le monde végétal et se trouvent en quantité appréciable chez

Environ 2000 espèces réparties en 60 familles [37].

Les huiles essentielles se trouvent sur presque toutes les parties de la plante dans: les feuilles, les fleurs, les fruits, les grains, le bois et les organes souterrains et elles citent en exemple dans le cytoplasme de quelques cellules végétales respectif [40].

I.2.3. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles contiennent un grand nombre de familles biochimiques, il y a des composés le plus connu comme :

Les alcools, les phénols, les esters, les cétones, les aldéhydes [41].

Les huiles essentielles sont constituées par deux groupes exclusifs: les terpènes et composé aromatique qui dérivé de phényle propane à moins fréquent [37].

➤ a- Les terpènes

Les terpènes sont des composants les plus riches dans les huiles essentielles [37].

Ils sont subdivisés en deux classes : les mono et sesquiterpènes

- **b- Les mono terpènes ($C_{10} H_{16}$)** : représente de la classe la plus simple de la série des terpènes, et constituant de 80 à 90% de l'huile essentielle en totale.
- **c- Les sesquiterpènes ($C_{15} H_{24}$)** : représente la classe la plus diversifiée des terpènes et ils constituent de la faible quantité dans l'huile essentielle.

I.2.4. Les composés aromatiques

Les composés aromatiques sont moins habituels dans les huiles essentielles, ces composés constitués d'allyle et de propénylphénol. Ils sont très importants car responsables des caractères organoleptiques de l'huile essentielle [42].

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant divers facteurs : facteur intrinsèques et facteur extrinsèques

➤ a- Facteurs intrinsèque :

-matériel végétale c'est la partie utilisée de la plante [37].

-le stockage des matières premières avant l'extraction [43].

-l'influence du stade végétatif et forme physiologique [44].

➤ **b- Facteurs extrinsèques :**

Les conditions environnement : température, le taux d'humidité, la durée d'ensoleillement, la composition de sol et la méthode extraction utilise. [37], et aussi condition culturale : la date de semis, la date récolte, l'emploi d'engrais[45].

I.2.5. Conservation des huiles essentielles

Il est nécessaire de conserver les huiles essentielles :

La conservation des huiles essentielles exige certain précautions indispensable dans un tube en verre teinté à brun et secs fermé hermétiquement afin d'être à l'abri de l'air et lumière, elle peut être conservée à froid une température proche de 4C° [46].

I.2.6. Domaine d'utilisation d'huile essentielle

L'huile essentielle peut est être utilisées en plusieurs domaine :

➤ **a-phytothérapique :**

Les huiles essentielles sont utilisées pour traitement des malades interne et externe comme infection virale, trouble nerveux.

En médecine dentaire sont utilise pour désinfection dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries qui donnent un résultèrent plus satisfaisant [47].

➤ **b-cosmétique et parfumerie**

L'utilisation des huiles essentielles dans les crèmes et les gèles de cosmétique, leur activité antiseptique et antioxydant, et par leur odeur agréable permet aux parfume [48].

I.2.7. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont présentées comme : sans danger

Mais les effets toxiques d'une huile essentielle varient nombreux selon la nature. [49].

Notons que les essences absorbées comme médicament, peuvent présenter une toxicité interne (Aromathérapie) [50].

Plusieurs effets sont connus pour leur toxicité : des allergisants, photo sensibilisants, et hépatotoxiques [51].

I.2.8. Activité biologique des huiles essentielles

L'utilisation des huiles essentielles de nombre considérable a développé les travaux de recherche à la base scientifique sur leur activités [52].

I.2.9. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues par leur activité antimicrobienne pour cette raison, elles sont utilisées pendant long temps. Cette utilisation se base sur deux pratiques : traditionnelle et application scientifique précises, et basait surtout à la base scientifique puisque de nombreux travaux de recherche étudient sur propriété antimicrobienne des HE des plantes aromatiques [53].

L'effet microbicide de HE a même été trouvé à supérieure résistance des antibiotiques. et elles ont un champ d'action très large [54]. cette activité est variable à l'autre et la souche bactérienne à l'autre d'huile essentielle [55].

Les molécules antibactériennes les plus connues, nous citons : le linalool, le menthol, le Cavacole, le thymol et Géraniol, etc [56].

I.2.10. Aperçus sur le mode d'action des huiles essentielles

Il est montré que la puissance de l'action des HE diffère ou variable par leur constituant majoritaires, et principalement le mode d'action est liée à la partie chimique des constituants de chaque HE et largement diversifiée [47].

I.3.1. Tests phytochimiques

« L'examen phytochimique consiste à caractériser les différentes familles de métabolites secondaires présents dans la plante étudiée. Au cours de cette étude, on a procédé à des investigations sur l'extrait aqueux. Les tests de caractérisation sont basés sur des réactions de précipitation et de complexations en employant des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. ». [1]

D'après **Harborne** Les essais phytochimiques sont utilisés les méthodes suivantes ;

- Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes sont mis en évidence par la réaction à la cyanidine.
- La caractérisation des tanins est faite par la réaction au chlorure ferrique.
- La recherche des alcaloïdes est réalisée à l'aide des réactifs généraux de caractérisation des alcaloïdes. Deux réactifs voire trois sont utilisés à savoir le réactif de Dragendorff, le réactif de Mayer et le réactif de Wagner.

- La recherche des saponosides est basée sur la propriété qu'ont les solutions aqueuses contenant des saponosides de mousser après agitation.
- La recherche des stérols et des terpènes peut être réalisée par la réaction de Liebermann Burchard. [57]

Chapitre II

*Les procédés d'extraction des
Huiles essentielles*

Chapitre II : les procédés d'extraction des huiles essentielles

II.1. Introduction

Plusieurs méthodes d'extraction ont été mises au point comme l'hydro distillation, distillation à vapeur, l'entraînement à la vapeur, par solvant ...etc.

Des nouvelles techniques d'extraction des huiles essentielles sont utilisées maintenant comme l'extraction par micro-ondeetc.

Nous essayerons dans chapitre cités les différentes méthodes d'extraction de l'huile, ce soit classique ou nouvelles.

II.2. Différentes techniques d'extraction des huiles essentielles :

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Les principales sont basées l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction [58].

Les méthodes d'extraction des huiles essentielles obéissent à des normes pharmacopée françaises comme la norme l'AFNOR NF T 75-006 qui précise la seule méthode extraction c'est l'entraînement à la vapeur. ISO précise par l'expression à froid du péricarpe frais de certains citrus [59].

II.3. Principales méthodes d'extraction

Il existe plusieurs méthodes de distillation dont voici les principales :

II.3.1. Hydro distillation :

Hydro distillation est une méthode traditionnelle d'extraction des huiles essentielles c'est la méthode la plus ancienne et la plus facile à manipuler [60].

Elle est utilisée pour isoler les huiles essentielle de la plante aromatique et médicinal, par la quelle les huiles essentielle sont évaporées en chauffant un mélange d'eau ou d'autre solvant et la matière végétale. Les vapeurs sont refroidies dans un condenseur ou recueille le condensat et les huiles essentielles sont séparer de l'eau. Le principe d'extraction est basé sur la distillation isotrope.

Le temps de distillation dépend de la relation avec la matière végétale en cours de traitement. la distillation prolongée produit seulement une petit, quantité d'huile essentielle, mais ajoute des composés non désirés a point d'ébullition élève et des produit d'oxydation [61].

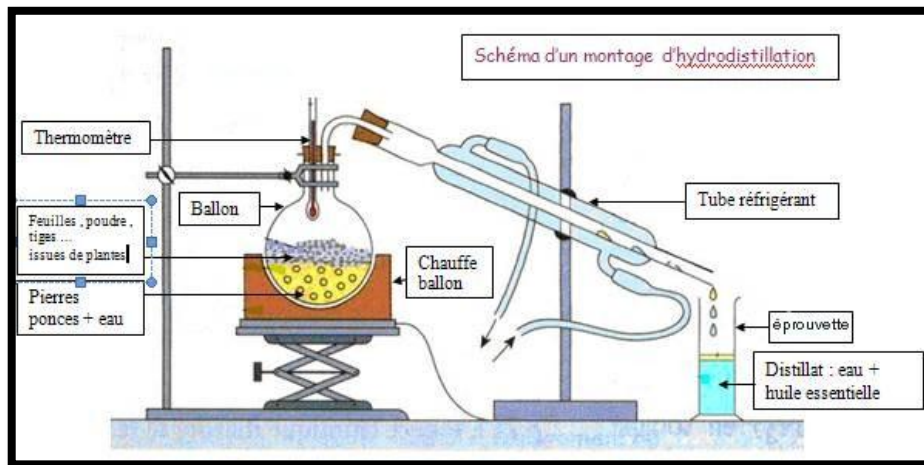


Fig. 02: principe de la technique d'hydro distillation.

II.3.2. Distillation à vapeur :

La distillation à la vapeur est le type de distillation pour une plante sensible à la température et importante dans certains secteurs industriels [62].

Cette méthode approuvées anciennes et officielles pour l'isolement des huiles essentielles à partir de matière végétales et dans la quelle la vapeur s'écoule à travers le matériau.

Cette vapeur agit comme un agent qui brise les pores de la matière première et en libère l'huile essentielle souhaitée. à la fin la vapeur est ensuite condensée d'avantage et huile essentielles est recueillie [63].

II.3.3. Distillation par entrainement à la vapeur d'eau :

Dans cette méthode de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée à travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînés vers le réfrigérant. Ce type apporte une meilleur qualité de l'HE en minimisant les altérations hydrolytiques [64].

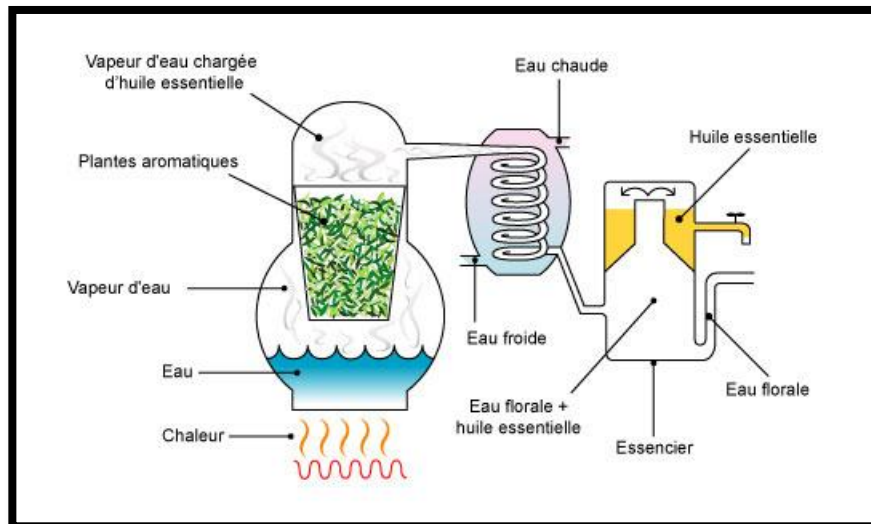


Fig.03: montage de l'entrainement à la vapeur d'eau

II.3.4. Extraction à froid

Ce type d'extraction à froid constitue le plus simple des procédés, mais ne s'applique qu'aux agrumes dont l'écorce des fruits comporte des poches sécrétrices d'essences. Cette manière à consiste à écraser, à l'aide de presses, les zestes frais pour abattre les poches afin de dégager l'essence. [65].

II.4. Méthodes d'obtention des extraits volatils

II.4.1. Extraction par solvant volatil

La technique d'extraction par solvant volatil se charge en huiles essentielles, Grâce à des lavages résultants, et avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé sous pression atmosphérique, les solvants les plus utilisés sont éthanol et méthanol, l'hexane, le cyclohexane, le dichlorométhane et l'acétone, l'extraction par solvant se réalisé avec un appareil de Soxhlet [66].

L'extraction au soxhlet implique un contact solide-liquide pour l'élimination d'un ou plusieurs composés d'un solide par dissolution dans une phase liquide à reflux. [67].

Plusieurs avantages peuvent être enregistré de l'extraction par soxhlet le plus important est que l'échantillon soit mis en contact de manière répétée avec des portions fraîche du solvant.si au moins de cette technique présente des inconvinent, on peut citer qu'elle est lente, ce qui engendre des pertes dues à la dégradation thermique et à la volatilisation. [68].

L'extraction par solvant est utilisée dans le traitement des parfums, de l'huile végétale et employé surtout sur les plantes délicates pour produire des quantités plus importantes d'huiles essentielles à moindre cout. [69].

La qualité et la quantité de mélange extrait sont déterminées par le type de chaleur supplémentaire. Bien que la méthode soit relativement simple et très efficace. [70].

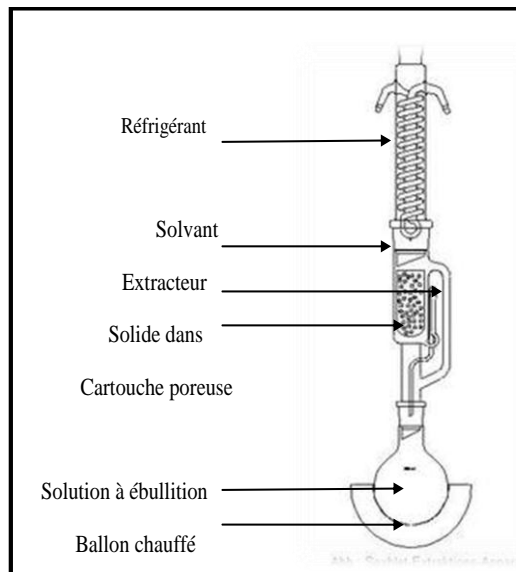


Fig.04 :montage du soxhL

II.4.2. Extraction assistée par micro-onde

Dans cette méthode d'extraction aidée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ce cas, chauffé la matière végétale par micro-ondes dans une prégnante close dans laquelle la pression est limitée de manière régulière. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau net à la plante. Ils sont récupérés à maniéré d'étape des factures classiques condensation et refroidissement et décantation [71].

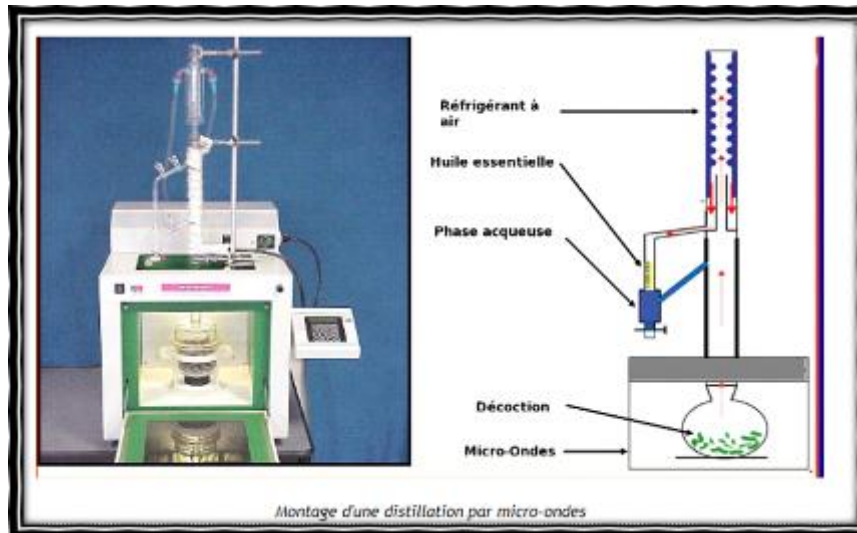


Fig.05 : montage de micro-onde

II.4.3. Extraction par dioxyde de carbone (fluide supercritique)

Cette extraction employé par le dioxyde de carbone se forme deux états supercritique ou liquide, il repose sur le fait que certains gaz notamment le CO_2 , ce gaz présent sur des conditions critique ou supercritique pouvoir de dissolution par divers composés odorant comme ; les sesquiterpène, le mono terpène, et leur dérivé oxygénés tell que les graisse et les colorants naturels [72].

La solubilité des matières naturelles dans le CO_2 est liée à son état, aux de la point critique (37.1C° , 73.8 bar) [73].



Partie expérimentale

Chapitre III : Matériels et Méthodes

❖ L'objectif de cette étude

Dans cette partie, nous essayons d'extraire l'huile essentielle à partir de la plante *A. Halimus* du Sud Est Algériens par la méthode de hydro distillation et par solvant. Les essences extraits sont caractérisé par plusieurs méthodes d'analyses : chromatographiques et spectrales (HPLC, CPG, IR).

Cette partie d'est subdivisée en 4 parties d'étude :

La 1^{ière} partie : est consacrée à l'extraction des huiles essentielles par hydrosdistilation et par solvant.

La 2^{ième} partie : portera sur les caractérisations d'extraits obtenus par CPG, HPLC et IR.

La 3^{ième} partie : portera sur détermination la caractérisation physique et chimique d'indice de saponification, indice d'acide, indice d'ester et détermination l'indice de réfraction.

La 4^{ième} partie : portera sur les tests microbiologiques pour déterminer l'activité antibactérienne des HE.

La 5^{ième} partie : portera sur le test hypoglycémie.

❖ Présentation de lieu de stage

Notre travail a été préparé au niveau du laboratoire centre de recherche analyse physique et chimique (C.R.A.P.C) situé à Bosmail wilaya de Tipaza.

Centre de recherche analyse physique et chimique C.R.A.P.C

C'est une société étatique conventionnée avec les universités algériennes. Il est divisé en plusieurs laboratoire spécialises, chaque laboratoire est doté d'un matériel développé. Il s'occupe des analyses physico-chimiques de tous types de matière (solide, liquide et gazeux).

Le classement botanique de la plante a été confirmé par laboratoire classement des plantes situé au jardin d'essais Hamma Algie. La suite du travail a été réalisé dans Laboratoire de génie des procédés Université Djilali Bounaama de khmis miliana et dans le Laboratoire d'analyse médicale Bengoufa, Blida.

Le schéma général adopté pour la réalisation de ce travail est résumé dans la figure

ci-dessous :

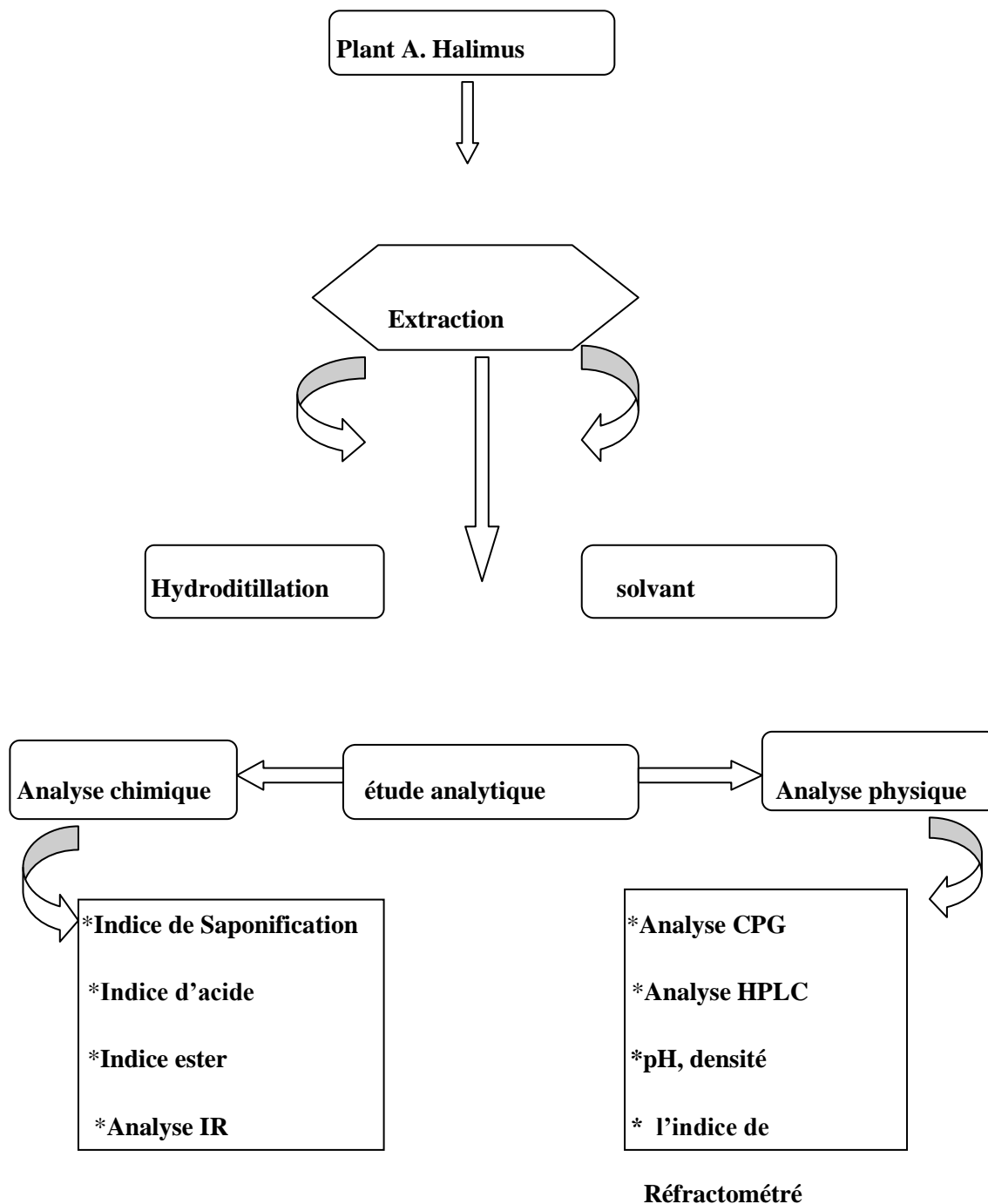


Fig.06: général de la procédure expérimentale

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel végétale

❖ a- Identification de l'espace étudiée

L'identification botanique de l'espace *A. Halimus* a été confirmée par un botaniste Kadri Samia c'est une technicisa supérieure en horticulture de jardin à HAMMA d'Algérie, la plus part des formations sur le botanique de la plans, ont été par Dr.Chamate Smail qui travail à C.R.A.P.C.

❖ b - Disponibilité des échantillons

La plante étudiée pousse dans la région d' Oud Souf en Sud Est Algériens, d'ou nous avons effectué le prélèvement des échantillons.la récolté à été faite à octobre, novembre 2017.l'extraction d'huile a été faite sur la partie feuille.

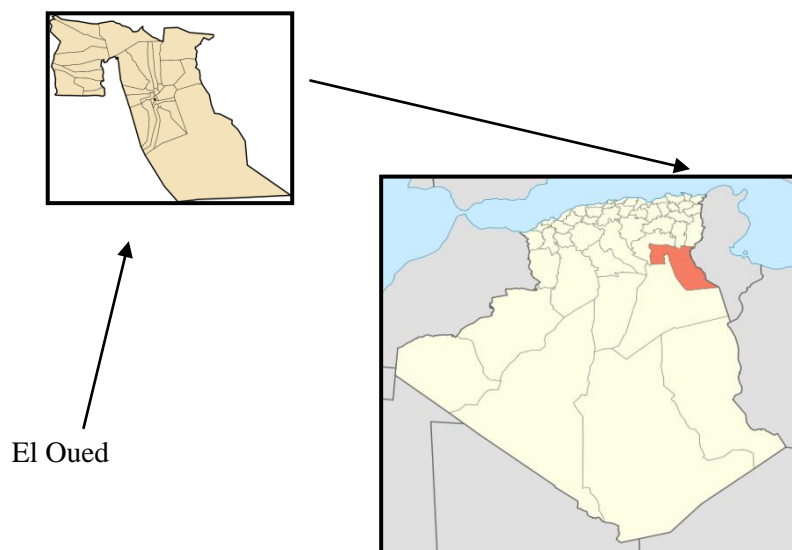


Fig.07 : Mapp Algérie représenté localisation de A.Halimus de El Oued- souf (El-Oued).

❖ C - Situation géographique de station de récolte

Le site de récolte est situé dans la wilaya Oud-Souf. La situation de la région de récolte est illustrée dans le tableau N°7.

Tableau 3: les coordonnées géographique des stations de récolte

Région	Altitude (m)	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Oued-souf	76 m	33°27'20"N	7°11'0"E	Aride et soumi-aride

III.1.2. Matériel de laboratoire et produits utilisés

III.1.3 .Matériel d'extraction

Tableau 4: présente le matériel essentiel utilisé dans la réalisation.

Les matériels	Les produits
<ul style="list-style-type: none"> • Verrerie ordinaire • Réfrigérant • Réfractomètre • Agitateur • pH mètre • Thermomètre • Clevenger • Glucomètre 	<ul style="list-style-type: none"> • Eau distillé • Hydroxyde potassium« KOH » • Phénolphtaléine • Chlorhydrique «HCl » • éther de pétrole • éthanol • méthanol

III.1.3.1. Matériel de caractérisation

L'extraction de l'huile essentielle de la plante a été faite par un hydro-distillateur de type Clevenger (1928). Il est constitué d'une plaque chauffante, un ballon et chauffe ballon où l'on place le matériel végétal et de l'eau de robinet, d'une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) qui vient de l'échauffement de ballon et une ampoule à décanter qui reçoit les extraits de la distillation.

III.1.3.2. pH mètre

PH est l'abréviation du potentiel d'hydrogène qui mesure l'activité chimique des ions hydrogènes (H^+) (appelés aussi couramment protons) en solution acide, basique et neutre.



Fig.08 : Le PH mètre

III.1.3.3. pycnomètre

Le pycnomètre est une appaerille en verre de 5 ml mesure la densité des solutions.



Fig.09: pycnomètre de C.R.P.C

III.1.3.4. réfractomètre

La réfractométrie est une méthode qui mesure la vitesse de propagation du rayonnement lumineux d'un milieu transparent, homogène par rapport à la vitesse de propagation de la lumière dans le vide, la mesure de l'indice de réfraction a été effectuée par un réfractomètre très simple existant on niveau du laboratoire biochimie à l'université Djilali Bounaama Khmis Miliana.



Fig.10: Réfractomètre de Carl Zeiss [74]

III.1.3.5. Chromatographie en phase gazeuse CPG

La chromatographie en phase gazeuse est une technique permet la séparation les composé liquide, elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent très complexe, constituant le mélange dans une phase stationnaire, qui peut être liquide (partage) ou solide (adsorption).

a-Domains d'application et mécanismes

➤ Domaine d'application

- Molécules volatiles (pression de vapeur notable en dessous de 250°C)
- Dérivatisation pour augmenter la volatilité
- Masse moléculaire < 500 g.mol⁻¹

- Les molécules fortement polaires sont moins volatiles quand elles sont dans des solvants polaires (forces intermoléculaires).



Fig.11: la chromatographie en phase gazeuse CPG

III.1.3.6. Chromatographie liquide à haute performance HPLC

La chromatographie liquide à haute performance est une technique chromatographique spécialisée dans la séparation des composés liquides. L'appareil utilisé dans cette étude est de

L'analyse par HPLC a été réalisée sur un appareil Agilent YL9100 HPLC système, qui est composé par une phase mobile et une phase stationnaire dans une colonne Apolaire (inverse) pour la séparation d'un composé organique non volatil.

Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- colonne C_{18} (longueur : 15 cm, diamètre : 4.5 mm, porosité : 5 μm)
- détection (λ) : 254 nm
- la phase mobile A : H_2O acidifiée à 1% acide acétique
B : Me OH 100%
- température : 25 $^\circ\text{C}$
- injection : 20 μl

L'analyse par chromatographie en phase liquide à haut pression (HPLC) de l'extrait A. Halimus a conduit au chromatogramme représenté sur la figure 11. nous avons injecté 20 µl de l'extrait et utilisé comme solvant, qui contient dans la condition et par la méthode de polyphénol



Fig.12: Les organes d'une chaîne HPLC

III.1.3.7. infrarouge IR

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier c'est un outil les plus utilisés pour la caractérisation et l'identification des molécules organiques et basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations Caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau, et une méthode de caractérisation rapide et sensible de la plupart des molécules existant, son utilisation est simple et cout de son instrumentation en fait un outil accessible à la plupart des laboratoire .

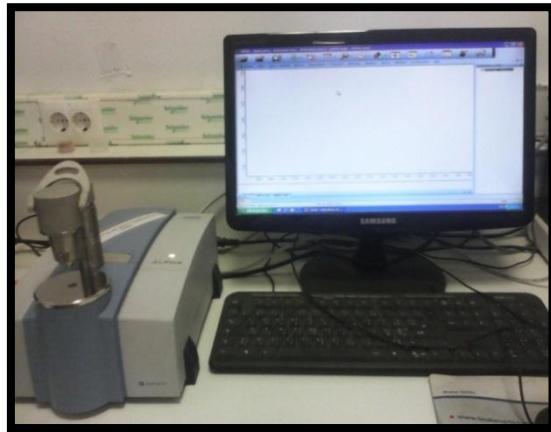


Fig.13: Spectroscopie IRTF(ALPHA)

(Laboratoire de centre recherche analyse physique et chimique (C.R.P.C))

III.1.3.8. Spectrophotométrie UV-visible

La spectrophotométrie UV-visible est une technique de caractérisation basée sur la mesure de la densité optique d'un milieu à une longueur d'onde donnée. Un spectre d'absorption est mesuré les changements de la densité optique par longueurs d'onde qui montrée.



Fig.14: le spectrophotomètre UV-Visible de la boratoire C.R.A.P.C

II.1.4. Matériel biologique

Le pouvoir antibactérien d'*Atriplex halimus* est testé sur 3 souches bactériennes :

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* ces souches sont illustrées en annexe.

En recherche biomédical, un modèle animal est un modèle permettant l'étude de la biologie ou des comportements normatifs, ou d'un processus pathologique spontané ou induit ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain.

Dans cette étude, on a induit élevé la glycose chez le lapin de l'espèce Algérien de région Ain dafla (boumadfaa) .

Les lapins domestiques sont âgés de 2 mois avec un poids qui varie entre 400 à 450 g. Ils sont maintenus dans une température contrôlée ambient. Tous les lapins sont sous même régime alimentaire. ONAB (Office National d'Aliments de Bétails)

Pendent une semaine avant le test biologique.



Fig.15 : lapin domestique

III.2. Méthodes

III.2.1. Séchage des plantes

La plante fraîche d'A.Halimus a été séchée de la manière suivante : Après la récolte, les échantillons ont été nettoyés bien et égouttés puis étalés sur papiers. Ils sont établis, sans superposition, afin d'éviter tous risques de fermentation, sous température ambiante pendant 20 jours.

III.2.2. Extraction des huiles essentielles

Nous avons choisi la méthode d'extraction d'huile essentielle par hydro distillation dans système clvenger et macération par solvant (méthanol) et soxhlet (éthanol).

III.2.2.1.Principe d' hydrodistillation

La méthode consiste à immerger le matériel végétal sèche dans un ballon à rempli avec d'eau distillée et placé dans une source de chaleur (chauffe-ballon). L' huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau, qui au contact d'un réfrigérant, elle est ensuite condensée en passant par le condensateur et récupéré sous forme d'une émulsion (eau+huile essentielle). Le résultat d'huile essentiel se sépare avec une couche d'huile mince à la surface qui sera par la suite séparée [37].

Le montage d' hydrodistillation comprend les parties suivantes :

- ❖ Ballon : il remplit la matière végétale immergée dans l'eau distillée.

- ❖ Réfrigérant : c'est une source et régulateur de la chaleur qui transporte toute vapeur en liquide provenant du ballon.



Fig.16: Montage de l'Hydro distillation (Clvenger) et ampoule à décantation employé pour l'extraction des huiles essentielles.

III .2.2.2. Mode opératoire

On mis une quantité de 100g de la matière végétale dans un ballon d'un volume de 1L et on a ajouté 600 ml d'eau distillé jusqu'a couverture de toute la matière végétale.

-l'extraction a duré 4h a une température 60 °C, après refroidissement et concentration des vapeurs résultantes, elles sont recueillies dans un petit flacon bien fermé.

-le distillat est ensuite transvasé dans une ampoule à décanté au moyen de 1 ml de l'éther

Séparé la phase aqueuse et la phase d'huile.

- les feuilles qui restent de hydrodistillation sont séchées à température ambiante pendant 6 jours (macération)

-les feuilles bien séchées sont mis, dans un erlenmeyer de 1L on remplit le solvant méthanol d'un volume de 150ml.

- le mélange est placé dans un appareil Ultrasonic-Cleaner pendant une 1heure.

- le mélange résultant (extrait+méthanol) est filtré par papier filtre.

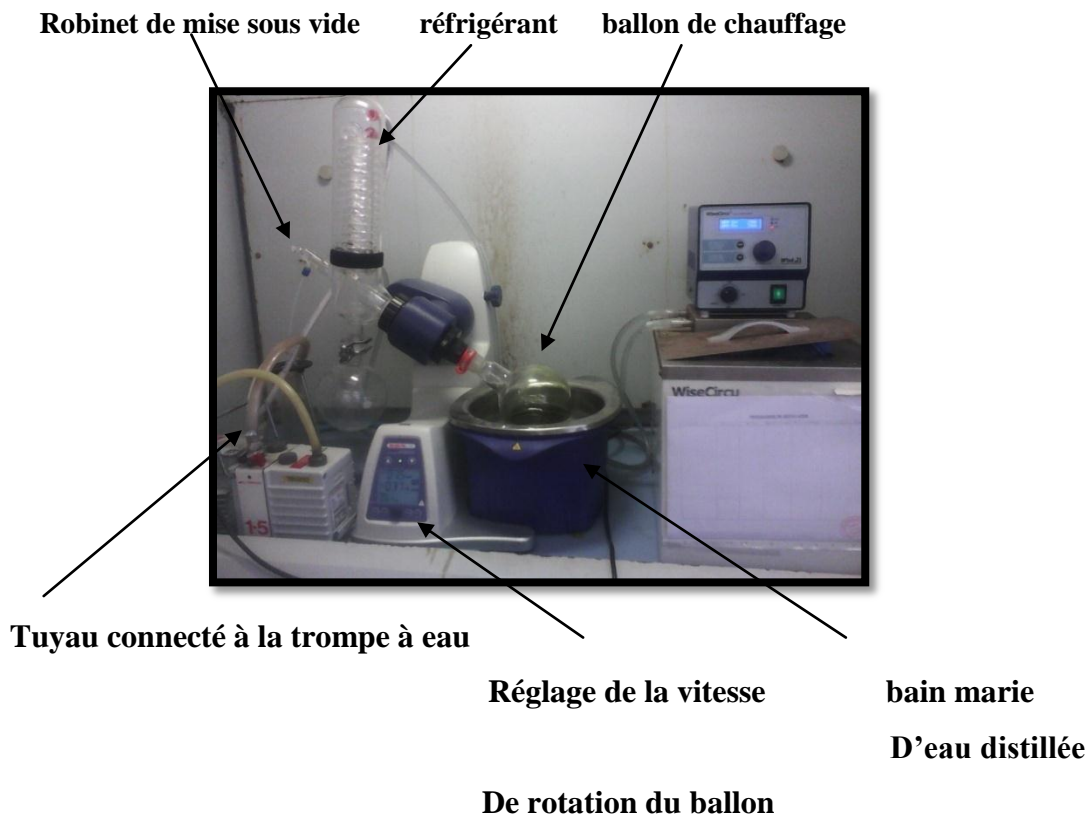


Fig.17: extraction par solvant (Rota vapeur) de C.R.PC.

III.2.2.3. Principe de Rotavapeur

Le principe du Rotavapeur est basé sur la distillation du macérât sous vide [75].

a-Mode opératoire

- le macérât ou l'extrait à évaporer est placé dans le ballon d'évaporation.
- le ballon d'évaporation est ensuite mis sous rotation.
- Ouvrir le robinet d'eau froide relié au réfrigérant.
- Fermer ensuite la vanne reliant le montage à la pression extérieure (vanne de fermeture) et faire le vide à l'intérieur de l'appareillage à l'aide d'une trompe à eau.
- Si l'évaporation n'est pas assez rapide, plonger le ballon d'évaporation contenant l'extrait à évaporer dans le bain marie d'eau chaude.
- Procéder à l'évaporation jusqu'à disparition complète du solvant.
- Ouvrir la vanne de fermeture pour remettre la pression atmosphérique à l'intérieur du dispositif.

- Enfin, couper l'eau du réfrigérant et de la trompe à eau. la température de 35°C pendant 30min.

-prenez un petit flacon en verre pour remplir l'extrait final et ne fermé pas car vapeur tout les petites quantités des solvants dans l'extrait.

III.2.2.5. Principe d'ultrasonique-cleaner

Vibration de la matière végétale et le solvant pour enler tous les composés de la plante.

a-Mode opératoire

-prenez le mélange de solvant 150 ml de méthanol et 50g des feuilles sèches *Atriplex halimus* dans un erlanmayer de 1L.

-prolonge dans un récipient contient d'eau.

-réglé l'appareil à 15 tour pendant une 1H.

-Enfin filtré le mélange par un papier filtration Wathman dans bécher.

III.2.2.6. Extraction par solvant (Soxhlet)

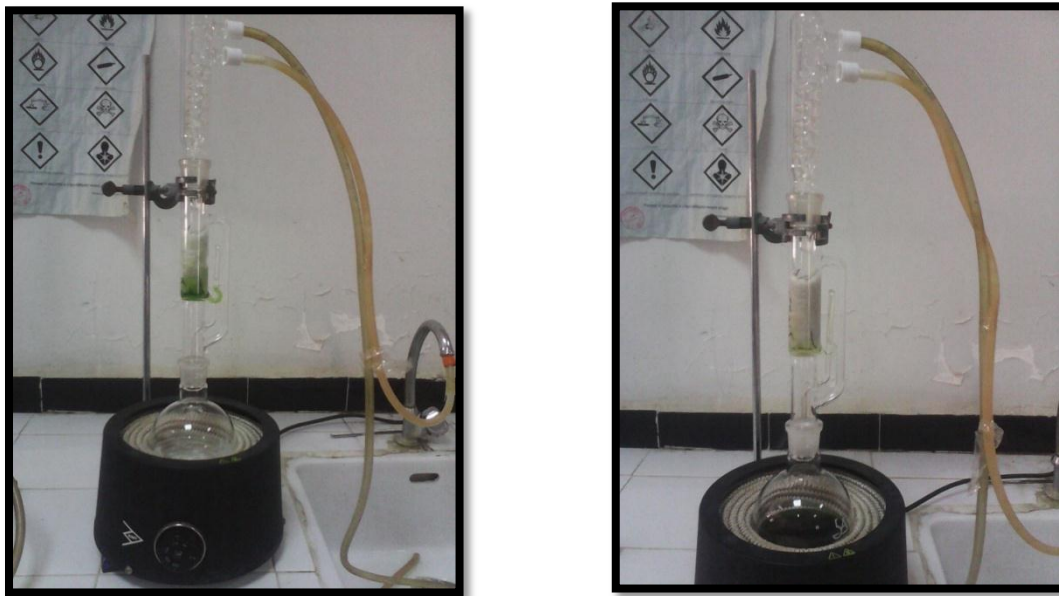


Fig.18: montage du soxhlet

Les conditions opératoires sont les suivants :

- Masse arienne de l'A. Halimus : $m_{A.H} = 7.2g$
- Solvant d'extraction : Ethanol de volume 160ml

- Chauffage : à la température d'ébullition de l'éthanol $T=70\text{ C}^\circ$

III.2.2.7. Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés de la même façon que ceux utilisés dans l'extraction des huiles essentielles.

L'échantillon végétal brut est pesé puis disposé dans une cartouche par une compresse stérilisée.

a-Mode opératoire

- L'éthanol utilisé est versé dans le ballon à sa température d'ébullition.
- Apparition des vapeurs qui montent dans le tube après un certain temps, correspondant au temps initial d'extraction jusqu'à un 6h.
- Ces vapeurs sont condensées et sa tomberont goutte à goutte sur la matière végétal.
- le solvant chargé en extrait aromatique, cette étape on appelé du siphonage dans le ballon à changement la colère de solvant à vert foncé, répète le cycle de siphonage jusqu'à la colère vert changé à blanc de matière végétale.

III.2.2.8.Élimination et recyclage du solvant organique

Le mélange chargé en extrait obtenue dans un ballon est soumis à une distillation par un Rota vapeur .s'effectue à la température ne dépassé 79 C° , pendant une durée plus courte que possible 30 min.

III.3. Caractéristiques organoleptiques d'huiles essentielles d'A. Halimus

Chaque HE est caractérisée par des caractères organoleptiques telles que : l'odeur, l'aspect physique et la couleur [76]

a-Aspect

L'aspect d'une essence végétale change selon le produit qui la constitue ; cette essence peut apparaître sous forme solide, liquide ou semi-solide.

b- Couleur

La coloration d'extrait dépend du produit qui constitue l'extrait, certains solvants ont le pouvoir d'extraire beaucoup de pigments, ce qui provoque la couleur d'extrait.

c- Odeur

L'odorat est un sens chimique très sensible, d'après la nature de produit à système olfactif, elle doit être volatile et la substance pour être franche.

III.3.1. Détermination du rendement en huile essentielle

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (R_{HE}) est déterminé par le rapport la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (m_E) et la masse de la matière végétale utilisée (m_{MV}). Le rendement est exprimé en pourcentage, il est calculé selon l'équation suivante [38] :

$$R_{HE} = (m_{HE} / m_{MV}) * 100 \quad N^{\circ} 1$$

R : rendement en huile essentielle ou extrait %.

m_{HE} : masse d'huile essentielle (g).

m_{MV} : masse de matière végétale sèche (g)

III.3.2. Calcul du rendement par macération et Soxhlet

Le rendement par macération et Soxhlet est calculé à partir de l'équation suivante [38] :

$$R_e (\%) = (m_{ex} / m_{mv}) * 100 \quad N^{\circ} 2$$

R_c : rendement d'extrait %

m_{ex} : la masse de l'extrait (g)

m_{Mv} : la masse de matière végétale (g)

III.4. Etude de caractérisations chimiques et physiques

III.4.1. Caractéristiques physique

➤ III.4.1.1. Mesure de PH

a-Mode opératoire

On a mis une quantité dans un bécher de l'extrait, pesé le partie d'appareil qui mesure le pH après attende quelque seconde pour stabilisé la valeur.

➤ III.4.1.2. Mesure la densité de 20°C°

La densité relative à 20°C des liquides est le rapport de la masse d'un volume à 20°C. nous avons mesuré la densité d'extrait éthanoïque par pycnomètre.

a-mode opératoire

La mesure a été effectuée par un pycnomètre, gardé la température de l'extrait 20°C°.

- Mesure le poids de pycnomètre vide.
- Remplir l'appareille par l'extrait jusqu'à remplié la colonne.
- Mesure le poids de pycnomètre avec l'extrait.
- Calculé la valeur à partir d'équation suivant :

$$D^{20^\circ} = \frac{m}{v}$$

N° 3

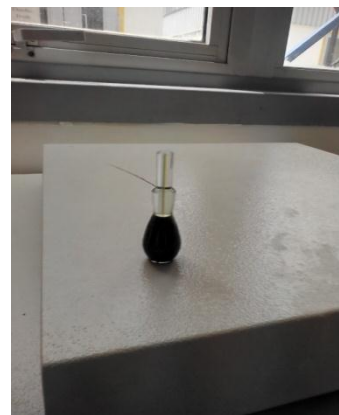


Fig.19 : mesure par pycnomètre

➤ III.4.1.3. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est mesuré à l'aide de réfractomètre, Il est lié à la température, de type thermostat, Il est mesuré à 20 °C par les huiles fluides et 40C° par les graisses. [77]

Cet l'indice des huiles varie en fonction de leurs instauration et il croît avec le degré d'instauration des acides gras contenus dans les matières grasses, indice de réfraction déterminé à l'aide d'une lampe à vapeur de sodium, et la longueur d'onde de 589 nm et à 20 C°. Il autorise le suivi des opérations d'hydrogénation et de fractionnement des corps gras. Il permet deux groupes de différence du corps gras :

- Graisses l'auriques végétales (R =1,448 à 1,458) ou animales (R=1,471 à 1,458)
- Huiles végétales (R =1,468 à 1,490) ou animales (R=1,471 à 1,485) [78]

III.4.1.3.1. Mode opératoire

L'indice de réfraction est mesure avec 3 ou 4 chiffres après la virgule. L'appareil le plus couramment utilisé pour mesure l'indice de réfraction de un réfractomètre, les indices de réfraction sont déterminés dans l'intervalle 1,300 à 1,700. Pour le calculer, le réfractomètre, est préalablement étalonner par l'eau distillé dont leur indice de réfraction est connu ($n_{\text{eau}} = 1,335$) à la température fixée à 20°C. Les prismes sont ensuite séchés et quelques gouttes d'extrait A. Halimus ont été déposé entre les deux faces des prismes. A l'aide de l'oculaire et le bouton de réglage, l'interface entre la zone sombre et éclairée est amené au centre du réticule. Les irisations sont supprimées pour obtenir une ligne nette entre les deux zones. Puis la valeur de l'indice est notée par l'échelle de lecture et notée aussi la température à 20 C° et le temps par 15 seconds (temps nécessaire pour stabiliser l'appareil à 20C°).

➤ III.4.1.4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La séparation et l'identification des composants volatils d'un extrait présente bien moins d'alternatives que sa préparation. Permettre la CPG est une méthode de source dans l'analyse des huiles essentielles ; elle permet l'analyse de mélanges de très complexe de la nature et de volatilité très variées. Il compose par une méthode de d'injection et détection, et un grand de choix colonnes permettent des analyses de plus en plus efficaces, il repose sur le principe de migration différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire. [79]

Dans un CPG, la séparation des composés est réalisée de manière séquentielle selon des critères chimiques de polarité et de solubilité dans la phase stationnaire de la colonne

Chaque constituant est caractérisé par des indices calculés à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, à température constante ou en programmation de température. Il accède l'individualisation et quantification des composants à partir d'échantillons de l'ordre du milligramme voire du microgramme. [80]

a-Principe

La composition d'HE a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse CPG.

Les analyses sont réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Clarus- 600, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme, d'un injecteur diviseur et de deux colonnes polaire et apolaire.

Les colonnes utilisées sont identiques par des conditions opératoires sont :

- Une colonne polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol 60 m x 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur du film : 0,25 µm).
- Une colonne apolaire (Rtx-1, polydiméthylsiloxane).
- Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml.mn-1) avec une pression en tête de colonne de 25 psis.
- La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur de 280°C.
- La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230°C, à 2°C.mn-1, puis en un palier de 45 mn à 230°C.
- L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50.
- La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,1 à 0,2 µl selon qu'elle soit pure ou diluée dans un solvant.

Pour chacun des composés, les indices de rétention (I_r) polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane allant de C5 à C30 en programmation de température. [81]



Fig.20: chromatographie en phase gazeux de (CRAPC)

➤ III.4.1.5. Chromatographie liquide à haute performance (pression) ou HPLC

a-Principe

Selon Giddings La chromatographie liquide à haute performance a été développée en 1968 [82]. Le principe de séparation repose sur l'interaction des solutés entre deux phases non miscibles : la phase stationnaire qui est fixe et la phase mobile [83].

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution d'abord, puis elle sera introduite dans la phase mobile liquide (éluant). Grâce à la répartition sélective des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire, chaque soluté est donc soumis à une force de rétention exercée par la phase stationnaire, et une force de mobilité due à la phase mobile. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile, poussée par une pompe sous forte pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté à travers le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne, grâce à un détecteur approprié, les différents solutés sont représentés par des pics. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme [84].

➤ III.4.1.6. Spectrométrie infrarouge

a-Principe

La spectroscopie infrarouge permet de mesurer les énergies de vibration des liaisons moléculaires.

Envers l'effet d'un rayonnement électromagnétique infrarouge et les liaisons moléculaires voisins à des dipôles savent absorber cette énergie. Il est plusieurs modes de vibration dans un groupe d'atomes : des vibrations d'élongation symétriques ou antisymétriques, qui simulent la longueur d'une liaison atomique et des vibrations de déformation angulaire qui se constituent dans le plan d'une molécule ou hors du plan. Il faut une énergie moindre pour déformer une molécule que pour l'étirer, et la fréquence d'oscillation de la liaison soit égale à celle de l'onde émise.

On aussi Le nombre d'onde (en cm^{-1}) correspond à l'inverse de la longueur d'onde, (en cm).

Il existe trois domaines infrarouges :

- le proche infrarouge ($14283\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$).
- l'infrarouge moyen qui est utilisé dans notre cas ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$).
- l'infrarouge lointain ($400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) fournit des informations sur les différents groupements fonctionnels présents dans l'échantillon, ainsi elle ne se limite pas uniquement à un type de composé comme est le cas avec les indices mentionnés ci dessus. Cette technique a été employée pour suivre l'oxydation d'une huile sous des conditions modérées et sévères, les changements des principales bandes d'absorption ont été interprétés [85].

b-Mode opératoire

De notre cas, spectre infrarouge mesure des huiles essentielles et extrait par identification les groupes fonctionnels ont été recherchés au cours de ce travail.

Commencé par nettoyage l'équipement de réflexion de (Alpha) par l'eau distillé le point qui pesé une goutte de huile essentielle ou extrait.

Le spectre infrarouge installé par un programme de (OPUS 6.5), ajusté les paramètres standard par résolution 2 cm^{-1} et le temps de mesure et accumulation (32 scans) et de 4000cm^{-1} à 375cm^{-1} de la longueur onde et le spectre résultat on transmittance, selon le réglage.

- Déposé un goutte d'échantillon de huile essentielle ou extrait dans un petit bolet et prise bien par un bol de cotie hôte par une matière d'ore.

- Par des petit temps on va l'absorption, et une vibration des liaisons des molécules en intérieur et présente la lumière.
- Tracé un spectre de différence pic de transmittance en fonction de longueur d'onde.

III.4.2. Caractérisation chimiques :

➤ III.4.2.1. Indice de saponification

L'indice de saponification est une opération caractéristique de l'analyse des lipides, elle permettré essentiellement aux contrôles industriels (savonnerie), Elle consiste à transformer en savons solubles (sodiques ou potassiques) et la somme des acides gras présents à l'état estérifié dans une matière grasse et le glycérol dans le cas des triglycérides. [86]

L'indice de saponification est une masse en milligrammes de potasse pour saponifier 1 g de corps gras. Il rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras, par un effet de plus les molécules d'acides ont d'atomes de carbone et moins l'indice de saponification est élevé. [87]

III.4.2.2.1. Mode opératoire

Dans un ballon a été introduit un gramme (1g) d'extrait avec 25 ml de solution hydroxyde de potasse éthanoïque KOH 0.5 N. Le ballon est connecté à un réfrigérant, le mélange est chauffé à reflux avec agitation pendant une heure.

L'excès de KOH est titré par une solution d'acide chlorhydrique HCL (0,5N), en Présence 1ml de phénolphtaléine.

Effectuer Un essai à blanc est préparé en suivant le même mode opératoire et mémé condition

L'indice de saponification (IS) se détermine ainsi :

$$IS = \frac{C (V_0 - V_1) 56.1}{m}$$

N°4

V0 : est le volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer le blanc

V1 : est le volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer l'essai.

C : est la concentration exacte, en moles par litre, de la solution titrée d'acide chlorhydrique

Utilisée

m: est la masse (g) de la prise d'essai.

➤ III.4.2.3. Indice d'acide

L'indice d'acide est un nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire pour la neutraliser la quantité libre d'acide dans un gramme de substance. (**Pharmacopée européenne 1997**)

Les acides libres sont neutralisés par une solution Ethanol titrée d'hydroxyde de potassium, c'est-à-dire la mesure de l'indice acide réalisée par titrage. [88]

III.4.2.3.1. Mode opératoire

On à dissolvé 0.5g de la substance à examiner (A.Halimus) dans un bécher .on a joute 2.5 ml d'éthanol neutralisé et 3 goutte au maximum d'indicateur, soit la solution de Phénolphtaléine. Titrer le liquide avec solution de l'hydroxyde de potassium KOH 0.1M contenue dans la burette quelques secondes. Après le virage de la couleur vers le rose, on arête le titrage. Noter le volume de solution de KOH utilisé.

L'indice d'acide I_a se détermine :

$$I_a = (V * N * M) / m$$

N°5

M: masse molaire de KOH (56.1 mol/l).

V : le volume, en millilitres, de solution d'hydroxyde de potassium utilisé pour le titrage.

N : normalité de la solution de KOH.

m : la masse, en grammes, de la prise d'essai. Exprimer le résultat à une décimale près

➤ III.4.2.4.Indice d'ester

L'indice d'ester I_E est le nombre qui exprime en milligramme d'hydroxyde de potassium nécessaire pour la saponification des esters présents dans 1 g de substrats, pour calculé l'indice d'ester c'est la différence entre indice de saponification et l'indice d'acide. (**Pharmacopée européenne ,2002**).

L'indice ester I_s se détermine par :

$$I_E = I_S - I_A$$

N°06

I_E : induce d'ester

I_S : indice de saponification

I_A : indice d'acide

III.5. Les souches bactériennes testées

Les souches bactéries sont fournies par le laboratoire Bioblida “ biologie médical de blida ” :

Pseudomonas aeruginosa et *Escherichia coli* et *klebsiella pneumoniae*. Ont étéensemencée juste avant le test antibactérien dans une gélose nutritive et incubé à 37 °C pendant 24 h.

Tableau 5: les souches bactéries utilisées.

Bactérie de Gram -	Souche	
Négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	L.A.M.B
	<i>Escherichia coli</i>	L.A.M.B
Négatif	<i>klebsiella pneumoniae</i>	L.A.M.B

III.5.1. Conservation de souche

La souche bactérie est conservée à 5C° dans un tube stérile contenant 10 ml du milieu de culture incliné (gélose nutritive).

III.5.2. Méthode de diffusion à partir d'un disque solide (aromatogramme)

La méthode Vincent (aromatogramme) c'est une technique qui permet d'étude la sensibilité et la résistance des germes d'huile essentielles [89].

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, et appelé antibiogramme ou méthode par diffusion en milieu gélose à l'agar agar, qui réalise dans une boite de pétrie, le contact se fait par t'intermédiaire d'un disque de papier sur une quantité d'extrait. [90]

III.5.3. Mode opératoire

Cette manipulation comporte les étapes suivantes:

a-Repiquage des souches

-Prélever à l'aide d'une anse de platine une colonie bactérienne bien isolée dans la gélose nutritive.

-Transvaser le contenu dans un tube contenant 5 ml de bouillon nutritive stérile (l'eau distillée).

-Incuber par la suite les tubes à essai à 37°C pendant 24 h

b-Préparation des disques

-Préparer les disques de papier filtre de 6 mm de diamètre (Wattman N° 1) stérile.

-Stériliser les disques à l'autoclave, à 120°C pendant 20 minutes.

c-Coulage des boites de pétri

Couler dans les boites de pétri en plastique stérile une quantité de gélose nutritive équivalente à 13 ou 15 ml, coulé et laisser une couche de 4 mm à ronde, de 90 mm de diamètre, devant la flamme jusqu'à complète pendant solidification à 30min de la température ambiante, au laboratoire, avant leur emploi.

d-L'ensemencement

Après solidification des milieux culture et préparation des suspensions bactériennes on réalise l'ensemencement :

- trempe un écouvillon stérile dans la suspension microbienne pour éviter la contamination de la manipulation.

- Déposer quelques gouttes de la suspension bactérienne (inoculum) sur la surface de la gélose, puis le frotter sur la totalité de la surface gélose sèche, de haut en bas, l'opération est répétée deux fois, en tournant la boite 60° à chaque fois.

e-Imprégnation des disques

On numérote la base de chaque boite de pétri de chaque bactérie .une fois les géloses de milieu Muller-Hinton ensemencées, les disques sont imbibés par l'extrait du plante pur à tester. Déposer a l'aide d'une pince stérile au bec bunsen les disques (un disque par boite) imprégnés d'extrait végétal, sur la surface de la gélose dans la boit de pétri, une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé.

f-Incubation

Les boites de pétri sont placés dans un l'incubateur pendant 24 h à température 37C°.

-Dans ce travail, le méthanol a été utilisé comme solvant d'extraction et de conservation des extraits obtenus. Il a été utilisé, également comme témoin dans les tests antibactériens de ces extraits.

g-Lecture des résultats

Après 24 heures d'incubation, mesurer à l'aide d'une règle graduée le diamètre des zones d'inhibition des bactéries autour des disques. Toute la méthode peut être résumée dans la figure suivante :

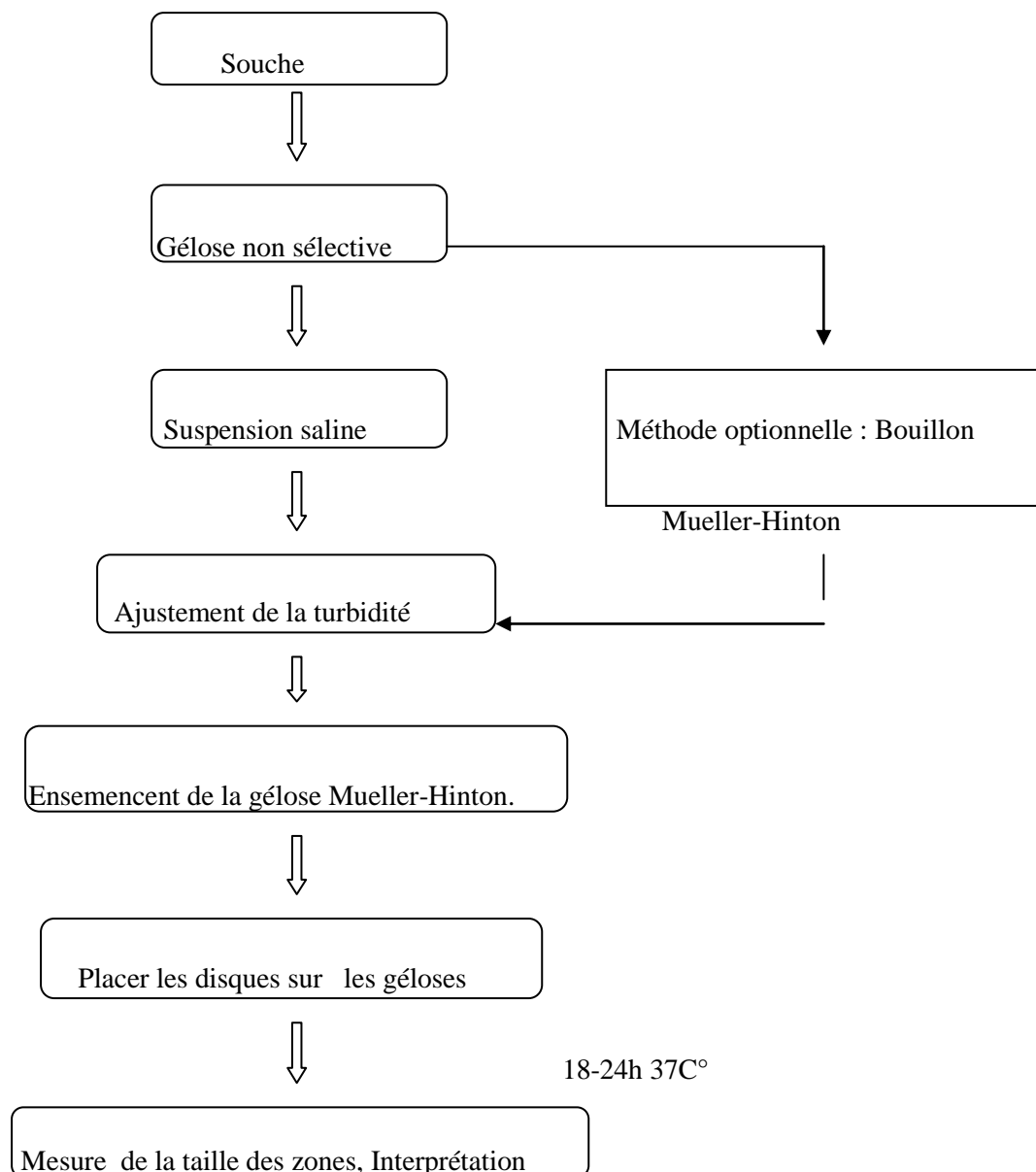


Fig.21: Procédure du test de la sensibilité aux antimicrobiens par la méthode de disques. [91]

III.6. Etude la photochimique et activité de l'extrait aqueux de l'A. Halimus sur le glucose.

III.6.1. Matériel végétal

Les feuille sont séparer et sèches bien de température ambiante dans un four de température 50°C pendant 3 heure juste pour séché bien pour crassier, après le séchage les feuille broyées dans un broyeur un poudre, puis conservée jusqu'à l'utilisation.



Fig.22: préparation d'extrait aqueux dans la plaque chauffant

a-Préparation de l'extrait aqueux brut

L'extrait aqueux est préparée sur un plaque chauffant de 10g de L'A. Halimus dans un 200 ml l'eau distillée pendant 30min de température 25°C .

La solution qui résulté filtré et conservé dans un tube verre sec et propre. L'extrait aqueux ainsi préparé est employée par l'étude photochimique et biologique.

III.6.2. Spectrophotométrie UV-visible

a- La concentration de l'extrait aqueuse

- Dilué l'extrait aqueux pur pour le balayage qui détermine λ_{max} et tracé la courbe.
- Préparé une dilution de l'extrait aqueuse par de 6 échantillon de $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$.

Qui mesure l'absorbation par un spectrophotomètre et tracé la courbe par λ_{max} .

III.6.2.1. Mode opératoire

D'après la préparation de la dilution mesure la longueur d'onde λ_{\max} , et aussi préparé la dilution de $\frac{1}{2}$ et mélangé avec des concentrations différentes de sucre alimentaire (glucose) 0.2g, 0.4g et 0.6g, dans un bécher rempli le mélange, à plaque chauffante de barreau magnétique pendant 30min, dans centrifugation pendant 15 min.

Les mesures sont effectuées par un spectrophotomètre, La lumière monochromatique incidente d'intensité I_0 (de puissance P_0) traverse alors l'échantillon, et l'appareil mesure l'intensité I de la lumière transmise. D'après la loi de Beer Lambert, la densité optique DO_{λ} est fonction de la concentration C de la solution, du coefficient d'absorption molaire ϵ et de

$$\text{La longueur du trajet optique : } DO_{\lambda} = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon_{\lambda} C l$$

III.6.3.1. Régime alimentaire

D'après acheté 4 lapin de espace domestique Ain defla de région de boumadfaa, ils mangent une alimentation multiple, avant le test biologique préparé un régime alimentaire spécifique, il faut rédiger l'étape suivant :

- Chaque lapin consommé 150g par jours d'aliment spécifique et l'eau minérale pendant une 1^{ère} semaine avant le test.
- Testé par un glucomètre la glycémie des lapins chaque jour à partir de 2^{ème} jour à Régime alimentaire.

III.6.3.2. Prélèvement du sang

Le sang est prélevé, par l'oreille qui remarquable les petite vanne, Le sang récupéré est utilisé pour mesurer la glycémie à l'aide d'un glucomètre, pendant une semaine.

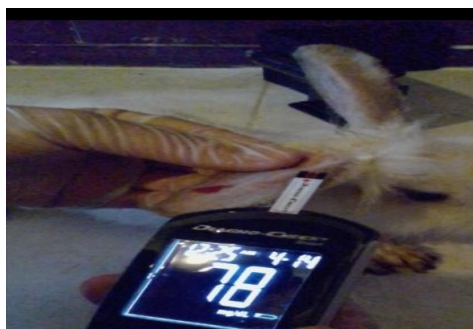


Fig.23: Test la glycémie de lapin

III.6.3.3. Toxicité d'extrait

Afin d'éviter tout le problématique risque de toxicité lors des tests biologiques, il est nécessaire de réaliser des essais de toxicité. Pour cela, une forte dose de l'extrait aqueux de l'A. Halimus par à jeun pendant 12h et par une alimentation normal de 12h. L'administration est réalisée par voie orale, par la 2^{ème} semaine.

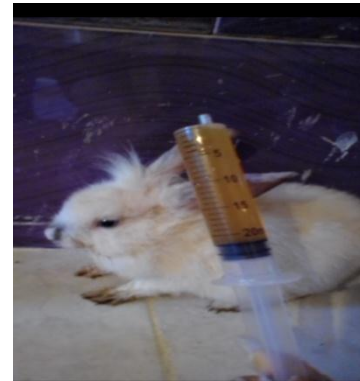


Fig.24: le gavage d'extrait aqueux d'A. Halimus. **Fig.25:** préparation le mesure de gavage

a-Lots expérimentaux

Les lapins sont repartis en quatre lots de 4 lapins :

Les **lots 1** et **lot 2** gavages de **2.28g/kg** du poids corporel de l'extrait pur par un aliment normal.

Les **lots 3** et **lot 4** gavages de **1g/kg** du poids corporel de l'extrait pur à jeun.

III.6.3.4 Test de tolérance au glucose

A la quatrième semaine, les lapins des deux lots sont soumis à un test de tolérance au glucose réalisé par gavage d'une solution de glucose à 30% à raison de 2.28g/kg du poids corporel. Des prélèvements sanguins pré et post ingestion sont, ensuite, réalisés à t0 (basal), t1 (60 mn), t2 (120 mn) pour mesurer la glycémie.

Chapitre IV

Résultats et discussions

Chapitre IV : Résultats et discussions

IV.2.Extraction des l'extrait d'A. Halimus

L'extraction a été réalisée suivant les méthodes déjà cité dans le chapitre matériels et méthodes. L'huile essentielle ainsi que les extraits sont caractérisés, les résultats sont mentionnés dans la partie suivante.

IV.2.1.Caractéristique organoleptiques d'extrait d'A. *Halimus*

L'extraction par solvant des parties aériennes séchées d'un échantillon étudié nous a permet d'obtenir des extraits dont les tests organoleptiques observées figurent dans le tableau 6 :

Tableau 6: Caractéristiques organoleptiques d'extrait

Caractéristique organoleptiques	Aspect	Couleur	Odeur
Extrait méthanoïque	Liquide	Verte foncée	Très Forte odeur
Extrait éthanoïque	Liquide	Verte foncée	Très Forte odeur



Fig.26: l'extrait méthanoïque d'A. Halimus **Fig.27:** l'extrait éthanoïque d'A. Halimus

Chaque extrait, a des propriétés organoleptiques caractéristiques (odeur, couleur et goût) .A la température ambiante, l'extrait est se forme liquide, D'après le tableau 10 observe la couleur est Veret foncée à une L'odeur est très forte.

IV.2.2.Rendement d'extraction

Pour l'échantillon du plant A. Halimus, nous avons calculé le rendement d'extraction.

Les extractions des huiles essentielles de la partie aérienne (feuilles, tiges) de A. halimus, récoltée en octobre 2017 dans la région de Oud-Souf localisée dans la wilaya d'el Oued, sont réalisées par la technique d'hydro distillation sur un appareil de type Clvenger. Le rendement faible obtenu est de l'ordre de 0,01% par rapport à la masse de la matière sèche, à temps de 4h.

Nous avons calculé le rendement d'extraction d'HE d'A.Halimus obtenue par hydrodistillation . Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7.Le rendement a été calculé par équation N°1 présenté dans le chapitre matériels et méthodes :

Tableau 7 : rendement d'HE de A. Halimus

L'HE	Rendement %
A. Halimus	0.01%

a- Rendement et influençant la biosynthèse des huiles essentielle de différent plant

Selon le tableau 8, nous remarquons que les rendements en huiles essentielles de principe actif de menthe diffèrent d'un pays à un autre. Cette variation est influée par les factures intrinsèques et extrinsèques et la méthode utilisée ou la région de culture, la période de récolte [92].

Tableau 8 : présent le rendement d'extraction en huile essentielle à partir de la plante de menthe dans Algérie et la Libye et le Maroc par la méthode d'hydro distillation.

Origine	Algérie [93]	Libye [94]	Maroc [95]
Rendement %	1-3	0.1-1	1.02

Tableau 9: Rendement d'huile essentielle de différente plante en Algérie par d'hydrodistillation.

Plante	Girofle [96]	Poivre noir [96]	Thymus vulgarise [97]	A.Halimus [1]
Rendement %	2.3	1.4	3.96	0.02

Nous avons obtenu un rendement d'extraction huile essentielle de 0.01% pour l'échantillon A.Halimus de OU-S. ce pourcentage est inférieur à celui rapporté par (CHIKHI ILYAS, 2013)[1]. qui est de 0.02% sur la même plante d'origine de bâcher, par contre (khaldi et al 2015) on trouvé en rendement 0.06 % [98]. Cette variation peut être attribuée non seulement à l'origine de la plante, mais à l'état de matière végétal, au temps d'extraction, provenance, la différence géographique et environnementale [99]. L'auteur signale aussi la disparition de 15% de produits volatils dans le végétal après 3 mois de stockage et de 80% après neuf ans [37].

Pour l'échantillon du plant A. Halimus, nous avons calculé le rendement d'extraction par Macération et soxhlet, Les résultats obtenus sont présentes dans le tableau 12 par équation N°2 dans le chapitre3 suivant :

IV.2.2.1. Extraction par macération et soxhlet

Tableau 10: rendement d'A. Halimus par macération et soxhlet

Matière végétal / Solvant	M _V (g)	R _E (%)
Méthanol (macération)	80	6.3 %
Ethanol (soxhlet)	80	14.74 %

Les rendements sont différents entre les deux méthodes d'extraction pour la plante étudiée. Le R_E par macération par méthanol est de (6.3 %), celui obtenu par le soxhlet éthanol est de (14.74%). à partir des résultats du tableau 10, on remarque que le rendement de l'extraction par méthanol de macération est inférieur au rendement d'extraction par le solvant éthanol au soxhlet. Cette différence est reliée à la nature de solvant ou la méthode d'extraction, puisque le méthanol absorbe tous les composants de la

matière végétale et dans une courte durée. On conclue que le méthanol est le meilleur solvant et la méthode de sohxlet est la meilleure que la macération.

Tableau 11: Rendement en concrètes de différente type des plants en algerie par la méthode de sohxlet (par solvant)

Plant	Origanum vulgare[97]	Thymus vulgaris[97]	Citrullus colocynthis [100]
Rendement %	7.09	8.907	22.55

IV.3.Caractérisations physiques :

Sans cette partie on a mesuré le PH, la densité relative ainsi que l'indice de réfraction de l'extraction obtenu par extraction par solvant, les résultats obtenus sont consignés dans le tableau N°17 suivant :

➤ IV.3.1.PH

L'extrait d'A. Halimus par solvant présent un pH acide ($\text{pH} = 4.66 < 7$), cette valeur de pH joue un rôle de déterminant des réaction chimique et biochimique par des inconvénient, mais par conséquence, ce résultat peut amener à un bon caractère stabilisateur contre les microorganismes ; ce qui permettra à l'extrait de jouer le rôle de conservateurs dans les produits alimentaires.

➤ IV.3.2.Densité relative

D'après l'équation N° 3 du chapitre Matériels et Méthodes a été utilisé pour calculer la densité, le résultat de la mesure est représenté dans le tableau12.

Nous avons remarqué que la densité d'extrait d'A.halimus est de 0.87906 g/l à comparé aux autres résultats obtenus pour les huiles des épices « Girofle et Poivre noir » sont respectivement 0.997 et 0.90 g/l [101]. Ce paramètre est lié à la composition chimique de cette huile qui est affectée par un grand nombre de facteurs tels que le phénotype, le moment de récolte, le type de terrain, la conservation, le procédé et les conditions d'extraction [102]

Tableau 12: Caractéristiques physiques de l'extrait A. Halimus

Caractérisation physique	A. Halimus
PH	4.66
densité relative	0.87906
l'indice de réfraction	1.3695

➤ IV.3.3.L'indice de réfractomètre

L'indice de réfraction c'est un paramètre qui renseigne sur la pureté d'extrait. Il varie selon la composition chimique, la masse volumique et augmente avec l'instauration [103]. L'indice de réfraction mesuré à la température 20 °C à l'aide du réfractomètre, La valeur d'extrait l'indice de réfraction de l'extrait est de **1.3695**, elle est supérieure à celle de l'eau qui est de **1.333** [104], la valeur d'indice trouvé est inférieur de la norme de (AFNOR ,1996) qui est de [1.491 - 1.510]. L'indice de réfraction c'est un paramètre qui renseigne sur la pureté d'extrait. Il varie selon la composition chimique, la masse volumique et augmente avec l'instauration [103].

IV.3.4.Chromatographiques en phase gazeuse CPG

Les résultats de l'analyse CPG d' HE de A. Halimus (OUS) sont regroupés dans le tableau18.

Le chromatogramme est représenté dans figure 28 qui met en relief par les indices de rétention (I_R) polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane à commencé par C_6 jusqu' à C_{21} , l'identification probable des différents composant et leur teneurs. On a déterminons l'indice de rétention d'après la loi suivant :

$$I_R = 100 \left[\left[n + (N - n) \right] * \frac{\log (tr(pic)) - \log (tr(n))}{\log (tr(N)) - \log tr(n)} \right]$$

N° 7

Les calcules ont été effectués Selon la relation N° 7. Les résultats sont mentionné dans le tableau13, on compare les résultats avec les résultats publié sur le site internet « flavornet »[105].

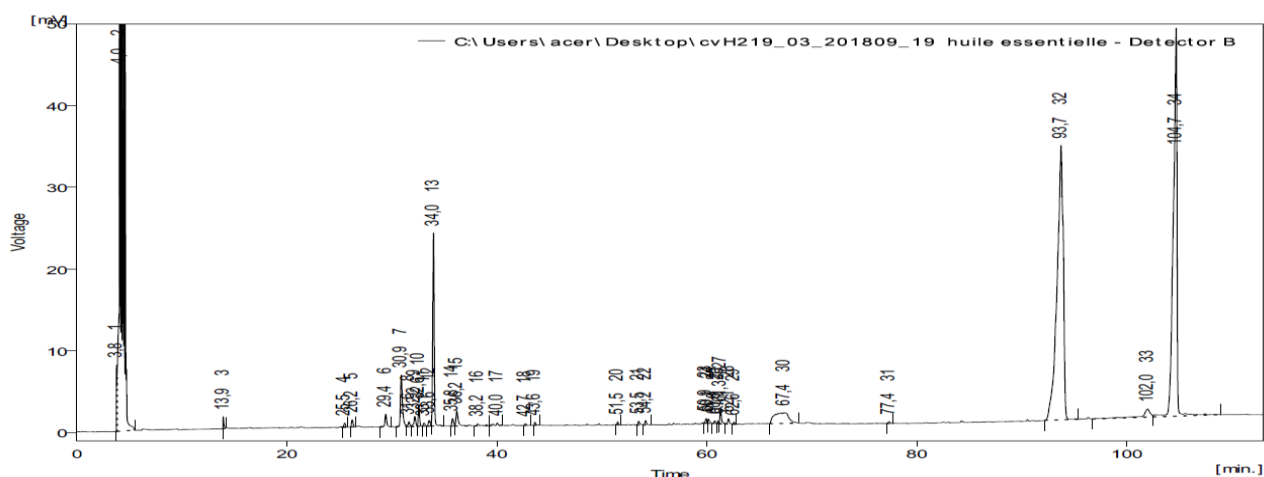


Fig.28: chromatogramme en phase gazeuse d'huile essentielle d'A. Halimus

Les indices de Kovats RI des composés résultant de l'analyse chromatographique CPG sont calculés et présentés dans le tableau 13 qui nous a permis l'identification probable de chaque valeur

Tableau 13 : identification probable de l'huile essentielle d'A. Halimus par CPG

Les constituants	Temps de rétention (min)	Concentration (%)
2,3-pentadione	13.943	0.2
ethyl butyratepropanoat	25.503	0.1
Ethyl valerate	26.220	0.2
hexenyl acetate	33.970	5.3
Undecane	40.033	0.1
Epoxy-p-menthene	51.513	0.1
Ethyl undecanoate	53.507	0.1
Carvyl acetate	59.923	0.1
δ -decalactone	67.370	2.9
E-farnesol	77.357	0.1
Phytol	93.743	31.6
Hydroxycalamenene	102.013	1.2
undecylic acid	104.71	26.6

L'analyse par CPG a permis d'identifier 13 composant représentant 68.6% de huile essentielle. Les principaux constituants sont : Phytol (31.6%), undecylic acide (26.6 %) et hexenyl acétates (5.3%), qui sont les composés majoritaires de l'huile essentielle d'A. Halimus.

En générale, les différences observées dans le pourcentage en composition d'huile essentielle, il attribué à plusieurs facteurs : la méthode d'extraction utilisée, Le climat et la nature d'espace et le traitement des végétaux avant l'extraction.

D'après les recherches bibliographiques le composant majoritaire est le phytol possède des propriétés anti-oxydantes ainsi qu'il permet de soutenir le soulagement de douleur qui peut être due a son activité anti-inflammatoire [106].

IV.3.5. Analyse de chromatographie de liquide de haute pression (HPLC)

Le chromatogramme enregistré révèle trois (03) pic majoritaire et principale, et autre pic minoritaire faible, les résultats obtenus sont mentionnés sur le tableau suivant :

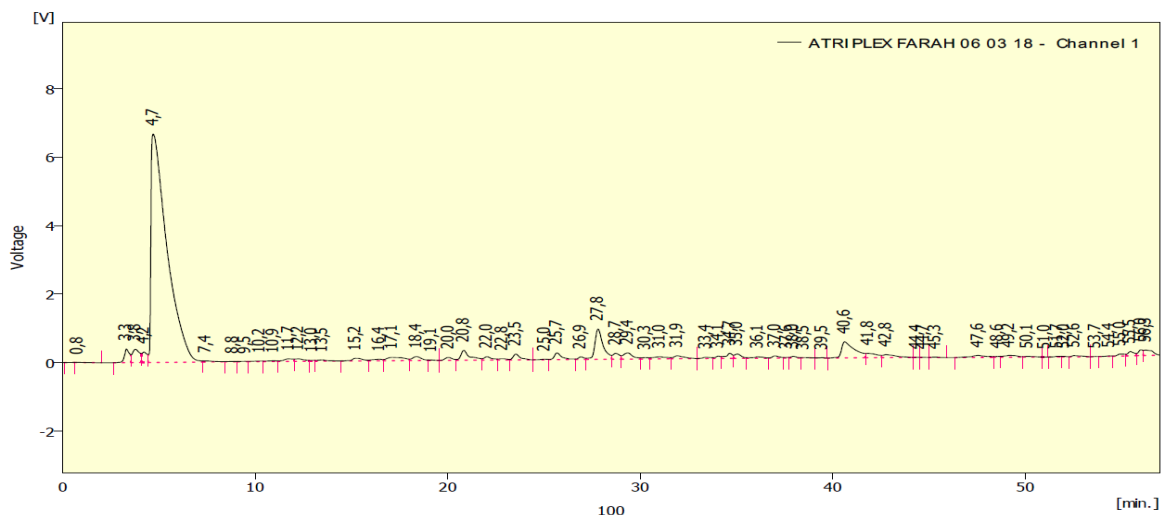


Fig.29: chromatogramme en phase liquide d'extrait méthanoïque d' A. Halimus

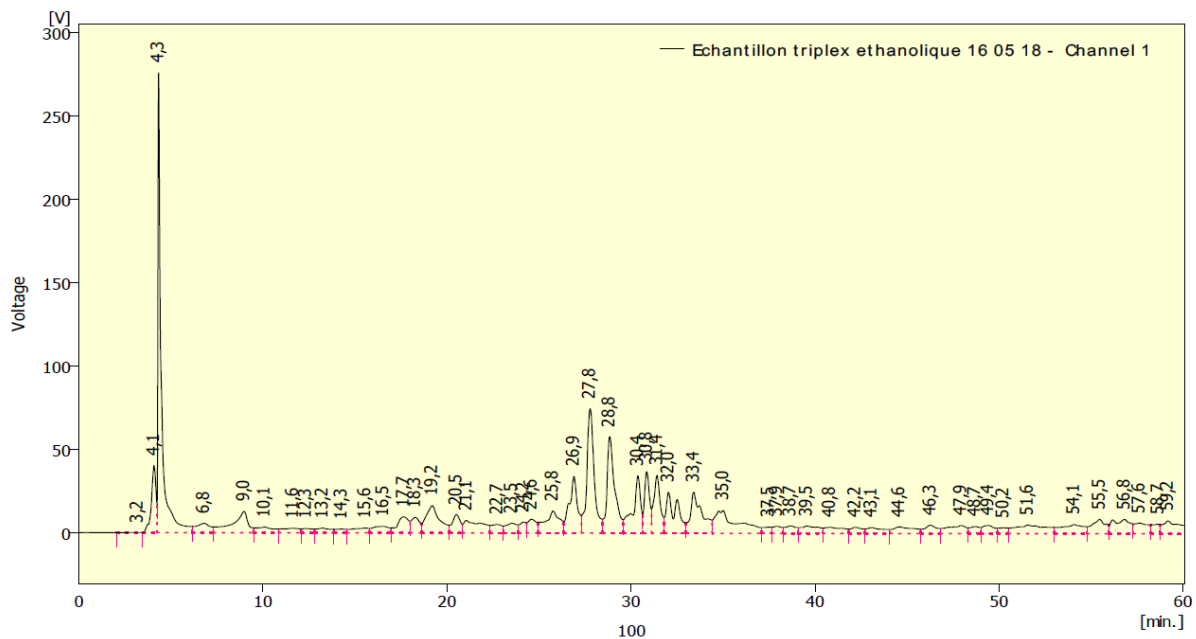


Fig.30 : chromatogramme en phase liquide d'extrait méthanoïque d' A. Halimus

Tableau 14: Analyse par HPLC de l'extrait éthanolique et méthanolique A. Halimus.

Polyphénole	T _R (min)	T _R l'extrait éthanolique (min)	C _{Ee} (%)	T _R l'extrait Méthanolique (min)	C _{Em} (%)
Acide 3 Hydroxy 4-Metoxy Cinamic	28.287	27.8	7.6	27.810	4.5
Acide Cafféique	20.5	20.5	1.2	-	-
Acide Ferulique	26.6	26.9	3.8	26.910	0.3
Acide Gallique	6.5 7.00	6.8	1.1	-	-
Acide M Annisique	33.0	33.4	3.9	33.410	0.2
Acide Salicylique	30.7	30.8	2.6	-	-
Acide Syringique	22.0	-	-	22.043	0.5
Acide Trans 2.4 Dimetoxy Cinamic	39.3	39.5	1.1	39.460	0.0
Acide Vanillique	22.7	22.7	0.8	22.843	0.2
Berberine	24.5	24.59	1.0	-	-
Kaempferol	41.1	40.8	1.0	40.627	3.9
Resorcinol	10.4	-	-	10.243	0.1
Rutine	30.7	30.8	2.6	-	-

L'identification des composés obtenus par l'analyse chromatographique HPLC sur les deux extraits à savoir l'extrait méthanoïque et l'extrait éthanoïque a révélé la présence de ces composés majoritaires comme l'acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique (7.6%), l'acide annisique (3.9%) et l'acide salicylique (2.6%), la rutine (2.6%) par l'extrait éthanoïque. Les composés majoritaires de l'extrait méthanoïque sont l'acide 3-hydroxy-4-méthoxycinnamique (4.5%), la kaempférol (3.9%). Ces composés peuvent être le principe actif pour plusieurs médicaments et d'autres composés existent dans l'extrait mais à de faibles concentrations.

Les composés identifiés présentent une forme acide à mesure du pH. Cette analyse confirme ce caractère, on note ainsi l'analyse IR faite sur l'extrait méthanoïque qui confirme la présence des fonctions acide :

- (OH à 3392.24 cm^{-1}) par l'extrait et (OH à 3312.24 cm^{-1}) par l'huile essentielle.

D'après la recherche bibliographique nous découvrons les composants majoritaires de l'extrait éthanoïque employés dans le domaine médical. L'acide ferulique (3.8%) est utilisé comme antioxydant, il possède une activité anti-tumeur importante dans le cas du cancer du sein [107] ou du foie [108]. L'acide salicylique (2.6%) est utilisé comme conservateur alimentaire, antiseptique et analgésique de son action contre la fièvre comme l'aspirine [109]. La rutine (2.6%) est utilisée pour le traitement par voie interne de l'insuffisance veineuse et des hémorroïdes. Comme elle possède des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires [110].

Parmi les composants majoritaires de l'extrait méthanoïque on trouve la kaempférol. Elle est utilisée pour son activité anti-oxydante et efficace pour l'anti-hémolytique [111].

IV.3.6.Spectroscopie infrarouge (IR)

a- l'Analyse IR d'huile essentielle d'A. Halimus

L'analyse spectroscopique IR d' HE d'extraite par hydrodistillation a été réalisé les résultats sont présenté su la figure N° 31. L'examen du spectre infrarouge montre l'existence des bandes majoritaires suivantes :

- ✓ Une bande intense et large correspondant à la vibration d'allongement des groupements **OH**, vibration de valence qui apparaissent vers **3312.24 cm⁻¹**
- ✓ Deux bandes d'intensité faible à **2977.91** et à **2929.60 cm⁻¹** relatives à la vibration d'élongation des liaisons (**C-H**) oléfiniques.
- ✓ Une bande moyenne intensité à **1636.89 cm⁻¹** attribuée à la vibration d'élongation des liaisons aromatique **C=C**.
- ✓ Deux bandes d'intensité faible correspondant à la vibration de déformation des groupements **OH**, sont situées à **1453.30** et **1383.31 cm⁻¹**
- ✓ Une bande de **1108.34 cm⁻¹** correspondant à la liaison **C - C**.
- ✓ Une bande de **572.31 cm⁻¹** à la vibration de déformation correspondant à la liaison **CH**.

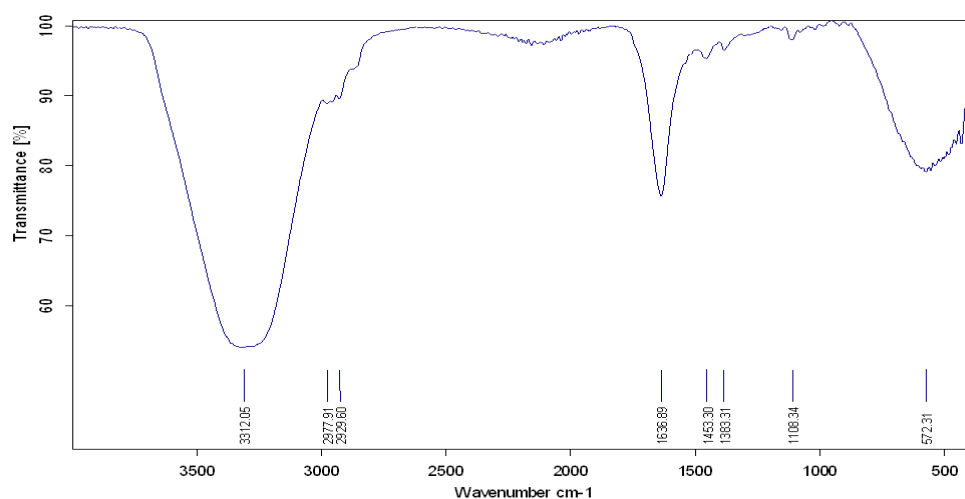


Fig.31 : spectre IR d'huile essentielle d'A. Halimus

b-Analyse IR de l'extrait d'A. Halimus

L'analyse spectroscopique IR de l'extrait extraite par macération a été réalisée, les résultats sont présentés sur la figure 32. L'examen du spectre infrarouge montre l'existence des bandes majoritaires suivantes :

- ✓ Une bande intense et large correspondant à la vibration d'allongement des groupements **OH**, vibration de valence qui apparaissent vers **3392.24 cm⁻¹**.
- ✓ Deux bandes d'intensité faible à **2924.05** et **2853.24 cm⁻¹** relatives à la vibration d'élongation des (**C-H**) oléfiniques.
- ✓ Une bande de moyenne intensité à **1707.53 cm⁻¹** attribuable à la vibration d'élongation des liaisons aromatique **C=O**.
- ✓ Une bande d'intensité forte correspondant à la vibration de déformation des groupements **OH**, est située à **1362.67 cm⁻¹**.
- ✓ une bande multiple entre **1225.84 -1026.10 cm⁻¹** correspondant à la liaison **C - C**.
- ✓ une multitude de bandes relatives à la vibration de déformation hors du plan des **CH** des cycles benzénique à **905.00 - 530.92 - 395.75 cm⁻¹**.

D'après les résultats trouvés, on analysant les 2 spectres, on remarque que la plus part des fonctions identifiés par analyse IR d'huile essentielle, sont identifiés par l'analyse IR d'extrait. D'autres fonctions sont identifiées par l'analyse IR d'extrait, ce qui confirme la richesse de l'extrait en d'autre composé

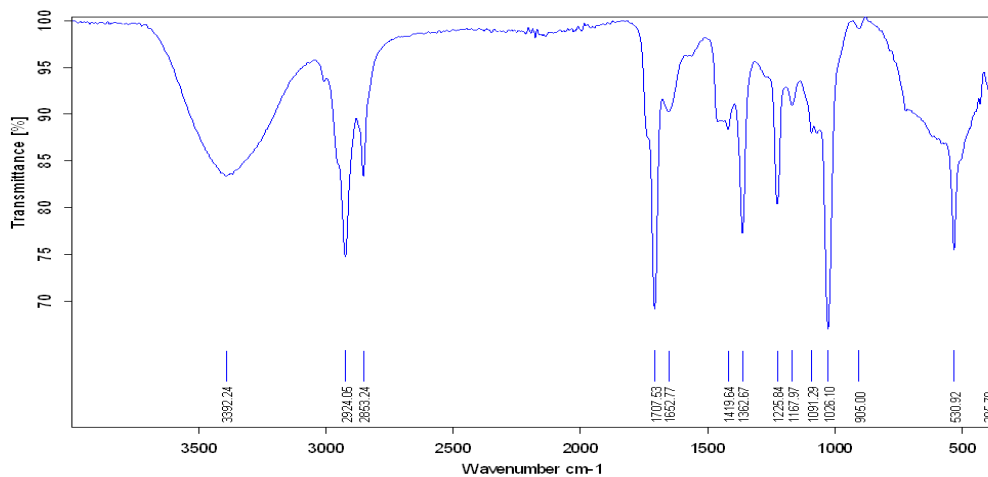


Fig.32: spectre IR d'extrait d'A. Halimus

IV.5.Caractéristique chimique de extrait A. Halimus

Comme il a été expliqué dans le chapitre méthode plusieurs paramètres physico-chimiques de caractérisation d'huile essentielle sont mesurés.

Les résultats de la détermination des caractéristiques chimiques de l'extrait obtenu par solvant sont consignés dans le Tableau 15:

L'indice de saponification préparé par l'extrait de macération, est déterminé par équation N°3.

L'indice d'acide utilisé l'extrait par soxhlet, est déterminé par équation N° 4.

L'indice d'ester c'est la différence entre I_s et I_a par équation N°5.

Tableau 15 : les indices de l'extrait A. Halimus

Produit extrait	A. Halimus
Indice	
L'indice de saponification	30.855
L'indice d'acide	16.83

L'indice d'ester	14.025
------------------	---------------

➤ IV.5.1.Indice de saponification

L'indice de saponification rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées

Des acides gras. Il représente la quantité de potasse, exprimée en milligrammes, nécessaire pour Saponifier 1 g de corps gras et l'indice d'acide 1.

La détermination des indices de saponification de notre extrait a donné la valeur enregistrée dans le tableau 13 qui est 30.855.

Les indices de saponifications de différentes extrait végétales sont résumés dans le

Tableau16:

Tableau 16: les résultats des indices de saponification et d'acide et ester.

Différentes extrait végétales	Indice de saponification	Indice d'acide	Indice ester
Thymus vulgarise [97]	52.76	5.85	47.58
Organum vulgare [97]	41.96	5.18	36.11
A. Halimus	30.855	16.83	14.025

➤ L'indice de saponification rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras. Nous remarquons, l'indice de saponification d'extrait d'A. Halimus semble être faible et inférieur par rapport aux autres extraits végétaux.

➤ L'indice d'acide indique le comportement et la quantité des acides libres présents dans notre extrait. Il peut aussi nous renseigner sur l'extrait à subir des altérations.

A titre de comparaison nous donnons dans le tableau 16, les indices d'acides de quelques extraits. D'après les résultats obtenus on remarque que l'indice d'acide d'A. Halimus est le plus élevé par rapport aux autres extraits.

Comme on a constaté qu'il y a une concordance entre l'augmentation de l'indice d'acide et le pH. Les analyses réalisées montrèrent que cet extrait riche par des composés acides.

- D'après les résultats dans le tableau suivant l'indice ester le plus faible par rapport l'autre plant.

Etant donné que la valeur d'indice de saponification est supérieure à celle d'indice d'acide, la différence entre ces valeurs ($I_s - I_A$) fait supposer à une forte relation en acides gras combinés, par exemple sous forme de triglycérides.

IV.6.L'étude de l'activité biologique

IV.6.1. Etude de l'activité antimicrobienne d'extrait A. Halimus

Cette partie traite elle à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de notre extrait de A. Halimus a été réalisée, sur trois bactéries par la méthode des aromagramme en milieu gélose. Notre but est de confirmer l'activité antibiotique d'extrait avec les bactéries, et la zone d'inhibition.

Les résultats montrent que les souches bactériennes testées sont très résistantes aux l'extrait d'A. halimus, notamment vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Donc l'A. Halimus aucun spectre inhibe des souches testées par une maximale concentration d'extrait pur.

Tableau 17: les résultats de test antibactérien sur les trois souches bactériennes

Les souches bactériennes Gram -	Spectre d'inhibition
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.00
<i>Escherichia coli</i>	0.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.00

L'huile essentielle de l'A. halimus inhibe faiblement les souches testées *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter baumannii* et *Bacillus cereus* par le même résultat de 5.2 mg/ml. Notons que *pseudomonas aeruginosa* est la souche la plus vulnérable, avec une concentration minimale inhibitrice de 2,6 mg/ml [112]. Nous avons confirmé que l'extrait ou l'huile de A. halimus est faible dans

le milieu bactérie, donc cette plante ne existe pas dans l'effet antibiotique mais il contient un autre effet.

IV.7. Activité de l'extrait aqueux sur le glucose l'A. Halimus

IV.7.1.Introduction

La recherche et identification de principe actif dans la plante A. Halimus, présente un grand intérêt en pharmacologie .ces recherches basé sur concentration aqueuse de l'extrait inconnue, et la phytochimique et l'effet de l'activité antidiabétique, cette plante est utilisé en médecine traditionnelle Algérienne pour le traitement du diabète [1].

IV.7.2. La concentration d'extrait aqueuse A. Halimus

Les résultats de la mesure de la longueur d'onde maximale sont mentionnés sur le tableau 18.

La courbe du tracé de $A=f(\lambda)$ montre un maximum vers $\lambda=325\text{nm}$

- la préparation des dilutions on va mesure la longueur d'onde à partir de balayage et le résultat résumé dans ce tableau et le graphe suivant :

Tableau 18: balayage de la longueur d'onde λ

λ nm	325	326	330	340	350	360	370	380
A	1.966	1.953	1.896	1.749	1.571	1.365	1.118	0.815
λ nm	390	400	410	412	414	416	417	-
A	0.636	0.476	0.366	0.351	0.335	0.320	0.312	-

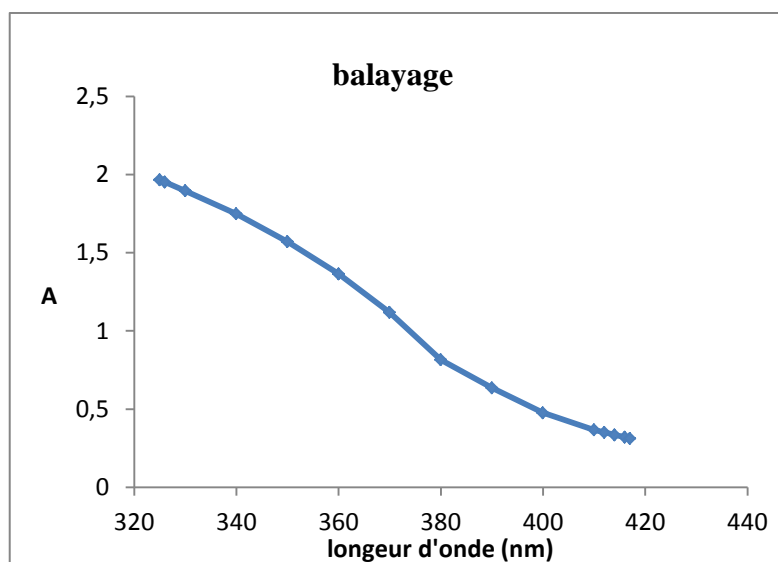


Fig.33: Courbe de balayage

D'après le balayage, mesure l'absorbance de différence concentration de l'extrait aqueux, représente dans le tableau 19 :

Tableau19: l'étalonnage par différente concentration

C mol/l	$1/2 C_0$	$1/4 C_0$	$1/8 C_0$	$1/16 C_0$	$1/32 C_0$	$1/64 C_0$
A	0.854	0.422	0.233	0.109	0.021	0.012

La figure 34 représente la variation de l'absorbance $A=f(c)$, cette variation est linéaire. La loi Beer – Lambert est applicable donc sur l'intervalle $[0,05 C_1]$.

L'analyse de la courbe nous permet de retrouver une relation entre l'absorbance et la concentration à déterminer.

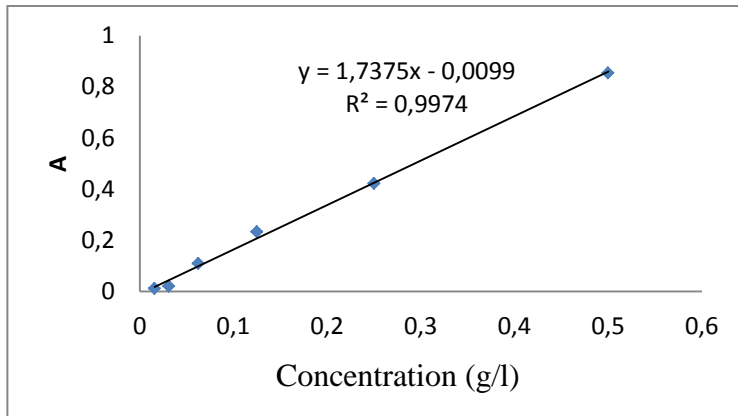


Fig.34: Courbe étalonnage

D’après la loi de béer limbaire : $A = \epsilon L C$

$Y = 1.737 x - 0.009$ on équivaut par $A = 1.737 C - 0.009$

$A + 0.009 = 1.737 .C$

Donc la concentration de l’extrait aqueuse d’A. Halimus de $C_1/2$ c’est la dilution.

$C = 1.14 C_0 \text{ g/l}$

Le résultat de l’absorption des mélange la dilution $\frac{1}{2} C_0$ avec des différentes concentrations de sucre (glucose) selon le tableau suivant :

Tableau 20: l’absorbance de concentrations différentes de sucre dans l’extrait aqueux.

C (g)	0.2	0.4	0.6
A	0.7479	0.7095	0.7372

D’après le tableau 20, nous remarque l’absorbance de mélange a été reste dans l’intervalle de l’absorbance de la dilution $\frac{1}{2} C_0$. Nous résulte la concentration de sucre ne change pas l’absorbance de l’extrait aqueux.

IV.7.2.Régime alimentaire

4 lots de lapins ont mis sous régimes alimentaire pendant 7 jours .pendant cette période, la glycémie des lapins est mesurée, elle était dans la norme. La courbe présente dans la figure 30 montre que la glycémie des 4 lots de lapins est la mémé allure. Elle se stabilise après 4 jours du régime alimentaire, d'après la courbe suivant remarque augmente la glycémie par les première jours et a partir la 3jours la glycémie réglé dan le sang dans l'intervalle standard de [0.75-1.10g/l].

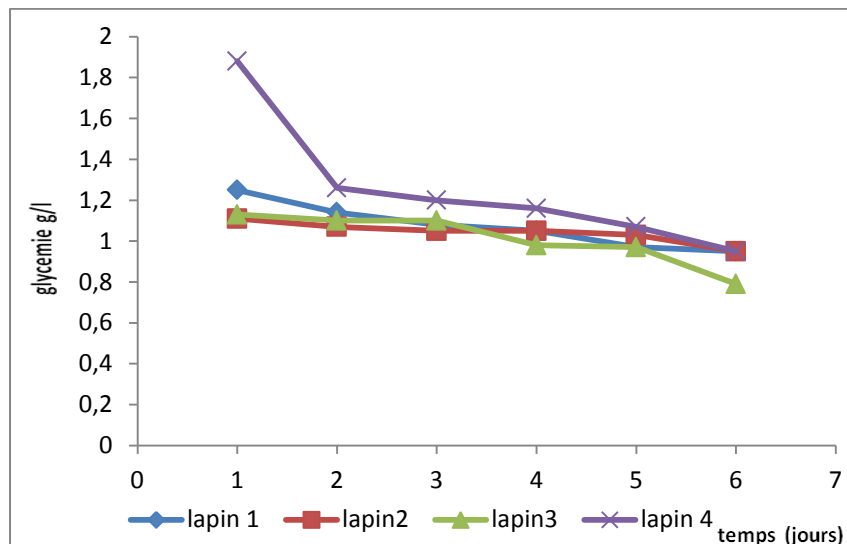


Fig.35 : la glycémie des 4 lapins de la 1^{ière} semaine

IV.7.3.Toxicité d'extrait de l'A. Halimus

Après l'administration de maximaux 2.28g/kg de l'extrait aqueux de l'A. Halimus par voie orale, les deux lapins de alimentation normale et 1g/kg de l'extrait aqueuse par les deux lapins à jeun pendant 12 h sont suivis par la 2^{ème} semaines. Cette dose n'a provoqué aucun décès chez les lapins, avec une consommation normale des aliments et une évolution améliorée du poids corporel. Il est à noter qu'aucune réactions toxiques ne sont observées en utilisant la dose sélectionnée, et ce pendant toute la période d'étude (une semaine) par différent dose, mais par conte chez les deux lapins qui jeun il mort par 2 min après gavage l'extrait aqueux malgré un dose très faible et la glycémie avant le gavage est 0.78g/l, par des symptômes changement de couleur des yeux et ballonnement. Les tableaux suivant présentent le résultat suivant :

Tableau 21: représente la glycémie de deux lapins à 12 h et 24 h dans le cas de toxicité .

Glycémie g/l		
Dose (g/kg) \ Temps (h)	Lapin 1	Lapin 2
	12h	
0.5	0.93	0.87
1	0.95	0.93
1.5	0.65	0.84
2.28	0.93	0.79

Glycémie g/l		
Dsage (g/kg) \ Temps (h)	Lapin 1	Lapin 2
	24h	
0.5	0.84	0.71
1	1.03	1.07
1.5	0.99	1.00
2.28	1.07	1.07

IV.7.4. Test de tolérance orale au glucose :

Ce test est basé sur le suivi de la glycémie après gavage avec 2.28 g/kg de glucose. Il a permis d'obtenir les résultats traduits sur la Figure 36 .Une heure après le gavage avec du glucose, on a remarqué une augmentation de la glycémie chez le lapin1. Cette élévation est très remarquable et après 30min on remarque une augmentation de la glycémie très rapide. La perturbation de la glycémie causée par le glucose est rapidement régulée chez les lapins.

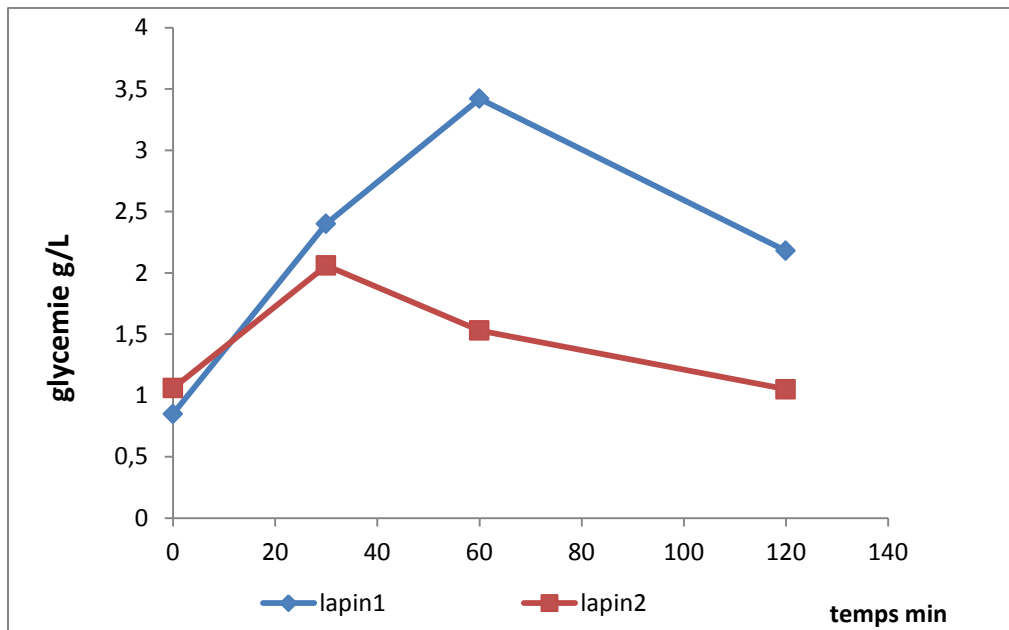


Fig.36: Test de la tolérance orale des lapins au glucose

IV.7.5. Evolution du poids des lapins

L'évolution du poids des lapins constitue un paramètre très important. Les données du suivi régulier des animaux sont regroupées ci-dessous Figure37 :

Le suivi des lapins traités avec l'extrait aqueux révèle, qu'à partir de la 2ème semaine de traitement, une augmentation modérée des poids des lapins est observée.

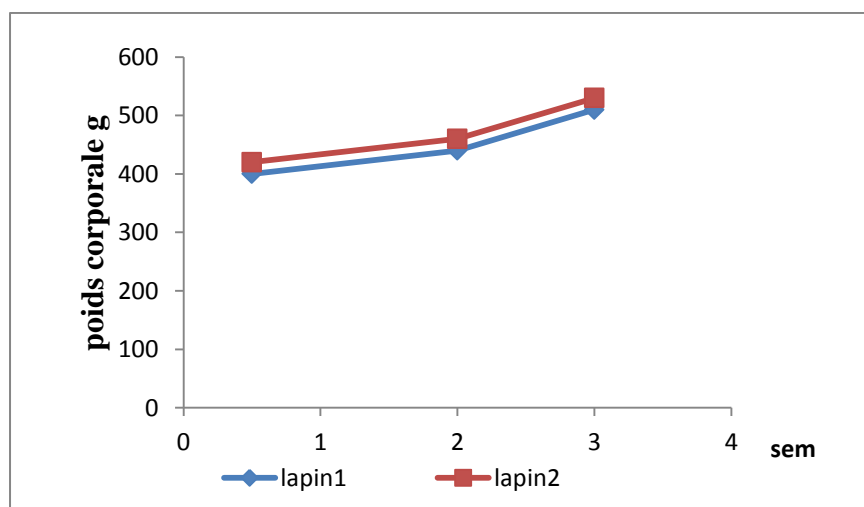


Fig.37: Évolution du poids des lapins durant les trois premières semaines de traitement.

IV.6.7. Test à court terme

La figure montre l'effet de 200mg/kg de l'extrait aqueux de l'A. Halimus sur la glycémie des lapins qui gavage 2.28 g/mol de glucose au même temps pendant 4 heures. Nous avons constaté une diminution significative de la glycémie chez les deux lapins jusqu'à la troisième heure.

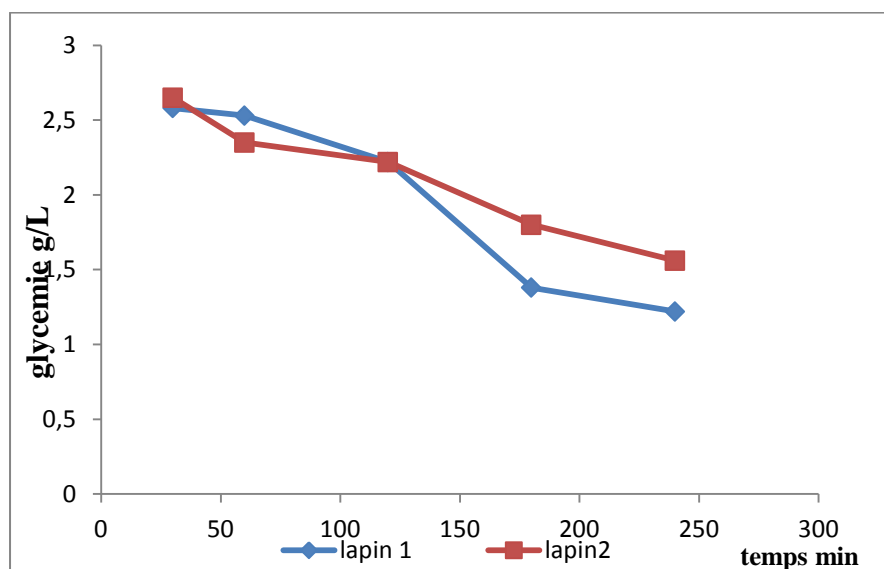


Fig.38: Effet de l'extrait sur la glycémie des lapins pendant 4 heures.

Les dernières années le diabète sucré a touché presque 366 million personne dans le monde, Selon la statistique de l'oms, on va proposer le nombre de diabète va être doublé par l'année prochaine [113].

Actuellement, plus de 1123 plantes sont utilisées pour le traitement de diabète par des méthodes traditionnelles [114]. Comme Catharanthus roseus, Trigonella foenum-greacum, Allium cepa et Allium sativum[115].

L'Atriplex halimus est une plante médicinale employé à l'homme et l'animale, en Algérie plus prisé dans le sud, cette est utilisé dans la cuisine, et comme un tisane sont très efficace contre l'acidité élevé dans l'estomac, et aussi les racines sont utilise par la gencive,et actuellement sont employé contre les tumeur [116].

L'objectif de cette étude est de recherche l'effet thérapeutique de la plante Atriplex halimus qui spontané en Alegria, sur le diabète induit cher les lapins domestique.

Le resultat conduit par administration voie orale de l'extrait aqueux de l' Atriplex Halimus de la dose 200 mg/Kg. Il provoque le résultat de plusieurs étapes pendant 3 semaines de traitement.

L'observation des résultats nous amène à conclure que l'extrait aqueux ne régule pas l'hyperglycémie provoquée par voie orale. Cette diminution du taux du glucose est observée dans le cas d'une hyperglycémie à jeun résultant d'une production hépatique de glucose par deux phénomènes importants, notamment, la néoglucogenèse et la glycogénolyse [117]. Il est donc possible que dans ce cas l'extrait aqueux de l'A. Halimus inhibe ces deux systèmes biochimiques aboutissant à la diminution de l'hyperglycémie à jeun. Cependant, cette explication suggérée demande à être confirmée par tests biologiques plus poussée, d'autant plus, qu'actuellement, les molécules diminuant la vitesse de la libération hépatique du glucose, par des mécanismes moléculaires variables, sont très recherchées [118].

Dans notre expérience la mort observée des deux lapins après administration d'une dose faible de l'extrait aqueux à jeun confirme l'hypothèse citée ci-dessus. Nous supposons que l'effet hypoglycémiant est très forte même à faible dose de l'extrait aqueux.

Aujourd'hui nous confirmons d'après les recherches suivantes, des résultats ci-dessus et croyons que l'extrait aqueux d'A. halimus est doté d'une activité anti hyperglycémiant remarquable : nous espérons terminer cette étude préliminaire et nécessiter d'être poursuivie par d'autres travaux afin de comprendre le mécanisme par lequel agissent les molécules actives, une analyse phytochimique et pharmacopie et préparé comme un complément alimentaire dans la future.

Conclusion générale

conclusion générale

L'Algérie par sa position géographique exceptionnelle comporte une importante richesse des Plantes Aromatiques et Médicinales. Nombreux « PAM » sont utilisées dans les traitements médicaux traditionnels. Notre étude a pour objectif la valorisation de cette richesse. en particulier celle du Sud- Est Algériens (wilaya d'Oud-Souf). notre travail réside sur l'étude l'extraction et l'analyse physico-chimique des huiles essentielles et extrait de la plante *Atriplex Halimus* de région d'Oued-Souf et ses l'effets thérapeutiques.

Dans un premier temps on a procédé à l'extraction de L'HE de la plante *Atriplex Halimus* par la méthode de hydro distillation qui donne un rendement très faible.

Pour la seconde extraction, le procédé utilisé est appelé extraction par macération par « méthanol » et extraction par solvant volatil « éthanol ».qui donne un bonne rendement.

Des propriétés organoleptiques caractéristiques (odeur, couleur et goût) sont observées. On observe la couleur d'A. *Halimus* est verte foncée et une odeur très forte.

La détermination des caractéristiques physiques des extrait (Indice de réfraction, densité relative et détermination de pH) révèle qu'elles sont conforment aux normes établies par les différentes pharmacopées et proches de certains travaux antérieurs.

La détermination des indices chimique (indice d'acide, d'ester et de saponification) a montré certains renseignements sur la pureté de notre extrait.

Par HPLC, nous avons constaté des composés majoritaires d'extrait éthanoïque par soxhlet: Acide 3 hydroxy4- metoxycinamic (7.6%), Acide annisique (3.9%), acide salicylique (2.6%) et rutine (2.6%). L'extrait méthanoïque par maceration a comme composés majoritaires apparus sur le chromatogramme : Acide 3 hydroxy4- metoxycinamic (4.5% °) et Kaempferol (3.9%).

Dans le cas d'analyse chromatographie en phase gazeuse les résultats enregistrés montré la composition de l'huile essentielle de A. *Halimus* 13 constituant des différentes concentrations et 3 composition majoritaire Phytol de (31.6%), Undecylic Acide (26.6%) et hexenyl acetate (5.3 %).

Par L'analyse infrarouge (IR) on peut déterminer la structure des extraits ce qui nous a permet d'identifier les fonctions suivantes **C=C**, **OH** et **C=O**.

L'activité antibactérienne des extraist est menée sur des souches de références pathogènes, l'effet est faible, il n'y a pas de changement dans le spectre d'inhibition et les bactéries résistes donc aucune activité antibactérienne.

Enfin, la dernière partie de nos investigations a traité l'évaluation du glucose par l'extrait aqueux brut de l'A. *Halimus*. Les résultats préliminaires montrent une efficacité des extraits de la

conclusion générale

plante étudiée dans le cas de la montée du glucose dans le sang. En effet, les tests révèlent que l'extrait aqueux brut, des feuilles de l'A. Halimus possède un effet anti hyperglycémiant chez les lapins de glucose élevé.



Annexe

Annexe

pic	Alcane	Tr (alcane) mn	Tr (pic) mn	indice d'alcane	Indice de Kovats	Area [%]	Nom du composé identifié	
1	C ₆	7.7 12.4	-	600	-	-	-	-
2	C ₇	12.4 19.0	13.943	700	704.06	0.2	2,3-pentadione	<u>C₅H₈O₂</u>
3	C ₈	19.0 26.2	25.503	800	809.15	0.1	ethyl butyrate propanoat	C ₅ H ₁₀ O ₂
4	C ₉	26.2 33.2	26.220	900	900.22	0.2	Ethyl valerate	C ₇ H ₁₄ O ₂
5	C ₁₀	33.2 40.0	33.970	1000	1006.91	0.2	hexenyl acetate	C ₈ H ₁₄ O ₂
6	C ₁₁	40.0 46.4	40.033	1100	1100.26	0.1	linalool	C ₁₀ H ₁₈ O
7	C ₁₂	46.4 52.4	51.513	1200	1235.32	0.1	Epoxy-p-menthene	<u>C₁₀H₁₈O</u>
8	C ₁₃	52.4 58.1	53.507	1300	1307.26	0.1	nonyl acetate	C ₁₁ H ₂₂ O ₂
9	C ₁₄	58.1 63.6	59.923	1400	1411.24	0.1	Carvyl acetate	<u>C₁₂H₁₈O₂</u>
10	C₁₅	63.6 68.8	67.370	1500	1521.91	2.9	δ-decalactone	<u>C₁₀H₁₈O₂</u>
11	C ₁₆	68.8 73.7	-	1600	-	-	-	-
12	C ₁₇	73.7 78.4	77.357	1700	1720.10	0.1	Ô-dodecalactone	<u>C₁₂H₂₂O₂</u>
13	C ₁₈	78.4 82.9	-	1800	-	-	-	-
14	C ₁₉	82.9 87.2	-	1900	-	-	-	-
15	C ₂₀	87.2 91.4	-	2000	-	-	-	-
16	C₂₁	91.4 95.4	93.743	2100	2112.27	31.6	phytol	<u>C₂₀H₄₀O</u>
17	C ₂₂	95.4 99.2	-	2200	-	-	-	-
18	C ₂₃	99.2 102.9	102.01 3	2300	2314.54	1.2	hydroxycalamenene	<u>C₁₅H₂₂O</u>
19	C ₂₄	102.9 106.9	104.71	2400	2409.37	26.6	-undecylic acid	C ₁₁ H ₂₂ O ₂
20	C ₂₅	106.9 111.8	-	2500	-	-	-	
21	C ₂₆	111.8	-	2600	-	-	-	

Tableau : les étapes de calcul I_r par CPG

Annexe

Méthode de calcul des indices de Kovats :Ir

$$I_R = 100 \left[n + (N - n) * \frac{\log (tr(pic)) - \log (tr(n))}{\log(tr(N)) - \log tr(n)} \right]$$

n = nombre d'atome de carbone inferieur.

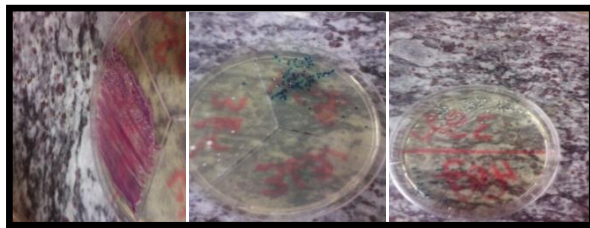
tr (pic) = temps de rétention réduit du pic .

tr (n) = temps de rétention réduit de n atomes des carbone éluée avant le pic.

N= nombre d'atome de carbone supérieur.

Annexe

ANNEXE I : Aromatogramme des souches testées



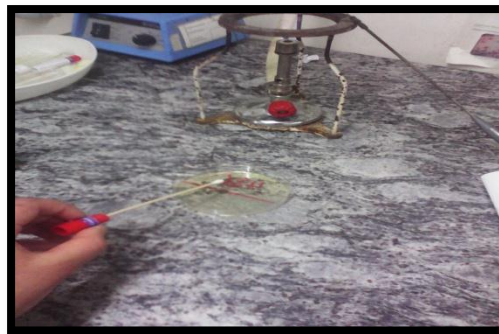
E. coli

K. pneumoniae

P. aeruginosa



suspension bactérienne



Ensemencement



Extrait pure



peser les disques



Placer les disques imprégnés par extrait pur Incubation (24 h-37 C°) par les bactéries

Annexe

Les souches bactérie

- **Escherichia coli** : est un bacille à gram négatif de la famille des entérobactéries .cette bactérie fait part de flore intestinale l'être humain [109].
Ayant une taille moyenne de 1à1.5 µm de large et de 2 à 6 µ m de long sous microscope optique [110].
La plus part des souches d'E. Coli poussent rapidement (18 à 24 h) sur les milieux ordinaire comme la gélose nutritive, les colonies mesurent environ 2à3mm de diamètre.il sont incolores et grasse. [111].

- **Klebsiella pneumoniae** : est un petit bacille capsulé, à gram négatif, immobiles, très polymorphes. [112] il est présent dans le tube digestif de l'homme et se trouve dans les sols et les eaux. [113]

- **Pseudomonas aeruginosa** : est un bactérie à gram négatif et de bacille de 0.5à 0.8 µm de diamètre sur 1.5 à 3.0 µm de longueur, mobiles grâce à une ciliature monotriche . [114] elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques [115].

Annexe

ANNEXE : les étapes d'extraction par macération



Fig.39: A .Halimus avant le séchage



Fig.40 : A. Halimus après le séchage



Fig.41: le mélange dans ultrasonique



Fig.42 : filtration le mélange



Fig.43 : le mélange dans une rotavapeur

Annexe

ANNEXES : préparation les indice



Fig.44 : préparation de KOH et HCL



Fig.45 : indice de saponification à blanc



Fig.46 : indice de saponification



Fig.47 : titrage par HCL jusqu'à le virage



Fig.48 : L'indice d'acide



Fig.49 : indice de réfractomètre

Annexe

Les étapes d'hypoglycémie



Fig.50 : poudre d'A. Halimus



Fig.51 : extrait aqueux d'A.Halimus

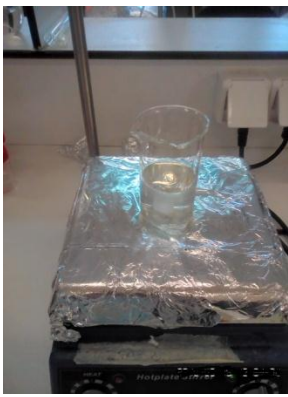


Fig.52 : mélange de sucre et extrait aqueux dilué. **Fig.53** : les différentes concentrations de sucre



Fig.54 : gavage d'extrait aqueux de lapin.

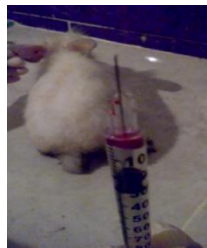


Fig.55 : Prélèvement et mesure la glycémie de lapin.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] **CHIKHI. I** ; composition chimique et activités biologiques des extraits de cinq plant aromatique et médicinales de l'ouest d'Algérie, Doctorat de 3ème cycle en Chimie et Option de Chimie Bio-Organique & Thérapeutique, Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives, université abou bekr belkaid-telemcen ,(2013).
- [2] **LE HOUEROU H N** : Relation entre la variabilité des précipitations et celle des productions primaires et secondaires en zone arides. In : l'aridité, une contrainte au développement, Ed ORSTOM, Coll. Didactiques Pp: 197-220, (1992)
- [3] **WILSON A. D**: Halophytes and shrubs in semi-arid regions of Australia: value for grazing and land stabilization In: V.R squires and A.T AYOUB, (1994)
- [4] **BERRI .R** : mémoire de fin d'étude, en vue de l'obtention du diplôme ingénieur d'état, spécialité: agronomie saharienne Pp :15-1, (2009)
- [5] **FRANCLLET A. ET LE-HOUEROU H.N.:** - Les Atriplex en Tunisie et en Afrique du Nord. Doct. F.A.O. Rome. Pp: 249 ET Pp: 189, (1971).
- [6] **CHOUKR-ALLAH .R:** the potential of halophytes in the development and rehabilitation of arid and semi-arid zones .CIHEAM Instituto Agronomico mediterraneo, BARI, Italy .Pp1-13, (1996).
- [7] **BENREBIHA .F Z:** Contribution à l'étude de la germination de quelques espèces d'Atriplex locales et introduites. Mémoire de magister en sciences agronomiques, Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger Pp: 5- 20, (1987)
- [8] **H.C.D.S.:** Notice bibliographique sur quelques plantes fourragères et pastorales.Haut commissariat du développement de la steppe.Pp :15, (1996)
- [9] **HOUÉROU H. N:-** The rôle of saltbushes (Atriplex spp.) in arid land réhabilitation in the: Osmond C.B., Bjorkman O., et Anderson D.J., 1980 - physiological process in plant ecology. Toward a semi arid lands. Ed. Academic press. INC, New York (U.S.A), Pp: 601-642, (1992)
- [10] **ZID. E, BOUKHERIS M. :** Quelques aspects de tolérance de l'Atriplex halimus L. en chlorure de sodium, multiplication, composition minéraux. Oecol. Plant.Pp :12,351, (1977)
- [11] **FROMENT. D:** Etablissement des cultures fourragères d'Atriplex en Tunisie central. Bull recherche Agro.C.E.M.L.Vol extra Pp : 590-600, (1972)
- [12] **H.C.D.S.:** Notice bibliographique sur quelques plantes fourragères et pastorales. Haut commissariat du développement de la steppe.Pp :15, (1996)

Références bibliographiques

- [13] **FROMENT D:** Etablissement des cultures fourragères d'Atriplex en Tunisie central. Bull recherche Agro.C.E.M.L.Vol extra Pp : 590-600, (1972)
- [14] **FRANCLET A,ET HOUEROU.N:**Les Atriplex en Tunisie et en Afrique du Nord .Rome : Organisation des nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture Pp : 249-271 , (1971)
- [15] **KILLIAN C:** La végétation autour de chott Hodna indicatrice des possibilités culturales et son milieu édaphique. A.n.Inst. Agro. T. VII, Pp : 51-80, (1953)
- [16] **FROMENT D:** Etablissement des cultures fourragères d'Atriplex en Tunisie central. Bull recherche Agro.C.E.M.L.Vol extra Pp : 590-600, (1972)
- [17] **CASTROVIEJO M, INBAR M, GOMEZ-VILLAR A, GARCIA-RUIZ J M,:** Cambios en el cauce aguas abajo de una presa de retention de sedimentos », I Reunion Nacional de Geomorfologia, Teruel Pp : 457-468, (1990)
- [18] **HOUEROU H N:** Relation entre la variabilité des précipitations et celle des productions primaires et secondaires en zone arides. In : l'aridité, une contrainte au développement, Ed kinet j.m., benrebiha e., bouzid s., laihacar s., dutuit p., 1998: Le réseau Atriplex ou comment allier biotechnologies et écologie pour une sécurité alimentaire accrue en régions semiarides et arides. Cahiers d'Ariculture. 7 (6) Pp:505-509. ORSTOM, Coll. Didactiques Pp:197-220, (1992)
- [19] ([www. Telabotanica.org](http://www.Telabotanica.org))
- [20] **CHADEFAUT M, EMBERGER L,:** Traité de botanique systématique. Tome I. Ed Masson. Paris,Pp : 753 , (1960)
- [21] **H.C.D.S.:** Notice bibliographique sur quelques plantes fourragères et pastorales. Haut commissariat du développement de la steppe .Pp :15,(1996).
- [22] **OZENDA P,:** Flore du Sahara, Ed. C.N.R.S, Paris, Pp : 622, (1983).
- [23] **NEGRE R:** Petite flore des régions arides du Maroc occidental. Tome 1.Centre National de la Recherche Scientifique, Paris Pp : 179- 180, (1961).
- [24] **BENREBIHA F Z:** Contribution à l'étude de la germination de quelques espèces d'Atriplex locales et introduites. Mémoire de magister en sciences agronomiques, Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger, Pp : 5- 20, (1987).
- [25] **DUPERAT M.:** Le guide des arbres et arbustes de France. Ed, sélection du Reader's Diges, Pp : 255, (1997)
- [26] **KINET J.M, BENREBIHA E, BOUZID S, LAIHACAR S, DUTUIT P:** Le réseau Atriplex ou comment allier biotechnologies et écologie pour une sécurité alimentaire accrue en régions semiarides et arides. Cahiers d'Ariculture. 7 (6) Pp : 505-509, (1998).

Références bibliographiques

- [27] **NEGRE R.:** Petite flore des régions arides du Maroc occidental. Tome 1. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris Pp : 179- 180 , (1961).
- [28] **BENREBIHAF Z. :** Contribution l'étude de la germination de quelques espèces d'Atriplex locales et introduites. Mémoire de magister en science agronomique. L'I.N.A Alger. Pp : 119, (1987) .
- [29] **BEN AHMED H, ZID E, EL GAZZAH C, GRIGNON C.:** Croissance et accumulation ionique chez Atriplex halimus L. Cahiers d'Agricultures, Vol. 5 Pp: 367-372, (1996).
- [30] **FRANCLLET A, LE HOUEROU HN:** Les Atriplex en Tunisie et en Afrique du Nord. Rome: Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture Pp: 249- 271, (1971).
- [31] **ABU-ZANAT MM, FM AL-HASSANAT M, ALAWI GB RUYLE :**Évaluation Dans Atriplex halimus minérale L. L. et Atriplex nummularia Dans la région de la aride Jordanie. MJ Range Fourrage Sci, Pp:247-251, (2003).
- [32] **LAOUEDJ M.** livre des plantes médicinales du Sahara(descriptions, propriétés, posologies, contre-indications). Ecrivain chez l'édition edilivre – Paris- France ,Pp :121, (2017) ; PDF ; numérique. Email : tipasa334@gmail.com.
- [33] **AHARONSON Z, SHANI (MISHKINSKY) J, SULMAN F.G.** Hypoglycaemic effect of the salt bush (Atriplex halimus) - a feeding source of the Sand Rat (Psammomysobesus), Diabetologia, Vol. 5, Issue: 6, Pp; 379-383, (1969).
- [34] **RODRIGUEZ, SA , MURRAY AP.** Activité et composition antioxydante de l'huile chimique undulata Atriplex essentielle. Nat. Prod. Commun . 5 , Pp :1841-1844, (2010).
- [35] **SHANI J, AHRONSON Z, SULMAN FG, ET AL.** Insulin-potentiating effect of salt bush (*Atriplex halimus*) ashes. *Isr J Med Sci.*;8 Pp:757–758, (1972).
- [36] **AFNOR ;** Association française des normes, Recueil de norme .les huiles essentielles échantillonnage et méthode d'analyse (Tome I) Pp : 471. Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome II, Volume1 Pp : 323 et 2 Pp : 663). Ed. AFNOR, France, (2000)
- [37] **BRUNETON J.** Eléments de phytochimie et de pharmacologie. 2éme,(1993).
- [38] **SMALLFIELD B.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal, Eddition (2001)
- [39] **PADRINI F., & LUCHERONI M. T.** Le grand livre des huiles essentielles : Guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et L'aromomassage énergétique avec plus de 100 photographies. Ed. De Vecchi, Pp :15 , (1996).

Références bibliographiques

- [40] **EL KALAMOUNNI C.**; Thèse sur : caractérisation chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, l'Institut National Polytechnique de Toulouse. Pp : 22-38, (2010).
- [41] **BINET P, et BRUNEL J.-P.**; physiologie végétale. Tome II. Edit Dion .Pp:54, (2000).
- [42] **Kunle O, ET Okogun j.**; Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from lippiamulti flora leaf extract phytomedicine .Vol 10.Pp:59-61, Eddition (2003).
- [43] **BESOMBES C**; contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo mécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de doctorat .Université de la Rochelle,Pp :289,(2008).
- [44] **Garnéro j .,** ; les huiles essentielles,leur obtention ,leur composition ,leur analyse et leur normalisation. Ed. Encyclopédie des médecines naturelles, paris, France ; Pp : 2-20, (1991).
- [45] **Barry N** ; Art d'extraire les huiles essentielles .de parfum à faire soi même. Pp : 125-128, (2001).
- [46] **Burt S**: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review.International Journal of Food Microbiology 94, Pp.223-253, (2004).
- [47] **Khadija .R** : (Etude du mécanisme de l'action bactéricide de HE sur mycobacterium phlei et mycobacterium fortuitum), thèse de Doctorat d'état. En biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé .Fés , (2002)
- [48] **Roulier G** (les huile essentielles pour votre santé, Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes). Edt .Dangles .France,(1992).
- [49] **Traoré M .C** ; Etude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali ; Thèse de doctorat : Université de Bamako, Mali .Pp :175, (2006).
- [50] **Binet p. et Brunel J.P** ; (physiologie végétale), Doin, paris, Pp : 744-782, (1968).
- [51] **Eisenhut M** ;the toxicity of essential oils ,article in presse ,International journal of Infectious Diseases.11(4) .Pp365, (2007).
- [52] **Bouguerra A.**;Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de Foeniculum vulgare Mill. En vue de son utilisation comme conservateur alimentaire ; Thèse Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine, Algérie .Pp:10, (2012).
- [53] **Roulier G** : les huile essentielles pour votre santé, Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes). Edt .Dangles .France,(1992).
- [54] **CARSON C.F .ET RILEY T.V**: (antimicrobial activity of the major components of the essential oil of Melaleuca alternifolia) J.Appl bacteriol, 78(3) Pp:264-269, (1995).

Références bibliographiques

- [55] **GUINOISEAU E** ; Molécules antibactériennes issus d'huiles essentielles :séparation, identification et mode d'action ; Thèse de docteur de mention :biochimie-biologiemoléculaire, Université de corse .Pp:50-51, (2010).
- [56] **ANTON J.C , WENIGER B ., ANTON R .;** Huiles essentielles in actif et additifs en cosmétologie .3eme édition, lavoisier Tec et Doc , paris. Pp : 189-229,(2006).
- [57] **HARBORNE J.B.,** : Photochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Ed. Springer,(1998).
- [58] **SAMATE ABDOUL D** ; Composition chimique d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : Valorisation, thèse de doctorat, Univ.de Ouagadougou, Burkina Faso,(2001).
- [59] **SYLVAIN .S** ; etude de la composition chimique d'huiles essentielles et d'extraction de menthe de corse et de kumquats. Chimique.université de corse.Pp:8 ,(2010)
- [60] **MEYER-WARNOD, B.:** Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. Perfume. Flavorist, 9 Pp: 93-104, (1984).
- [61] **HESHAM H. A. RASSEM ET AL,** :Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 10(16) November 2016, Pp: 117-127, (2016).
- [62] **FAHLBUSCH, KARL-GEORG;** Hammerschmidt, Franz-Josef; Panten, Johannes; Pickenhagen, Wilhelm; Schatkowski, Dietmar; Bauer, Kurt; Garbe, Dorothea; Surburg, Horst,: "Flavors and Fragrances"Ullmann 'Encyclopedia ofIndustrial Chemistry. doi:10.1002/14356007.a11_141,(2003).
- [63] **RAI, R. AND B. SURESH:** Indian Journal of Traditional Knowledge, 3(2)p: 187-191,(2004).
- [64] **HELLAL. Z** ; Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*), Magister en BIOLOGIE Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou,Pp :8, 9, 10,12.112,(2011)
- [65] **ROUX, D** ; Conseil en aromathérapie. 2ème édition, Pro-Officina., Pp:187,(2008)
- [66] **KIM, N.S. Lee, D.S:** CHROM, J.Pp 982, 31, (2002).
- [67] **MICHELE SCHANTZ M, HAWTHORNE S.B.:** Comparison of Supercritical Fluid Extraction and Soxhlet Extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in Environmental Matrix Standard Reference Materials. Journal of Chromatography A, Pp816, Pp 213-220,(1998).
- [68] **HESHAM H. A. RASSEM ET AL:** Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 10(16) November 2016, Pp: 117-127, (2016).

Références bibliographiques

- [69] **CHRISSE, W:** “The Encyclopedia of Aromatherapy.” Vermont: Healing Arts Press, Pp: 16-21, (1996).
- [70] **DAWIDOWICZ, A.L., E. RADO, D. WIANOWSKA, M. MARDAROWICZ AND J. GAWDZIK :** Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus Vulgaris L.* *Talanta*, Pp:76, Pp: 878-884 ,(2008).
- [71] **MAC LAREN. L, MYERS .M.N, GIDDINS. J.C;** Dense-gas chromatography of nonvolatile substances of high molecular weight, *Science*, Pp159,197-199,(1968).
- [72] **BENMERIEM L.ET BOUEGUIG C ;** extraction des essences par hydrodistillation et par solvant volatils des feuilles de la sauge officinale, université de blida Pp :12-15,(1996).
- [73] richard,H .Milton,j; les aromes alimentaires ,tercet doc lavoisier,(1992) .
- [74] <https://fr.wikipedia.org/wiki/Réfractométrie>
- [75] **RIHANE K ET BENLAHARCHE R.** activité antibactérienne des polyphénols et flavonoïdes d’extraits à partir deux plantes médicinales : *artémisia herba alba* et *ocimum basilicum* sur *escherichia coli* et *staphylococcus aureus*. Mémoire de master université mentouri constantine,(2013)
- [76] **HAMEURLAINE .S ;** (mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *pituranthos scoparius* et *rhantherium adpressum* de la région de ghardaia) :mémoire de magister ; université de kasdi merbah–ouargla,(2009).
- [77] **OLLE M;** Analyse des corps gras. Bases documentaires: techniques d’analyses; Référence Pp3325; Ed.Techniques de l’ingénieur,(2002). <http://www.techniques-ingenieur.fr>
- [78] **ADRIAN J., POTUS J., POIFFAIT A., DAUVILLIER P;** Introduction à l’analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. *Techniques & documentation- Lavoisier* Pp:47-53,(1998).
- [79] **FERNANDEZ X., CABROL-BASS D. :** Analyse des arômes, *Techniques-Ingénieur.*, p. 32335, 10, SEPT. (2007).
- [80] **BARBONI T;** Contribution de méthodes de la chimie analytique à l’amélioration de la qualité de fruits et à la détermination de mécanismes (EGE) et de risques d’incendie, Thèse De doctorat, Université de Corse, Pp.21,(2006).
- [81] **PERKIN ELMER, NORWALK;** National Institute of Standards and Technology, PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library Corporation,(1999).
- [82] **Mac Laren, L. Myers M.N, Myers, Giddins, J.C.;** Dense-gas chromatography of nonvolatile substances of high molecular weight, *Science*, Pp159,197-199,(1968).
- [83] **CAUDE M. AND JARDY A :**Chromatographie en phase liquide : Introduction, *Technique de l’ingénieur, traité Analyse et caractérisation* Pp 1, 1-6, (1996).

Références bibliographiques

- [84] **JEAN-LOUIS CUQ** ; Cours chromatographie liquide, Université Montpellier, Pp :4, (2001).
- [85] **VANVOORT FR, ISMAIL A.A., SEDMAN J., and EMO G.**; Monitoring the oxidation of edible oils by Fourier transform infrared spectroscopy. J. Am. Oil Chem. Soc. 71 (3), Pp :243–253 ,(1994).
- [86] **ADRIAN J., POTUS J., POIFFAIT A., DAUVILLIER P.**, ; Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. Techniques & documentation- Lavoisier ; Pp 47-53 ,(1998).
- [87] **Ollé M.**, ; Analyse des corps gras. Bases documentaires: techniques d'analyses; Référence Pp3325; Ed.Techniques de l'ingénieur,(2002). <http://www.techniques-ingenieur.fr>
- [88] **BOUKHATEM .M, HAMAIDI .M, SAIDI .F et HAKIM .Y** ; Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (Pelargonium graveolens L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie), Article de l'Unité de recherche en Biotechnologies Végétales, Département de Biologie, Université Saad Dahleb de Blida, Algérie. Pp 37-41-45,(2010).
- [89] **HADDOUCHI F.ET BENMANSOUR A**, ; Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques ; Applications à deux plantes aromatiques. Les technologies de laboratoire.8 (3). Pp. 20-27,(2008).
- [90] **ZAIKA, L**; spices and Herbs - Their Antimicrobial Activity and Its determination. Journal of Food Safety. 9(2).Pp:97-118 .(1998)
- [91] **JORGENSEN J.H., TURNIDGE J.D., WASHINGTON J.A.**, Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion dans Murray P.R., Tenover F.C, Baron E.J., Tenover F.C, Tenover F.C, Tenover F.C, ed. Manual of clinical microbiology, 7th ed. Washington, DC: ASM Pp:1526-1543.(1999)
- [92] **LAGHOUITER O.K, GHERIB A.ET LAGHOUITER H** ;étude de l'activité antioxydante des huiles essentielles de certaines menthes cultivées la région de Ghardaia .revue el wahat pour les recherches et les études vol n°1P Pp :84 ,(2015).
- [93] **LAREDJ H** : – les plantes médicinales extraction des huiles essentielles et activités antibactériennes –premières journées de la pharmacie 08.09./12/.univ.badji mokhtar annaba ,(2004)
- [94] **SINGH R ,SHUSHNI M.A.M, BELKHEIR A.**; antibacterial and antioxidant of menthe piperita L-arabian journal of chemistry , university Benghazi ,Libya,(2011).

Références bibliographiques

- [95] **DERWICH E ,CHABIR R . TAOUIL R .ET SENHAJI O** ; Activité antioxydant in vitro et études GC/MS sur les feuilles de mentha piperita (lamiaceae) du maroc ; Int .j pharmaceut.sei.drug Res 3 ;Pp130-136 ,(2011)
- [96] **LAATAB H**; extraction et l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de concrète de *thymus vulgaris* de la région de chlef, Master en génie des procédés,option de génie pharmaceutique , universite de khmis miliana. Pp39 (2013).
- [97] **KHALDI A.AMAMRA D.TIRTOUIL A. MAGHDOURI N.BELHADJ N** ;effects of atriplex halimus on resistant bacterial strain of different origins ,international conference on advances in agricultural,biological et environmental sciences (AABES) july 22-23,2015london (uk) Pp87,(2015).
- [98] **Zhao D., Xu W ., Husainib A.,wua w .** ; variation of essential oil of menthe haplocalyx briq and menthe spicata L.from china, industrial crops and products 42, Pp:251-260,(2012).
- [99] **MOSTEFA-KARA I** ; contribution à l'étude de l'analyse de l'huile de citrullus colocynthis et de son pouvoir antimicrobien. Mémoire de magister de biologique. Option de Substances Naturelles, Activité Biologique et Synthèse, universite Abou-bekr belkaid –Tlemcen.Pp :73,(2011).
- [100] **HAMADOU F .TOUKI S** ; Extraction, Caractérisation des huiles essentielles des épices Girofle, Poivre Noir, MASTER ACADEMIQUE, Domaine de Sciences et Technique Filière de Génie des Procédés ; Spécialité Analyse et Contrôle de Qualité, Université KASDI MERBAH Ouargla. Pp26 , (2017).
- [101] **TENSCHER E., ANTON R ET LOBSTEIN A.,:** Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition Tec&doc. p3-50/121-124 ,(2005)
- [102]**BOUKHATEM MOHAMED. N, HAMAIDI MOHAND .S, SAIDI .FET HAKIM .Y** ; Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie), Article de l'Unité de recherche en Biotechnologies Végétales, Département de Biologie, Université Saad Dahleb de Blida, Algérie.Pp 37-41-45,(2010)
- [103]**AFSSAPS**, Recommandations relatifs aux critères de qualité des huiles essentielles(2008).
- [104] www.flavornet.org/flavornet.html.
- [105] <https://elixinol.com>
- [106] https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_férulique

Références bibliographiques

[107] [https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide férulique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_férulique)

[108] www.analgesique.wikibis.com

[109] [https:// www.passeportsante.net](https://www.passeportsante.net)

[110] wikipedia.org/wiki/Kaempférol

[111] **DAWIDOWICZ, A.L., E. RADO, D. WIANOWSKA, M. MARDAROWICZ AND J. GAWDZIK, :** Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus Vulgaris L.* *Talanta*, Pp:76, Pp: 878-884 ,(2008).

[112] **FAGHERAZZI G.,** Facteurs alimentaires, composantes du syndrome métabolique et risques de cancer du sein et de diabète de type II dans la cohorte E3N. Thèse de Doctorat, Université Paris XI, Pp.28,(2011).

[113] **MARLES R.J., FARNSWORTH N.R.,**Plants as sources of antidiabetic agents. *Economic and Medicinal Plant Research*, Vol. 6, pp. 149-187, (1994)

[114] **AL-ACHI A.,** Herbs that affect blood glucose levels. *Women's Health in Primary Care*, Vol.8, Issue: 7, pp. 325-330,(2005).

[115] Halimi A., *Les plantes médicinales en Algérie*, 1ère édition, Edition DERTI, Alger, 2004, pp.214. Harborne J.B., *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Ed. Springer, (1998)

[116] **WRIGHT S., KEELE C.A., NEIL E.,** *Physiologie appliquée à la médecine*, 2ème Edition FlammarionSciences, Paris, 1980

[117] **WAGNER J.A.** Early clinical development of pharmaceuticals for type 2 diabetes mellitus: from preclinical models to human investigation. *The Journal of Clinical endocrinology and Metabolism*, Vol. 87, Issue: 12, pp. 5362-5366.(2002)