

Doc/547 - 21/03

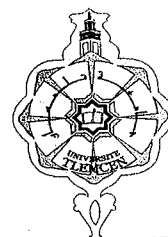
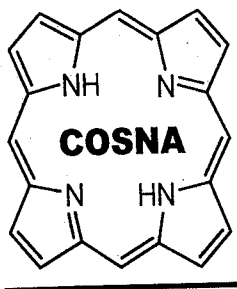
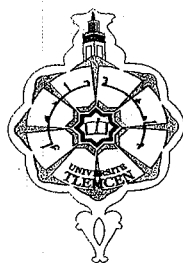
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement supérieur et de
recherche scientifique

Sous le N°:
Date: 29/29
Code:

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

THESE

Pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT D'ETAT EN CHIMIE ORGANIQUE
APPLIQUEE



Inscrit Sous le N°:
Date le: 13 AVR. 2011
Code: 4712

Thème

Contribution à l'étude chimique et biologique de
Globularia alypum L. et *Ruta chalepensis* L., deux plantes de la
flore de la région de Tlemcen utilisées en médecine traditionnelle

Présentée par
Mme MERIAH Salima née MERGHACHE

Soutenue Décembre 2007 devant le jury composé de :

Président : Mr. TALEB BENDIAB S.A.

Professeur à UABB

Examineur : Mr. AINAD TABET I.

Professeur à USBA

Examineur : Mr. HACINI S.

Professeur à l'université d'Oran

Examineur : Mr. KAJIMA MULENGI J.

Professeur à UABB

Examineur : Mr. DJAZIRI R.

MC à UABB

Encadreur : Mr. TABTI B.

Professeur à UABB

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été effectué au Laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyse (COSNA) de l'Université Abou-Bekr BELKAID de Tlemcen dirigé par Monsieur Joseph KAJIMA MULENGI.

Je tiens à exprimer ma plus vive reconnaissance à mon Directeur de thèse Monsieur Boufeldja TABTI, Professeur à l'Université de Tlemcen, qui a suivi et dirigé mes travaux de recherches, pour ses conseils, critiques et son soutien.

Je tiens à remercier Madame Micheline GRIGNON DUBOIS, directeur de recherche au Laboratoire de chimie des substances végétales – Institut du Pin – Université Bordeaux 1. Pour m'avoir accueillie chaleureusement dans son équipe. Je lui suis extrêmement reconnaissante de l'intérêt qu'elle a porté à mon travail, de sa grande disponibilité et de sa sympathie.

Que Monsieur Sid Ahmed TALEB BENDIAB, Professeur à l'Université de Tlemcen, soit remercié pour l'honneur qu'il me fait en étant président de ce jury.

Je tiens à remercier Monsieur Idriss AINAD TABET, Professeur à l'Université de Sidi Bel-Abbes, d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je tiens à remercier Monsieur S. HACINI, Professeur à l'Université d'Oran, d'avoir accepté d'examiner cette thèse.

Ma gratitude va également à Monsieur Joseph KAJIMA MULENGI Professeur à l'Université de Tlemcen pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie aussi Monsieur Rabah DJAZIRI, Maître de conférences à l'Université de Tlemcen, pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail et en acceptant de faire partie du jury.

Je souhaite exprimer mes remerciements à Docteur K. BOUHADJERA, Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen, pour son aide.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur A. CHOUKCHOU –BRAHAM Professeur à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir effectué les analyses de la spectrométrie d'absorption atomique.

Je tiens à remercier Monsieur R. DJAZIRI, Monsieur LAHFA et Mademoiselle M. ZERIOUH, pour m'avoir effectué l'activité antidiabétique.

Je tiens également à remercier Monsieur M. BENDAHOU, chargé de cours à l'Université de Tlemcen pour m'avoir effectué les tests antimicrobiens.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur KADI, PDG d'ALZINC – GHAZAOUET et Mademoiselle W. RIFI, directeur de Laboratoire d'ALZINC, pour m'avoir effectué les analyses de la spectrométrie d'absorption atomique.

Je remercie également Madame L. CHERIF, professeur à l'Université de Tlemcen, Madame A. YACOUTA –NOUR, Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen, Monsieur H. ALLALI, Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen.

Je tiens également à remercier Monsieur D. BENDI ABDELLAH, pour l'aide qu'il m'a apporté pour la réalisation des analyses de CPG, IR et l'Analyse élémentaire.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur BENHAMOU, Monsieur M. BOUFATAH, Monsieur B. KHALDI et Mademoiselle N. BENARIBA.

Je remercie également toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé ou simplement discuté. Elles ont toutes leur place ici.

Je remercie également tous les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenus.

DEDICACES

A mes parents

A mon mari

A mes enfants : Yassine et Abderrahmane

A mon frère Amar et sa famille

A ma sœur Assya et son mari

A mon frère Sidi Mohamed et ma sœur Djamila

A toute la famille

ABREVIATIONS UTILISEES

A	:	<i>Alternaria</i>
A.E	:	Acétate d'éthyle
Af	:	<i>Aspergillus flavus</i>
An	:	<i>Aspergillus niger</i>
AmB	:	Amphotericine
ATB	:	Antibiotique
ATF	:	Antifongique
Ca	:	<i>Candida Albican</i>
CG	:	Chromatographie en phase gazeuse
CH ₂ Cl ₂	:	Dichlorométhane
COSY	:	Correlated Spectroscopy
DEPT	:	Distortionless Enhanced by Polarisation Transfert
EC	:	Econazole
Ec	:	<i>Escherichia coli</i>
ET	:	Elément trace
ETM	:	Elément trace métallique
F	:	Feuilles
FID	:	Flamme Ionization Detector
G	:	Grains
GT	:	Gentamicine
HE1	:	Huile essentielle de Ruta chalepensis de Beni Mester (Avril 2005)
HE2	:	Huile essentielle de Ruta chalepensis de Ouzidane (Avril 2005)
HMBC	:	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
I.R	:	Infra Rouge
Lm	:	<i>Listeria monocytogenus</i>
MeOH	:	Méthanol
Mw	:	Masse molaire
P	:	Degré de signification de test du student
Pa	:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Pip	:	Pipéracilline
R	:	Racine
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
RCS1F	:	Extrait des feuilles dans l'éther diéthylique
RCS1T	:	Extrait des tiges dans l'éther diéthylique
RCS1G	:	Extrait des grains dans l'éther diéthylique
RCS1R	:	Extrait des racines dans l'éther diéthylique
RCS2F	:	Extrait des feuilles dans l'éthanol
RCS2T	:	Extrait des tiges dans l'éthanol
RCS2G	:	Extrait des grains dans l'éthanol
RCS2R	:	Extrait des racines dans l'éthanol
RCS3F	:	Extrait des feuilles dans l'eau
RCS3T	:	Extrait des tiges dans l'eau
RCS3G	:	Extrait des grains dans l'eau
RCS3R	:	Extrait des racines dans l'eau
SAA	:	Spectroscopie Absorption Atomique
SM	:	Spectrométrie de Masse
St	:	<i>Staphylococcus aureus</i>
STZ	:	Streptozotocine
T	:	Tiges
U.V	:	Ultrat - Violet

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
--------------------	---

CHAPITRE I : PARTIE THEORIQUE

I. PRESENTATION DES PLANTES ETUDIEES.....	4
I.1. Présentation des Globulariacées.....	4
I.1.1. Introduction.....	4
I.1.2. Systématique des Globulariacées.....	4
I.1.3. Le genre <i>Globularia</i>	5
I.1.4. Synonymes.....	5
I.1.5. Etymologie	5
I.1.6. Description botanique et répartition géographique.....	5
I.1.7. Usage.....	7
I.2. Présentation des Rutacées.....	7
I.2.1. Introduction.....	7
I.2.2. Systématique des Rutacées.....	8
I.2.3. Le genre <i>Ruta</i>	8
I.2.4. Synonymes.....	9
I.2.5. Etymologie.....	9
I.2.6. Description botanique et répartition géographique.....	9
I.2.7. Usage.....	11
II. TRAVAUX SCIENTIFIQUES REALISES SE RAPPORTANT AUX DEUX PLANTES.....	11
II.1. Introduction.....	11
II.2. Mise au point des travaux publiés sur <i>Globularia alypum</i> L.....	12
II.2.1. Récapitulatif sur les travaux de type chimique et biologique réalisés sur <i>Globularia alypum</i> L.....	12
II.2.2. Récapitulatif sur les travaux de type biologique réalisés sur <i>Globularia alypum</i> L.....	12
II.3. Mise au point des travaux publiés sur <i>Ruta chalepensis</i> L.....	15
II.3.1 Récapitulatif sur les travaux de type chimique et biologique réalisés sur <i>Ruta chalepensis</i> L.....	15

II.3.2. Récapitulatif sur les composés majoritaires des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L.	15
II.3.3. Récapitulatif sur les travaux de type biologique réalisés sur <i>Ruta chalepensis</i> L.....	19
III. LE DIABETE ET LA PHYTOTHERAPIE.....	20
III.1. Introduction	20
III.2. Causes et évolution	20
III.3. Traitement	21
III.4. Complications.....	22
III.5. Prévention	22
III.6. Phytothérapie et diabète	22
IV. L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE ET LES PLANTES.....	24
IV.1. Introduction	25
IV.2. Principaux groupes de composés antimicrobiens des végétaux.....	25
IV.2.1. Les composés phénoliques et polyphénols.....	25
IV.2.1.1. Phénols simples des composés phénoliques.....	25
IV.2.1.2. Quinones.....	26
IV.2.1.3. Flavones, flavonoïdes, et flavonols.....	26
IV.2.1.4. Tanins.....	26
IV.2.1.5. Coumarines.....	27.
IV.3. Résistances bactériennes – infections nosocomiales.....	30
IV.3.1. Caractéristiques épidémiologiques	30
V. METAUX LOURDS DANS LES PLANTES - HYPERACCUMULATION DES PLANTES	33
V.I. Introduction	33

V.2. Les éléments nutritifs essentiels pour les plantes.....	33
V.3. Notion des métaux lourds ou élément traces métalliques (ETM)	34
V.4. Les métaux lourds dans le sol	34
V.4.1. Origine des métaux présents dans le sol.....	34
V.4.2. Localisation et devenir des métaux dans le sol.....	34
V.4.3. Risques liés à la présence de métaux dans le sol	35
V.5. Métaux lourds dans les plantes.....	35
V.6. Hyperaccumulation.....	37
V.7. Intérêt de l'hyperaccumulation – phytoremédiation – phytorestauration.....	39
VI. STRUCTURES DES MOLECULES.....	40

CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE

I. INTRODUCTION.....	53
II. MATERIEL VEGETAL	53
II.1. Origine Géographique et période de récolte.....	53
II.2. Identification botanique	53
II.3. Préparation des échantillons	53
III SOLVANTS, PRODUITS CHIMIQUES ET APPAREILS.....	54
III.1. Solvants et produits chimiques	54
III.2. Appareils utilisés.....	54
IV. TESTS PHYTOCHIMIQUES	55
IV.1. Produit végétal épuisé avec l'éther diéthylique.....	56
IV.2. Produit végétal épuisé avec l'éthanol.....	57
IV.3. Produit végétal épuisé avec de l'eau à chaud	59
IV.4. Réactifs de caractérisation.....	60

V. RECHERCHE DES COMPOSES CHIMIQUES DE <i>Globularia alypum</i> L.....	62
V.1. Extractions	62
V.2. Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles, des tiges, des grains et des racines de <i>Globularia alypum</i> L. et isolements du composés <u>3</u>	63
V.3. Isolements du composés <u>63</u>	64
V.4. Isolements du composés <u>64</u> à partir des feuilles.....	64
V.5. Isolements d'autres composés non identifiés.....	65
VI. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES DE <i>Ruta chalepensis</i> L.....	66
VII. TECHNIQUES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES.....	66
VIII. L'ETUDE DE L'EFFET ANTIDIABETIQUE DE LA GLOBULARINE ISOLEE DES FEUILLES DE <i>Globularia alypum</i> L. CHEZ DES RAT« WISTAR ».....	68
VIII.1. Animaux	68
VIII.2- Evaluation de la toxicité de la globularine chez les rats.....	68
VIII.3. Induction du diabète expérimental	69
VIII.4. Etude aiguë de l'activité antidiabétique de la globularine.....	69
VIII.5. Test de tolérance au glucose chez des rats normaux (TTG).....	69
VIII.6. Etude sub - chronique de l'activité antidiabétique de la globularine.....	70
IX. ETUDE DU POUVOIR ANTIMICROBIEN DE <i>Ruta chalepensis</i> L.....	72
IX.1. Provenance des germes	72
IX.2. Choix des antibiotiques et des antifongiques	72
IX. 3. Méthode utilisée.....	74
IX.4 Etude du pouvoir antimicrobien des extraits et des huiles essentielles issus de <i>Ruta chalepensis</i> L.....	74
IX.5. Détermination des intervalles des CMI par la méthode de contact direct	75
IX.6. Préparation des inoculums	76

X. TENEUR DES METAUX LOURDS	77
X.1- Spectrométrie d'absorption Atomique (SAA).....	77
X.2. Extraction des métaux lourds.....	80
X.2.1. Protocole expérimental de l'incinération	81
X.2.2. Préparation des différentes solutions par attaque acide.....	81
X.3. Dosage des solutions	81
X.3.1. Préparation des solutions étalons	82
X.4. Calcul de la concentration des métaux	84

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. TESTS PHYTOCHIMIQUES.....	85
I.1. <i>Globularia alypum</i> L.....	85
I.2. <i>Ruta chalepensis</i> L.	87
II. EXTRACTION -PURIFICATION	91
II.1. <i>Globularia alypum</i> L.	91
II.1.1. Rendements d'extractions	91
II.1.2. Caractéristiques des composés isolés	91
II.2. <i>Ruta chalepensis</i> L.	99
II.2.1. Détermination de la durée optimale d'extraction	100
II.2.2. Influence de certains paramètres sur le rendement, les propriétés physicochimiques et la composition chimique de l'huile essentielle	102
III. ACTIVITE BIOLOGIQUE	114
III.1. Activité antidiabétique.....	114
III.1.1. La toxicité de la globularine chez les rats	114

III.1.2. L'effet diabétogénique de la STZ.....	114
III.1.3. Evolution de la glycémie chez des rats normaux et diabétiques en 480 mn	115
III.1.4. Test de tolérance au glucose chez des rats normaux (TTG)	117
III.1.5. Evolution de la glycémie des rats diabétiques non à jeûne (traitement sub-chronique)	118
III.1.6. La glycémie à jeûne et l'effet du traitement sur la triglycéridémie et la cholestérolémie.....	119
III.2. Pouvoirs antibactériens et antifongiques des extraits et des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L (méthode des disques)	121
III.2.1. Effet des ATB, des extraits et des huiles essentielles	121
III.2.2. Effet des ATF, des extraits et des huiles essentielles.....	124
III.3. Pouvoirs antibactériens et antifongiques des extraits et des huiles essentielles de <i>Ruta chalepensis</i> L : la détermination de la CMI par la méthode de contact directe ...	127
IV. DOSAGE DES METAUX	131
IV.1. Pourcentage de la matière minérale.....	131
IV.2. Concentration des métaux lourds dans <i>Globularia alypum</i> L. et <i>Ruta chalepensis</i> L.....	131
CONCLUSION.....	144
Littérature citée	148
Annexe A	168
Annexe B.....	172
Annexe C.....	175
Annexe D.....	187
Annexe E	190
Annexe F.....	198
Communications et Publication	199

Introduction Générale

INTRODUCTION

Le gisement végétal est depuis longtemps une source généreuse pour le chimiste organicien. Il trouve des molécules nouvelles, utilisables directement ou pouvant servir de base à des réactions de synthèse chimique.

Les substances naturelles dont les plantes constituent la source principale, représentent près de 60% des médicaments, dont nous disposons. Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nés de la modification chimique de molécules ou parties de molécules naturelles prises comme « têtes de séries ». Depuis toujours, les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à leur richesse en métabolismes secondaires.

A l'heure actuelle, la recherche de nouveaux médicaments d'origine naturelle passe par l'inventaire des plantes et l'examen systématique de leur activité biologique. Un des guides du chimiste dans la problématique d'une recherche phytochimique est la recherche à l'empirisme et plus particulièrement aux usages traditionnels liés aux activités humaines.

La médecine traditionnelle revêt une importance capitale pour les pays en voie de développement. Pour des raisons les plus souvent économiques, 80% de la population mondiale se soigne par les plantes, sans que la nature chimique des principes actifs soit réellement élucidée.

Plus de 300 espèces sont utilisées dans la médecine traditionnelle algérienne. Cette flore, contrairement à celle du Maroc ou la Tunisie, n'a été que peu étudiée d'un point de vue phytochimique et pharmacologique, qui sont pourtant les étapes essentielles au développement d'une phytothérapie et aromathérapie modernes.

D'un autre côté, l'accroissement rapide de la population et l'exploitation des ressources, a fait prendre conscience à tous que les ressources de notre environnement ne sont pas inépuisables. La disparition de ces biens naturels étant irréversible, la nécessité de les

conserver est fondée tout à la fois sur un impératif écologique, une raison économique et une exigence éthique. Les plantes ont à lutter contre la sécheresse, la température, le vent et les animaux. Il s'est ainsi développé une stratégie de subsistance en développant leur système racinaire qui leur permet éventuellement d'extraire du sol les métaux lourds. L'hyperaccumulation des métaux lourds semble en fait, avoir une grande importance écologique. Elle influencerait notamment sur la résistance à la sécheresse. Les interactions avec les plantes adjacentes et la défense contre les herbivores et les bactéries pathogènes. C'est dans cette problématique que se place ce présent travail. En se basant sur les résultats d'enquêtes ethnopharmacologiques effectuées auprès de la population de la région de Tlemcen, deux plantes ont fait l'objet de notre étude.

La méthode globale de travail que nous avons adoptée, est basée sur une action pluridisciplinaire, visant une valorisation des plantes de la flore de la région de Tlemcen, utilisées en médecine traditionnelle et permettant de relier conformément les éléments d'information apportés par les ethnobotanistes, au travail des chimistes et des biologistes.

Les deux plantes que nous avons retenues sont deux dicotylédones. Il s'agit d'une Globulariaceae, *Globularia alypum* L. appelée localement « Ain Larnab », et d'une Rutaceae, *Ruta chalepensis* L. appelée localement « Fidjel ». Le choix de celles-ci a été guidé par les indications d'usage traditionnelle mais aussi par le fait que ces deux plantes appartiennent à des familles botaniques où l'on retrouve des groupes chimiques ayant des activités biologiques variées.

Globularia alypum est utilisée dans tout le Maghreb pour le traitement du diabète. Le décocté ou l'infusé des feuilles, possède une activité hypoglycémiant. L'identité de la substance active n'a jamais été élucidée.

Ruta chalepensis est une plante aromatique médicinale encore très utilisée en médecine traditionnelle de nombreux pays. Elle est largement exploitée pour ces huiles essentielles destinées pour la parfumerie et l'industrie agroalimentaire. L'huile essentielle de l'Algérie n'est pas étudiée et sa composition chimique reste inconnue.

La première partie de ce manuscrit rappelle les travaux déjà réalisés sur les deux plantes.

Dans la seconde partie, nous présenterons succinctement les outils et les techniques utilisés dans ce travail.

La troisième partie portera sur les travaux réalisés sur les deux plantes sélectionnées. Il nous a paru intéressant et nécessaire de combler le vide par :

- ◆ La détermination des différentes classes de familles chimiques par criblage phytochimique.
- ◆ L'isolation et l'identification des composés majoritaires dans les feuilles, fruits, tiges et racines de *Globularia alypum*.
- ◆ La mise en évidence de l'influence de plusieurs paramètres sur le rendement, les indices physicochimiques et la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Ruta chalepensis*.
- ◆ La détermination de l'activité hypoglycémiante du composé majoritaire de *Globularia alypum*.
- ◆ L'étude biologique de l'huile essentielle et les extraits des différentes parties de *Ruta chalepensis*. Vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries, levures et moisissures.
- ◆ L'évaluation du caractère d'accumulation par la détermination de la teneur des métaux lourds dans les différents organes de la plante.

CHAPITRE I

Partie Théorique

I. PRESENTATION DES PLANTES ETUDIEES

I.1. Présentation des Globulariacées

I.1.1. Introduction

La famille des Globulariacées (*Globulariaceae*) est une famille de plantes dicotylédones qui comprend 30 espèces réparties en 2 genres, *Globularia* avec environ 28 espèces et *Poskea* avec 2 espèces.¹⁻³

La famille est endémique de la région méditerranéenne au sens large avec des espèces en Macaronésie, à Socotra, en Somalie, dans le nord de l'Europe, les Alpes ainsi que dans le bassin méditerranéen. *Poskea* est endémique de Socotra et de Somalie.¹⁻⁵

Les Globulariacées sont des plantes herbacées ou arbustives vivaces aux feuilles simples alternes, entières lisses et sans stipules. Les fleurs sont en capitules, en panicules (*Globularia*) ou en épis (*Poskea*).

La classification phylogénétique inclut les plantes de cette famille dans celle de Plantaginacées et les situe dans l'ordre des lamiales.¹⁻³

Quelques espèces du genre *Globularia* sont parfois cultivées dans les jardins comme plantes ornementales de rocaille.^{2,3}

I.1.2. Systématique des Globulariacées

La composition chimique; en plus de la morphologie, l'anatomie et la cytogénétique ; est un outil majeur pour les botanistes qui procèdent à la classification des plantes. Elle repose essentiellement sur la forme et la structure du fruit, sur l'embryon qui est replié sur lui-même dans la graine, sur la forme des stigmates, sur la pilosité de la plante....

La systématique des Globulariacées selon Quezel et Santa⁵ :

Règne : Végétal

Sous-règne : Métaphytes

Embranchement : Cormophytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Série : Gamopétales superovariées tétracycliques

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Gamopétales

Ordre : Lamiales

Famille : Globulariaceae

I.1.3. Le genre *Globularia*

Genre : *Globularia*

Espèce : *Alypum*

Sous-espèces⁵ : *ssp. eu-alypum* L.

ssp. arabica Maire

I.1.4. Synonymes⁵⁻⁸

Globularia alypa St. Lag.

Globularia turbith Wilk

Globularia virgata Salisb

Nom en Français : Globulaire, Séné, Turbith, Herbe terrible, Petit globe, Marguerite bleue.

Nom en Anglais : Globe daisy.

Nom en Arabe : Tasselgha, Sana el-baladi, Ainoun.

Nom commun : Ain larnab, Chebra, Zerga, hallab rwa.

I.1.5. Etymologie

Globularia se rapporte à la forme globuleuse de l'inflorescence, de même que le terme *alypum* lequel en grec, désignait déjà une plante dont les fleurs étaient ainsi groupées.⁸

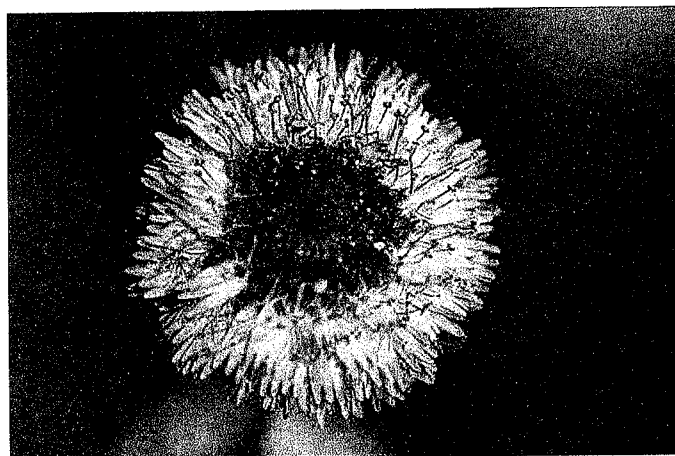
I.1.6. Description botanique et répartition géographique

C'est un arbrisseau vivace très rameux formant des buissons de 30 à 60 cm de hauteur, dans les lieux secs et arides du midi méditerranéen (figure 1). Les feuilles sont coriaces, glauques, de forme obovale, se terminant en une petite pointe. Les fleurs sont réunies en capitules denses à bractées ciliées, atteignant près de 2 cm de diamètre et disposées le long et au sommet des tiges. Le calice velu a 5 dents aiguës. La corolle bleue, bilabée et ayant la lèvre supérieure très courte et l'inférieure à 3 dents, possède 4 étamines à anthères d'un bleu violacé et 1 style. Le fruit caractéristique est akénien.⁶⁻⁸

Cette espèce ne s'élève pas sur les montagnes ; on la rencontre dans les forêts, en garrigues, dans les terrains rocailleux et particulièrement dans les endroits secs et arides du littoral méditerranéen, en France, en Espagne, en Grèce, en Asie Mineure, en Afrique du Nord; on la trouve aussi en Asie centrale et occidentale. Elle est très résistante à la sécheresse et elle tolère sans problème -12 à -15°C. Cette globulaire peut se cultiver en pot dans une



a) La partie aérienne (inflorescence hivernale)



b) La fleur

Figure 1 : *Globularia alypum* L.

terre substantielle mêlée de cailloux ; on la multiplie par boutures ; elle nécessite un faible arrosage.⁶

I.1.7. Usage

Globularia alypum est couramment employée en médecine traditionnelle algérienne, bien qu'on la suppose toxique à la longue. Des herboristes avisés ont préconisé durant la cure (qui doit être de durée limitée) un régime qui consiste à s'abstenir de consommer des aliments acides (citron ...), les piments forts et d'autres espèces piquantes. Au Maroc la plante est signalée comme dépurative, antiarthritique et purgative. En Tunisie, elle est utilisée contre les ulcères.⁷

Au Maroc et en Algérie, *Globularia alypum* (feuilles) est très utilisée en infusion et en décoction par les personnes diabétiques, pour diminuer le taux de glucose dans le sang.^{9,10}

Les pharmacopées traditionnelles méridionales utilisent ses feuilles en infusion pour leurs propriétés astringentes, laxatives (suivant la dose, elles peuvent devenir purgatives), stomachiques et sudorifique. Nos anciens mâchouillaient les tiges pour calmer les maux de dents. La globulaire entraine dans la composition d'une teinture réputée très efficace nommée « Eau de Jalap » ou « Eau de vie allemande ». ^{6,7}

I.2. Présentation des Rutacées

I.2.1. Introduction

La famille des Rutacées (*Rutaceae* : famille des agrumes) est une famille de plantes dicotylédones qui comprend 1600 espèces réparties en 160 genres. Les rutacées ont plus ou moins une distribution cosmopolite, mais sont concentrées sous les tropiques et dans les régions tempérées de l'hémisphère Sud, particulièrement en Australie et en Afrique du Sud.

D'un point de vue commercial, les agrumes sont cultivés dans les régions tropicales et tempérées chaudes à travers tout le globe, notamment en région méditerranéenne, dans le sud des Etats-Unis, au Mexique, en Afrique du Sud et en Australie.^{2,3,11}

Les rutacées sont une grande famille d'arbustes et d'arbres, avec quelques plantes herbacées. Il s'agit en général de plantes ligneuses, aux feuilles simples ou composées, sans stipules éparses ou opposées. Un de leurs caractères communs est la présence sur les feuilles de glandes oléifères qui apparaissent par transparence comme des points translucides. Toutes les parties de la plante possèdent en outre des tissus sécrétant des huiles essentielles à odeur

aromatique. Les fleurs, généralement régulières et hermaphrodites, sont formées par 4 ou 5 sépales imbriqués, libres ou non, et par 4 ou 5 pétales généralement libres.^{2,3}

Les rutacées ont une très grande valeur économique (les plantes fruitières : l'Oranger, le Pamplemoussier,etc.). De nombreux produits sont retirés des espèces de cette famille : essences, médicaments. Les essences sont en Général utilisées en parfumerie, dans les industries alimentaires et en médecine (Ruta, Galipea,.....etc.). Certaines espèces sont productrices de bois commerciaux. D'autres sont cultivées comme ornementales (Skimmia, Poncirus,....etc.).^{3,4}

I.2.2. Systématique des Rutacées

L'organographie et l'anatomie des plantes permettent de regrouper un nombre de caractères communs à plusieurs groupes de végétaux. Elles retiennent aussi quelques caractères originaux et différentiels. Le tout permet d'établir une classification appelée systématique.

La systématique des Rutacées selon Quezel et Santa⁵ :

Règne : Végétal

Sous-règne : Métaphytes

Embranchement : spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Série : Disciflores

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Dialypétales

Ordre : Rurales

Famille : Rutaceae

I.2.3. Le genre *Ruta*

Genre : *Ruta*

Espèce : *Chalepensis*

Sous-espèces⁵ : *ssp. angustifolia* (Pers.) P. Cout
ssp. latifolia (Salisb.) Lindb.

I.2.4. Synonymes^{5,12,13}

Ruta bracteosa DC.

Nom en Français : Rue, Rue d'Alep, Grande rue.

Nom en Anglais : Wine rue, Rue.

Nom en Arabe : Fidjel, Sadab.

Nom commun : Fidjel, Aourmi.

I.2.5. Etymologie

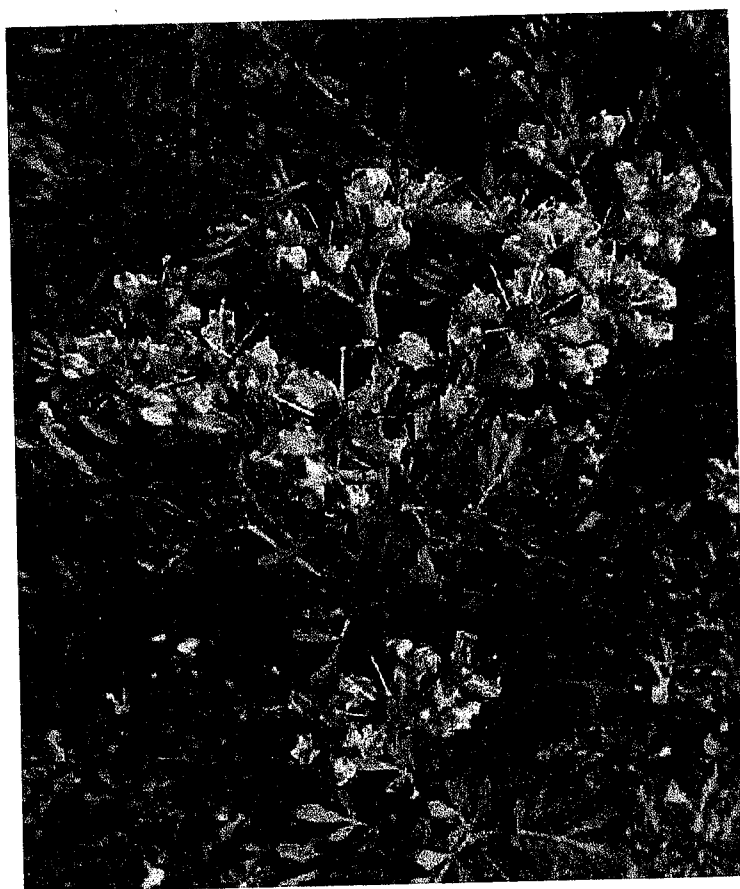
Le nom générique des Rutacées est ancien. Il dérive d'un mot grec signifiant « qui libère », il fait allusion aux propriétés médicinales de ces plantes qui avaient la réputation de « soulager » tant de maux.⁸

Chalepensis signifiant « d'Alep » (ville de Syrie), indique le lieu d'origine des spécimens ayant servi à identifier et classer cette espèce en premier lieu ou simplement l'abondance de celle-ci, dans la région.⁸

I.2.6. Description botanique et répartition géographique

C'est une plante aromatique, sauvage ou cultivée, vivace à tiges dressées, de taille moyenne (0.5 – 1 m), glauque, glanduleuse dans le haut (figure 2). Les feuilles sont alternes d'un vert souvent jaunâtre, découpées en segments de forme ovale, elliptique et elles sont finement glanduleuses. L'inflorescence est terminale. Les fleurs sont jaunes de plus de 1 cm de diamètre, à 4 sépales et à 4 pétales qui sont longuement frangés, entre lesquels s'étalent 8 étamines à anthères jaunes et 1 style. Le fruit caractéristique est capsulaire. La plante dégage une odeur forte et pénétrante, désagréable et fétide. La saveur est âcre et amère.^{5,6,13}

Cette espèce appartient aux régions méditerranéennes et les zones tempérées chaudes; on la rencontre dans les rocailles, pelouses et côteaux secs du littoral méditerranéen. On la trouve aussi en Europe Méridional, en Asie, en Eurasie, en Afrique du Nord et dans les Iles de Canaries. *Ruta chalepensis* est une plante héliophile, qui vit en plein soleil. Elle préfère des situations sèches, rocheuses et abritées. Elle est résistante aux gels, en tolérant jusqu'à -15°C. Elle croît dans des calcaireux, chauds, drainés, pierreux et perméables. Les sols argileux et compacts ne lui conviennent pas.^{3-5,8,12,14}



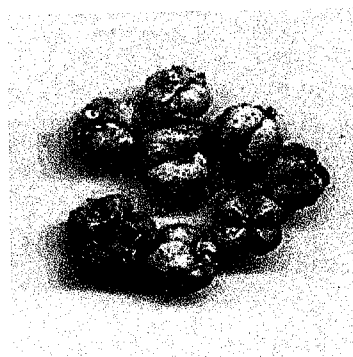
a) Partie aérienne (pleine floraison : Février – Juin)



b) Fleurs



c) Feuilles



d) Fruits

Figure 2 : *Ruta chalepensis* L.

I.2.7. Usage

Ruta chalepensis est une plante médicinale encore utilisée dans la médecine traditionnelle de nombreux pays comme laxatif, anti-inflammatoire, analgésique, antispasmodique, abortif, antiépileptique, emmenagogue et pour le traitement de pathologies cutanées.¹⁵

Le décocté des feuilles est utilisé dans la destruction des ascarides. Les lavements de *Ruta chalepensis* sont par ailleurs stimulants dans l'atonie intestinale, la flatulence. La médecine populaire emploie la drogue comme topique et résolutif dans le catarrhe pulmonaire, les engorgements, les tumeurs indolentes. Elle est également antiseptique et elle combat l'hypertension. Certains font grand cas de son efficacité dans l'asthénopie, la fatigue musculaire des yeux, la conjonctivite, la blépharite et dans les lésions tissulaires, surtout osseuses. En médecine vétérinaire, la plante y est utilisée dans les parts laborieux et surtout dans la rétention du délivre.¹²

Les feuilles de *Ruta chalepensis*, employées avec modération, donnent un goût musqué aux aliments et à des alcools. La feuille séchée est un insecticide puissant et un germicide utile pour les blessures. L'essence s'utilise en parfumerie.¹⁶

II. TRAVAUX SCIENTIFIQUES REALISES SE RAPPORTANT AUX DEUX PLANTES

II.1. Introduction

Dans le monde végétal, toute espèce produit des métabolites primaires (protéines, acides aminés et dérivés, lipides et carbohydrates) et d'autres substances différentes et dispersées qui ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante : ce sont les métabolites secondaires (composés phénoliques, terpéniques, azotés et / ou soufrés...).

Depuis toujours les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse de ce qu'on appelle le métabolisme secondaire. Celui-ci produit des molécules variées permettant aux plantes de contrôler leur environnement animal et végétal. Parmi les milliers de molécules produites par le métabolisme, l'Homme sélectionne celles qui lui permettent de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants pathogènes (champignons, bactéries, virus...) et de corriger ses troubles métaboliques.¹⁷ Les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, c'est pour cette raison que le patrimoine végétal doit être absolument préservé dans sa diversité et dans son étendue.

L'observation liée à l'expérience et à la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade.¹⁸

Quelques travaux chimiques et / ou biologiques ont été réalisés sur les deux plantes : *Globularia alypum* L. et *Ruta chalepensis* L., en faisant intervenir divers techniques physicochimiques :

- Concernant *Globularia alypum*, ces travaux ont été effectués surtout sur les feuilles et rarement sur la partie aérienne de la plante. Ce qui a permis d'identifier un certain nombre de molécules et de déterminer quelques activités biologiques.
- L'étude de *Ruta chalepensis*, a concerné les différentes parties de la plante (feuilles, partie aérienne et racines). Certains travaux ont conduit à l'identification de quelques molécules et à la détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de la partie aérienne de la plante provenant de différents pays. D'autres travaux ont concerné la détermination de quelques activités biologiques.

II.2. Mise au point des travaux publiés sur *Globularia alypum* L.

II.2.1. Récapitulatif sur les travaux de type chimique et biologique réalisés sur *Globularia alypum* L.

Nous reporterons ci-après, sous forme de tableau (tableau 1), les molécules identifiées, les activités biologiques qui leur ont été reconnues. Les principales formules moléculaires seront représentées par la suite. Seules figurent dans ce document les formules des molécules possédant un numéro.

II.2.2. Récapitulatif sur les travaux de type biologique réalisés sur *Globularia alypum* L.

D'autres études biologiques réalisées sur *Globularia alypum* ont montré que l'extrait aqueux des feuilles possède une activité antileucémique³², une activité immunosuppressive³³ et un effet hypoglycémiant significatif.^{34,35}

Certains travaux ont été effectués sur le pouvoir antioxydant, les résultats obtenus ont suggéré que *Globularia alypum* pourrait être une source potentielle des antioxydants.³⁶⁻³⁸

Néanmoins, il serait souhaitable que cette plante soit consommée avec prudence car il y a risque de toxicité.^{39,40}

Tableau 1 : Récapitulatif sur les travaux de type chimique et biologique réalisés sur *Globularia atypum* L.

Molécule	Formule	Activité biologique	Références
Acide cinnamique	<u>1</u>	-	19
Hydrocarbure saturé nc ₃₀	<u>2</u>	-	20
Alcool cérylique		-	20
Globularine	<u>3</u>	Pouvoir antioxydant modéré	21, 22, 24, 25, 28, 30, 31
Catalpol	<u>4</u>	-	21, 22, 25
Globularidine	<u>5</u>	Pouvoir antioxydant faible	23, 24, 25, 30, 31
Globularimine	<u>6</u>	Pouvoir antioxydant faible	24, 25, 30, 31
Globularinine	<u>7</u>	Pouvoir antioxydant faible	24, 25, 30, 31
Globularisine	<u>8</u>	Pouvoir antioxydant modéré	25, 30, 31
Liriodendrine	<u>9</u>	-	25
Syringine	<u>10</u>	Pouvoir antioxydant faible	25, 29, 31
Acide protocatéchique	<u>11</u>	-	26
Acide p-hydroxybenzoïque	<u>12</u>	-	26
Acide syringique	<u>13</u>	-	26
Acide vanillique	<u>14</u>	-	26
Acide β-résorcylique	<u>15</u>	-	26
Acide salicylique	<u>16</u>		
Acide caféique	<u>17</u>		

Acide sinapique	<u>18</u>	-	26
Acide p-coumarique	<u>19</u>	-	26
Acide férulique	<u>20</u>	-	26
4',7'-dihydroxyflavone	<u>21</u>	-	27
Apigénine-7-glucoside	<u>22</u>	-	27
Quercétol	<u>23</u>	-	27
Lutéoline-7-glucoside	<u>24</u>	-	27
Bayine	<u>25</u>	-	27
Rutine	<u>26</u>	-	27
Cyanidine	<u>27</u>	-	27
Paeonidine	<u>28</u>	-	27
6-hydroxylutéolin 7-O-laminaribioside	<u>29</u>	Pouvoir antioxydant fort	29
Eriodictyol 7-O-sophoroside	<u>30</u>	Pouvoir antioxydant fort	29
6'-O-coumaroyl-1'-O-[2-(3,4-dihydroxyphényl)éthyle]-β-D-glucoopyranoside	<u>31</u>	Pouvoir antioxydant fort	29
6-hydroxylutéolin 7-O-β-D-glucoopyranoside	<u>32</u>	Pouvoir antioxydant fort	29, 31
Lutéolin 7-O-sophoroside	<u>33</u>	Pouvoir antioxydant fort	29, 31
Actéoside	<u>34</u>	Pouvoir antioxydant fort	29, 31
Isoactéoside	<u>35</u>	Pouvoir antioxydant fort	29, 31
Forsythiaside	<u>36</u>	Pouvoir antioxydant fort	29, 31
Globularioside	<u>37</u>	Pouvoir antioxydant faible	30, 31

II.3. Mise au point des travaux publiés sur *Ruta chalepensis* L.

II.3.1 Récapitulatif sur les travaux de type chimique et biologique réalisés sur *Ruta chalepensis* L.

Une synthèse bibliographique a été effectuée sur les différentes molécules isolées de *Ruta chalepensis* et sur les activités biologiques qui leur ont été reconnues. Les résultats obtenus seront représentés dans le tableau 2. Les principales formules moléculaires seront représentées par la suite.

II.3.2. Récapitulatif sur les composés majoritaires des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L.

Les huiles essentielles sont connues sous le nom d'essences végétales. Elles sont des substances volatiles, odorantes, incolores ou légèrement teintées, inflammables et s'altérant facilement à l'air.

Les huiles essentielles se rencontrent dans tout le règne végétal. Cependant elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles : Conifères, Rutacées, Ombellifères, Myrtacées.... Tous les organes peuvent en renfermer (racines, tiges, feuilles, fleurs et graines).⁵⁷⁻⁶⁰

Les huiles essentielles des plantes sont très recherchées, car elles sont généralement dotées de propriétés biologiques intéressantes. Certaines ont des propriétés pharmaceutiques reconnues, d'autres sont utilisées comme bases de parfums ou comme additifs alimentaires.

Ces huiles essentielles sont souvent étudiées pour leurs propriétés fongicides, bactéricides, insecticides....

L'odeur d'une plante est en général liée à la composition chimique de ses huiles essentielles.⁶¹⁻⁶⁴

Les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence. Pas d'usage interne, sauf s'il est prescrit par quelqu'un de qualifier.¹⁶

De nombreux facteurs peuvent influencer la teneur en huile essentielle d'une plante et par conséquent sa composition chimique. Cela explique donc la multiplicité et la grande variabilité des huiles essentielles.⁶⁵ Parmi tous ces facteurs, nous citons les plus importants :

- **Origine botanique** : La composition d'une huile essentielle est fonction de l'espèce productrice. En effet, l'extraction de l'huile d'un même organe de deux plantes différentes ne donne pas la même composition chimique.⁶⁶

- **Origine géographique** : Une même plante suivant son biotope donne des chémotypes différents. A titre d'exemple, les fleurs d'un même arbuste, le *Canangium odoratum*, fournissent deux huiles essentielles très différentes suivant son aire géographique.⁶⁷
- **Partie de la plante** : La composition et le rendement d'une huile essentielle varient selon la partie de la plante à partir de laquelle elle est extraite.⁶⁷
- **Cycle végétatif** : Pour une espèce donnée, d'importantes variations peuvent se produire au cours du cycle notamment le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle.⁶⁷
- **Conservation** : La conservation concerne la plante avant de subir l'extraction et également l'huile essentielle.
- ◆ **Conservation des plantes** : Lors de leur conservation, les plantes doivent être séchées à l'air et à l'ombre pendant une période n'excédant pas sept jours. En effet, des modifications physiques et biochimiques dues à l'action de l'air, du soleil et de l'échauffement peuvent influencer sur la qualité de l'huile essentielle.⁶⁸
- ◆ **Conservation des huiles** : La composition chimique des huiles essentielles varie durant leur conservation sous l'action de la lumière et de la température; d'où la nécessité de les conserver dans des flacons opaques, bien scellés et à température appropriée.⁶⁹
- **Facteurs de l'environnement** : Les facteurs écologiques, édaphiques, géographiques ainsi que les conditions climatiques ou parasitismes du végétal ont une influence considérable sur la production de l'huile essentielle.^{68,70}
- **Procédés d'obtention** : Le mode d'extraction peut avoir une influence sur la teneur et la composition chimique d'une huile essentielle en raison de réactions de réarrangements, d'isomérisation et d'oxydation.⁷¹

Les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* de différents pays, ont été extraites et analysées. Dans le tableau 3, nous donnons ainsi les composés majoritaires des huiles essentielles.⁷²⁻⁷⁹

Tableau 2 : Récapitulatif sur les travaux de type chimique et biologique réalisés sur *Ruta chalepensis* L.

Molécule	Formule	Activité biologique	Références
Rutine	<u>26</u>	-	41, 43
Chalepensin	<u>38</u>	Inhibe les agrégations plaquettaires	42, 45, 47, 51, 52, 56
Chalepin		Activité antimicrobienne modérée	42, 47, 50, 52, 54
Acétate de chalepin		-	42
Aborinine	<u>39</u>	N'inhibe pas les agrégations plaquettaires	44, 45, 51, 56
Dictamine	<u>40</u>	Pas d'activité antitumorale, inhibe les agrégations plaquettaires	44, 45, 55, 56
γ -fogarine		-	44, 45, 51
Graveoline	<u>41</u>	Possède une activité antitumorale, n'inhibe pas les agrégations plaquettaires	44, 45, 51, 56
Kokusagine	<u>42</u>	Possède une activité antitumorale, n'inhibe pas les agrégations plaquettaires	44, 45, 51, 56
Skimmianine	<u>43</u>	Pas d'activité antitumorale, inhibe les agrégations plaquettaires	44, 45, 51, 52, 54, 56
Bergapten	<u>44</u>	Activité antimicrobienne modérée	45, 50, 51, 52, 54, 55
Byakangelicin		-	45
Heliettine		-	45
Isopimpinellin	<u>45</u>	Activité antimicrobienne modérée, Possède une activité antitumorale	45, 51, 54, 55, 56
Psoralen	<u>46</u>	Inhibe les agrégations plaquettaires	45, 50, 55, 56

Rutamarin	<u>47</u>	Activité antimicrobienne modérée, n' inhibe pas les agrégations plaquettaires	45, 50, 54, 56
Xanthyletin		-	45
Xanthotoxin	<u>48</u>	N' inhibe pas les agrégations plaquettaires	45, 50, 51, 55, 56
Ribalinidine		-	45
Rutacidone		-	45
Isoimperatorin	<u>49</u>	N' inhibe pas les agrégations plaquettaires	46, 56
Taifine		-	48
Isotaifine	<u>50</u>	-	48
8-methoxytaifine	<u>51</u>	-	49
Marmesin		-	50
3'hydroxygraveoline		-	51
Chaloridone	<u>52</u>	-	52
Rutalpinin	<u>53</u>	-	52
Chalepimoskachan	<u>54</u>	Inactive	52
2-{6'-(2H-benzo[d]1", 3"- dioxolen-5"-yl) hexyl}- hydroquinolin-4-one	<u>55</u>	Ne possède pas d'activité antimicrobienne	53, 54
2-{6'-(2H-benzo[d]1", 3"- dioxolen-5"-yl) hexyl}-4-methoxy-quinoline	<u>56</u>	Ne possède pas d'activité antimicrobienne	54

Tableau 3 : Récapitulatif sur les composés majoritaires des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L. de différents pays.

Composé majoritaire	Formule	référence
2-nonanone	<u>57</u>	72, 75, 77, 78, 79
2-nonyl acétate	<u>58</u>	72, 76, 78, 79
2-undécanone	<u>59</u>	72, 73, 75, 78, 79
Elémol		73
β -eudesmol	<u>60</u>	73
Chalepensin	<u>38</u>	73
β -phéllandrine		76
Nonyl acétate	<u>61</u>	77
2-tridécanone	<u>62</u>	73

II.3.3. Récapitulatif sur les travaux de type biologique réalisés sur *Ruta chalepensis* L.

Des investigations pharmacologiques ont montré que l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *Ruta chalepensis* possède des activités anti-inflammatoire, antipyrétique, anti-rhumatique.^{13, 80-82}

Les extraits au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle de la partie aérienne de la plante, possèdent une forte activité molluscide contre *Bulinus truncatus*.⁸³

Des tests d'activité antibactérienne ont été réalisés sur des microorganismes pathogènes des humains : *Bacillus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Salmonella infantis*. Ces tests ont été effectués en utilisant des extraits de *Ruta chalepensis* provenant de l'Asie^{84, 85} et le Mexique.⁸⁶ Aucun des extraits testés n'a montré une activité antibactérienne.

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* du Maroc a été mesurée contre *Penicillium digitalum*, *Phytophthora citrophthora*, *Geotrichum citri - aurantii* et *Botrytis cinerea*, en utilisant la méthode de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Il a été constaté que pour 250 mg d'huile essentielle par ml de solution, *Ruta chalepensis* possède une activité antifongique modérée.⁸⁷

Une étude portant sur la toxicité de la plante a montré que l'infusé des feuilles pris à forte dose sur une durée prolongée, a provoqué certaines toxicités chez les souris.⁸⁸

III. LE DIABETE ET LA PHYTOTHERAPIE

III.1. Introduction

Le mot diabète vient de « diabaïnein » mot grec qui signifie passer à travers. Dans le cas du diabète sucré, le plus fréquent, c'est le sucre qui passe à travers les reins, et se trouve dans les urines.

Le diabète sucré, maladie chronique provoquée par un trouble du métabolisme des glucides et caractérisée par un taux anormalement élevé de sucre dans le sang et les urines. On estime les diabétiques à plus de 100 millions dans le monde et ce chiffre, ainsi que le pourcentage de la population touchée, sont en progression constante (aux alentours de 6% dans les pays riches). Sa fréquence continue de croître dans le monde, parallèlement au vieillissement des populations et des conditions de vie liées à l'alimentation très riche en graisses et en glucose et à la sédentarité. Le diabète sucré peut endommager gravement les yeux, les reins, le cœur, les membres, et représente un risque en cas de grossesse.⁸⁹⁻⁹¹

On distingue généralement deux types de diabète sucré. Le type I ou diabète insulino-dépendant (DID), qui portait autrefois le nom de diabète juvénile. Il touche surtout les enfants et les adolescents et ferait partie des maladies auto-immunes. Il représente de 10 à 15% des cas de diabète et son évolution est très rapide. Le type II, ou diabète non insulino-dépendant (DNID), également appelé diabète gras, se rencontre généralement chez des personnes de plus de quarante ans et son évolution est lente. On n'observe très souvent aucun symptôme clinique et seul des taux de glucose élevés dans le sang et les urines permettent de détecter la maladie.⁸⁹⁻⁹¹

III.2. Causes et évolution

Le diabète est considéré comme un trouble dont les origines sont multiples. Chez un sujet sain, le pancréas sécrète une hormone, l'insuline, qui facilite la pénétration du glucose dans les tissus. Chez le diabétique, la pénétration du glucose ne s'effectue pas correctement, soit parce que la quantité d'insuline est insuffisante, soit parce que les récepteurs cellulaires du glucose ne sont pas efficaces. Le sucre s'accumule donc dans le sang et est évacué dans les urines. Le diabète de type I est presque toujours dû à une diminution très importante ou à l'arrêt de la production d'insuline. Dans le second type, le pancréas produit une quantité considérable d'insuline, qui ne suffit cependant pas à satisfaire les besoins de l'organisme, car les tissus sont résistants à l'action de cette hormone. Dans certains cas, cette résistance est due

à une obésité ancienne : une glycémie élevée inactive les composants tissulaires cibles de l'insuline.⁸⁹⁻⁹¹

En l'absence de traitement, le diabète de type I peut être rapidement fatal. Il s'accompagne d'une sensation de soif intense, d'une perte de poids et d'une fatigue importante. Le glucose tissulaire ne fournissant pas suffisamment d'énergie à l'organisme, celui-ci commence à utiliser les graisses. Ce phénomène contribue à faire augmenter le taux de cétones dans le sang et l'augmentation de l'acidité sanguine affecte la respiration. Avant la découverte du traitement à base d'insuline dans les années vingt, les patients mouraient généralement d'un coma diabétique. Dans les deux types de diabète, la persistance d'une glycémie élevée peut entraîner des troubles dont les conséquences sont difficiles à maîtriser.

En cas de grossesse, un diabète non traité augmente le risque de mortalité du fœtus ou d'anomalie congénitale. En l'absence de traitement, la longévité d'une personne diabétique est réduite d'un tiers.⁸⁹⁻⁹¹

En l'absence de tout symptôme, le dépistage du diabète de type II s'effectue par la détermination du taux de glucose dans l'urine. Lorsque ce taux est élevé, la glycémie à jeun est déterminée, puis le sujet subit un test de tolérance au glucose au cours duquel on détermine la glycémie après absorption d'une grande quantité de sucre.⁸⁹⁻⁹¹

III.3. Traitement

Le traitement vise à maintenir une glycémie normale. Les personnes diabétiques peuvent ainsi mener une vie normale et échapper aux éventuelles complications à long terme.

Dans les cas où la production d'insuline est faible ou nulle, le traitement consiste à injecter de l'insuline et à suivre un régime alimentaire adapté. Il faut alors prendre des repas et des collations tout au long de la journée afin de ne pas « noyer » l'apport d'insuline et consommer des aliments contenant des polysaccharides (qui augmentent la glycémie plus lentement) plutôt que des sucres simples comme le saccharose, le fructose et le lactose, petites molécules rapidement disponibles pour l'organisme, qui augmentent rapidement la glycémie.

Dans les cas de diabète de type II, dont la majorité des malades accusent au moins un excès de poids modéré, le traitement consiste essentiellement à suivre un régime alimentaire, à perdre du poids et à faire du sport. La perte de poids semble en partie diminuer la résistance tissulaire à l'insuline. Si la glycémie demeure élevée, le traitement peut également comporter des injections d'insuline ou la prescription de médicaments hypoglycémifiants ou

antidiabétiques comme les biguanides et les sulfamides hypoglycémiantes permettant d'abaisser le taux de sucre.⁸⁹⁻⁹¹

Certains patients diabétiques sont munis d'une pompe à insuline qui distribue des quantités d'insuline appropriées aux besoins de l'organisme. Ces pompes permettent un meilleur contrôle de la glycémie, mais on observe parfois des complications sérieuses comme une cétoacidose ou une infection au niveau du site d'injection.⁸⁹⁻⁹¹

III.4. Complications

Le diabète est responsable de nombreuses complications. Le diabète est responsable de rétinopathies et représente la première cause de cécité avant 50 ans. Il peut engendrer des atteintes des artères (artériopathie) et des nerfs (neuropathie) des membres inférieurs, cause d'une mauvaise irrigation et de problèmes de podologie. Ceux-ci peuvent être corrigés par le port de semelles thermomoulées. Certaines nécroses conduisent à des amputations d'orteil, de pied, ou de jambe.⁸⁹⁻⁹¹

III.5. Prévention

La prévention du diabète comprend la prévention primaire qui consiste à empêcher la survenue de la maladie chez les sujets sains, et la prévention secondaire destinée aux diabétiques et visant à retarder ou à éviter l'aggravation de la maladie et ses complications.

Dans tous les cas, une activité physique favorise un équilibre glycémique stable et prévient les complications cardio-vasculaires. La perte de poids chez les sujets en surcharge pondérale permet d'améliorer la glycémie. Ceci rend nécessaire un régime hypocalorique avec diminution des apports en glucides et en lipides mais plutôt riche en fibres.⁸⁹⁻⁹¹

III.6. Phytothérapie et diabète

Le diabète est une maladie ancienne dont les symptômes classiques : faim et soif importante avec augmentation du volume d'urine, maigreur ou au contraire obésité, risque de coma, sont bien connus par la majorité des guérisseurs ou tradipraticiens; de nombreuses plantes sont considérées traditionnellement comme antidiabétiques certaines sont à l'origine de la mise au point de médicaments exemple : le biguanide metformine grâce au *Gallega officinalis*.

Devant l'augmentation considérable du nombre de diabétiques dans les pays dont le « niveau de vie » s'améliore (exemple Inde, Chine, sud-est asiatique, pourtour méditerranéen),

de nombreux chercheurs ont évalué l'action pharmacologique de ces plantes traditionnelles et donc leur intérêt en médecine quotidienne dans ces pays où les médicaments synthétiques sont malgré tout assez chers et où la tradition de médecine par les plantes est bien ancrée dans les mœurs. Au Maroc, une enquête dans un groupe de diabétique (type 2) révèle que 25% n'utilisent que des plantes pour se soigner.⁹¹

Nous donnons dans les tableaux 4 et 5, quelques résultats de deux enquêtes ethnopharmacologiques faites auprès des diabétiques de l'Est du Maroc et de l'Ouest algérien (Tlemcen) respectivement.^{9,10}

Tableau 4: Résultats de l'enquête* ethnopharmacologique faite au Maroc (Est du Maroc).

Plante	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	<i>Artémisia herba alba asso</i>	<i>Globularia alypum</i>	<i>Allium sativum</i>	<i>Tétracelinis articulata</i>	<i>Citrullus colocynthis</i>	<i>Origanum compactum</i>
Nombre de cas	83 D-H	66 D-H	62 D	45 D-H	34 D-H	33 D	28 D-H

* Enquête faite sur 360 femmes et 256 hommes atteints du diabète et l'hypertension.

D : Diabète

H : Hypertension

Tableau 5 : Résultats de l'enquête ethnopharmacologique faite en Algérie (Tlemcen).**

Plante	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	<i>Citrullus colocynthis</i>	<i>Berberis vulgaris</i>	<i>Origanum compactum</i>	<i>Lavandula stoechas</i>	<i>Globularia alypum</i>	<i>Stipatena cissima</i>
Nombre de cas	124	107	82	57	55	53	43

** Enquête faite sur 621 diabétiques.

Dans les pays « riches » où le traitement du diabète (insuline- médicaments) est d'un accès facile, il est apparu intéressant d'utiliser la phytothérapie seule ou en complément pour diminuer la dose de médicaments synthétiques mais aussi parce que certains phytomédicaments semblent en même temps capables de lutter contre les complications du diabète (sclérose des vaisseaux sanguins, dépôt athéromateux, artérites et artériolites, hypertension, infections).⁹¹

Deux types de substances végétales semblent intéressantes :

- ◆ celles qui agissent à la manière de l'insuline ou des autres médicaments hypoglycémiantes :
 - ♣ en empêchant l'absorption du glucose au niveau intestinal;
 - ♣ en augmentant la synthèse et la libération de l'insuline pancréatique;
 - ♣ en diminuant celle du glucagon;
 - ♣ en accélérant la consommation du glucose sanguin (absorption dans les cellules, synthèse du glycogène, des graisses ou des protéines).
- ◆ D'autres principalement des tanins, qui agissent sur le diabète lui-même au niveau cellulaire en favorisant l'action de l'insuline (en diminuant la résistance à l'insuline) et sur les complications du diabète par leur pouvoir antioxydant et antienzymatique, en neutralisant l'effet des radicaux libres et limitant la réaction inflammatoire dans différents tissus.

Certains extraits de plantes contiennent parfois ces deux types de substances.⁹¹

D'autres familles de produits naturels peuvent être responsables de l'activité hypoglycémiant, telles que les alcaloïdes, les carbohydrates, les coumarines, les flavonoides, les glycosides cyanogéniques, les irridoides, les lipides, les peptides, les phénolsetc.⁹²

IV. L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE ET LES PLANTES

IV.1. Introduction

En biologie, les substances antimicrobiennes préviennent ou combattent l'infection microbienne. Les substances antifongiques détruisent les champignons. En pharmacologie, elles permettent de lutter contre les infections par les champignons. Les substances dotées d'une activité antibactérienne préviennent ou combattent les bactéries et l'infection qui en résulte.⁹³

D'une façon générale, les antimicrobiennes sont des substances capables de tuer les microorganismes ou d'en bloquer la croissance. Les microorganismes sont des organismes unicellulaires comme les bactéries, les champignons et les virus, qu'on trouve virtuellement partout, dans le sol, dans l'air, dans l'eau et dans le corps humain. Certains peuvent engendrer des maladies mais la plupart sont bénéfiques et facilitent diverses fonctions. Les bactéries et

les champignons présents dans le sol, par exemple, peuvent sécréter des produits métaboliques pour inhiber la croissance d'autres microbes dans le sol. En raison de cette aptitude unique, les agents antimicrobiens s'avèrent indispensables au contrôle des maladies infectieuses provoquées par une panoplie des microorganismes pathogènes.⁹⁴

IV.2. Principaux groupes de composés antimicrobiens des végétaux

L'activité antimicrobienne est souvent considérée comme caractéristique des huiles essentielles.⁹⁵ Plusieurs études ont été réalisées sur les plantes pour déterminer en général, les propriétés médicinales et en particulier les propriétés antimicrobiennes. Récemment, Chen et *al.* ont isolé une quinoline alcaloïdique qui manifeste une activité antimicrobienne considérable.⁹⁶⁻⁹⁸ Des antimicrobiens phytochimiques peuvent être divisés en plusieurs catégories, décrites ci-dessous et récapitulées dans le tableau 6.

IV.2.1. Les composés phénoliques et polyphénols

IV.2.1.1. Phénols simples des composés phénoliques

Dans l'ensemble, les phénols sont bactéricides vis-à-vis des bactéries Gram (+) et Gram (-), parfois des mycobactéries, et non vis-à-vis des spores bactériennes.

L'activité augmente avec la longueur des chaînes substituantes en para (sur le C₄) jusqu'à 6 atomes de carbone mais diminue par la suite en relation inverse avec la solubilité dans l'eau.

L'acide caféique composé des terpénoïdes et isolé d' 'estragon' et du 'thym', est efficace contre les virus,⁹⁹ les bactéries,^{100,101} et les mycètes.¹⁰²

Le catéchol, un phénol simple est actif contre les virus, les bactéries et les mycètes. Le pyrogallol s'est avéré également toxique aux micro-organismes.¹⁰³

Par ailleurs, quelques auteurs ont constaté que les phénols comportant plusieurs groupements OH, sont les plus inhibiteurs.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ D'autres composés phénoliques possédant une chaîne C₃ latérale à un niveau plus bas d'oxydation et ne contenant aucun oxygène, sont classés en tant qu'huiles essentielles et sont souvent cités comme antimicrobiens. L'eugénol

est un représentant bien caractérisé trouvé en huile de clou de girofle et est considéré bactériostatique contre les mycètes¹⁰² et les bactéries.¹⁰¹

IV.2.1.2. Quinones

Les quinones sont reconnues par leurs effets antimicrobiens.¹⁰⁷ Kazmi et al.¹⁰⁸ ont décrit une anthraquinone d' *Itatica de casse* (arbre pakistanais) qui est,

- bactériostatique contre le *Pseudodiphthericum de bacille anthracite*, de *Corynebactérie*, et de *Pseudomonas aeruginosa* et,
- bactéricide contre des *Pseudomalliae de pseudomonas*.

Récemment, l' hypericin, une anthraquinone a suscité beaucoup d'attention dans l'importante utilisation populaire en tant qu'antidépresseur. En 1985, des études ont montré ses propriétés antimicrobiennes.¹⁰⁹

IV.2.1.3. Flavones, flavonoïdes, et flavonols

Les flavonoïdes sont reconnus comme étant synthétisées par des plantes en réponse à l'infection microbienne.¹¹⁰ Il ne devrait pas être étonnant si elles se sont avérées *in vitro* des substances antimicrobiennes efficaces contre une grande sélection de micro-organismes.

Des flavonoïdes plus lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes.¹¹¹ La catéchine, la forme la plus réduite de l'unité C₃ dans des composés de flavonoïdes, se trouve dans le thé vert d'Oolong et exerce une activité antimicrobienne¹¹² contre *Vibrio choléra* O1,¹¹³ *Streptococcus* mutant,^{114, 115} *Shigella*,¹¹⁶ d'autres bactéries et micro-organismes.

IV.2.1.4. Tanins

Les tanins empêchent la croissance d'insectes¹¹⁷ et perturbent des événements digestifs chez les animaux ruminants.¹¹⁸ Scalbert¹¹⁹ a passé en revue les propriétés antimicrobiennes des tanins en 1991. Il a énuméré 33 études qui avaient documenté les activités inhibitrices des tanins. Selon ces études, les tanins peuvent être toxiques aux mycètes, aux levures, et aux bactéries filamenteuses.

Les tanins condensés ont été déterminés pour lier des murs de cellules des bactéries ruminales, empêchant la croissance et l'activité de protéases.¹²⁰ Bien que ce soit encore spéculatif, des tanins sont considérés au moins partiellement responsables de l'activité antibiotique des extraits méthanoliques de l'écorce de *Terminalia alata* trouvée au Népal.¹²¹ Cette activité a été augmentée par l'activation de lumière UV (320 à 400 nm à 5 W/m² pour 2 heures).

Par ailleurs, deux études ont montré que les tanins sont des inhibiteurs aux transcriptases inversés viraux.^{122, 123}

IV.2.1.5. Coumarines.

En date de 1996, au moins 1.300 coumarines ont été identifiées.¹²⁴ Leur renommée provient principalement de leurs activités antithrombiques, anti-inflammatoires et vasodilatatoires.^{125, 126}

Warfarin une coumarine particulièrement bien connue, est employée comme anticoagulant oral et comme rodenticide.¹²⁷ Cette dernière peut également avoir des effets antiviraux. D'autres coumarines ayant les propriétés antimicrobiennes, ont été employées pour empêcher la récurrence des blessures froides provoquées par HSV-1 chez l'homme.¹²⁸ En revanche, elles ont été trouvées inefficaces contre la lèpre.¹²⁹

Les acides hydroxycinnamiques liés aux coumarines, semblent être inhibiteurs aux bactéries Gram (+).¹⁰⁵ En outre, des phytoalexines, qui sont les dérivés hydroxylés des coumarines, sont produites dans les carottes en réponse à l'infection fongique et peuvent être présumées d'avoir des molécules à activité antifongique.¹²⁴ Les extraits d'aspérule (*Odoatum de gaillet*) manifestent une activité antimicrobienne.¹⁰¹

IV.2.2. Les terpénoïdes et les huiles essentielles

Les terpénènes ou terpénoïdes sont actifs contre les bactéries,¹³⁰⁻¹³² les mycètes,^{133, 134} les virus¹³⁵⁻¹³⁷ et les protozoaires.^{138, 139} En 1977, il a été signalé que 60% de dérivés d'huiles essentielles examinés étaient inhibiteurs aux mycètes tandis que 30% empêchaient la

croissance des bactéries.¹⁴⁰ Récemment, Cichewicz et Thorpe ont constaté que la capsaïcine pourrait augmenter la croissance des *Candidas albicans* et empêcher la croissance de diverses bactéries.¹⁴¹ Les terpénoïdes du trèfle pourpre de prairie (la fraction soluble dans l'éthanol) ont montré une forte activité contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* et une faible activité contre les bactéries Gram (-) et les *albicans candida*.¹⁴² Deux autres diterpènes isolés par Batista et *al.*, se sont avérés actifs contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et les espèces de *candida*.¹¹⁴

IV.2.3. Les alcaloïdes

Le premier exemple médicalement utilisé, d'un alcaloïde était la morphine isolée en 1805 de l'oeillette *Papaver somniferum*.¹⁴³ Le nom de morphine vient du Morpheus grec, un dieu des rêves. La codéine et l'héroïne sont les deux dérivés de la morphine. Des alcaloïdes de diterpénoïde, généralement isolés de *Ranunculus bulbosus* s'avèrent avoir généralement des propriétés antimicrobiennes.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Solamargine, un glycoalcaloïde des baies du *Khasianum* de *Solanum*, et d'autres alcaloïdes peuvent être utiles contre l'infection par le HIV^{147, 148} aussi bien que contre les infections intestinales liées au SIDA.¹⁴⁹

IV.3. Résistances bactériennes – infections nosocomiales

Les complications d'origine hospitalière dues aux infections sont en augmentation. En effet, une grande variété d'agents bactériens et fongiques impliqués dans les infections nosocomiales (IV) sont fréquemment multirésistants aux antibiotiques (ATB).

L'infection nosocomiale est devenue pour ainsi un problème important qui prendra de l'ampleur dans le futur compte tenu, de l'évolution démographique de nos sociétés et de l'utilisation des ATB d'une façon irrationnelle. Du fait de l'accumulation des résistances naturelles et acquises, les bactéries sont devenues multirésistantes aux antibiotiques (BMR) et elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique. Les taux d'infections reportés dans la littérature varient de 1.8 à 9.4 par 1000 patients infectés par jour.¹⁵⁰

Tableau 6 : Les principales classes des composés antimicrobiens des végétaux

Classe	Sous classe	Exemple	Mécanisme
Phénoliques	Phénols simples	Catéchol	privation de substrat
		Épicatéchine	Rupture de membrane
	Acides Phénoliques	acide cinnamique	/ /
	Quinones	Hypericin	Lié aux adhésions, complexes avec les parois cellulaires, inactive les enzymes
	Flavonoïdes Flavones	Chrysin	Grippage aux adhésions complexes avec les parois cellulaires
		Abyssinone	Inactiver les enzymes empêcher le transcriptase renversé d'HIV
	Flavonoles	Totarol	//
	Tanins	Ellagitannin	Le grippage aux protéines liées au complexe de privation de substrat d'inhibition d'enzymes d'adhésions avec la complexation d'ion en métal de rupture de membrane des parois cellulaires
	Coumarines	Warfarin	Interaction avec l'ADN eucaryotique (activité antivirale)
Térpenoïde, Huiles essentielles	//	Capsaïcine	Rupture de membrane
Alcaloïdes		Berbérine	Intercaler dans les parois cellulaires et/ou l'ADN
		Pipérine	

IV.3.1. Caractéristiques épidémiologiques

Parmi les principales espèces bactériennes multirésistantes (BMR) responsables d'infection nosocomiale (IN), nous citons :

a) *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

Staphylococcus aureus est une des deux principales espèces responsables d'IN. Les SARM représentent 5 à 10% des bactéries isolées des IN. Ils sont principalement impliqués dans les IN cutanées, du site opératoire (30%), des voies urinaires et respiratoires (20%) et les bactériémies (10%). Les SARM, résistants à toutes les β -lactamines, sont aussi souvent très résistants aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones.

Depuis quelques années, les souches de SARM se sont diversifiées (souches de SARM sensibles à la gentamicine), ce qui ne résout pas pour autant, les problèmes thérapeutiques et ne doit en rien modifier la stratégie de lutte contre leur diffusion. En effet, les souches de SARM sensibles à la gentamicine, mais résistantes au moins aux fluoroquinolones ont rapidement diffusé dans les hôpitaux notamment en France, Japon, USA, ce qui montre bien la nécessité absolue de lutter globalement contre le phénomène de diffusion épidémique des SARM. ¹⁵¹⁻¹⁵⁵

b) Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu (EBLSE)

Les entérobactéries dans leur ensemble représentent 35 à 40% des bactéries responsables d'IN. Les EBLSE représentent environ 1% des bactéries isolées des IN. Les infections à EBLSE s'observent sous la forme de cas apparemment isolés, de cas groupés, ou de véritables épidémies. La tendance à la diffusion clonale des EBLSE est bien démontrée. Les EBLSE sont principalement impliquées dans les infections urinaires (plus de 50%), symptomatiques ou non, les bactériémies (5 à 20%) et les infections de plaies ou de site opératoire (10 à 20%).

Les souches d'EBLSE (principalement *K. Pneumoniae*, mais aussi *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter sp.*) sont résistantes à l'ensemble des β -lactamines (sauf les céphamycines et l'imipénème), aux aminosides et très souvent aux fluoroquinolones. ^{153, 154}

c) Entérocoque résistant à la vancomycine (ERV)

Les entérocoques représentent 5 à 8% des bactéries responsables d'IN. Ils représentent environ 1% des souches d'entérocoques isolées à l'hôpital et il y a environ 1% de porteurs d'ERV dans la population générale.¹⁵⁶ En revanche, l'incidence de leur port dans la communauté peut atteindre 12 à 28% dans certains pays européens, l'alimentation étant une source possible de contamination. Aux États-Unis, les ERV représentent plus de 15% des souches d'entérocoques isolées en unités de soins intensifs. La sélection d'ERV en milieu hospitalier a comme facteur de risque les traitements antibiotiques, en particulier par glycopeptides, mais l'acquisition est aussi possible par transmission croisée (diffusion clonale).¹⁵⁵

d) *Acinetobacter baumannii* multirésistant (résistant à la ticarcilline) (ABR)

Les *Acinetobacter baumannii* représentent 2 à 4% des bactéries responsables d'IN. Les (ABR) jouent un rôle croissant dans les IN, dans certains secteurs hospitaliers (unité de soins intensifs) et sont souvent à l'origine de bouffées épidémiques dans lesquelles est impliquée la forte contamination de l'environnement des patients porteurs. Certaines souches épidémiques résistantes à l'imipénème conduisent à des impasses thérapeutiques.¹⁵⁷

e) *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant (PAR)

Les *Pseudomonas aeruginosa* représentent 10 à 11% des bactéries responsables d'IN. Les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux β -lactamines (ticarcilline, ceftazidime ou imipénème), qui ont tendance à être résistantes aussi aux aminosides et aux fluoroquinolones, devront faire l'objet d'une stratégie spécifique, notamment une politique de prescription raisonnée des antibiotiques pour éviter leur émergence et des mesures de contrôle de l'environnement pour éviter leur diffusion qui se produit par petites épidémies.¹⁵⁸⁻¹⁶²

f) Entérobactéries résistantes aux β -lactamines par hyperproduction de céphalosporinase (EBCASE)

Chez certaines espèces d'entérobactéries, en particulier *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Serratia marcescens* et *Citrobacter freundii*, une proportion importante des souches (10 à 30%) sont résistantes aux β -lactamines par hyperproduction de

céphalosporinase. Les traitements antibiotiques favorisent l'émergence de ces souches dont le potentiel de diffusion clonale est beaucoup plus limité que celui des souches productrices de BLSE.¹⁶³

V. METAUX LOURDS DANS LES PLANTES - HYPERACCUMULATION DES PLANTES

V.1. Introduction

La croissance et le développement des plantes nécessitent de l'eau, de la lumière, du carbone, de l'oxygène et des éléments minéraux. L'air fournit l'oxygène et le gaz carbonique, source de carbone, que la plante fixe grâce à la photosynthèse.

On ne peut obtenir une bonne croissance des cultures que si les éléments nutritifs sont apportés en quantités suffisantes, sous des formes adéquates et à des moments appropriés. Tous les éléments nutritifs que la plante utilise proviennent du sol ou de l'air ou de l'eau. Le sol peut mettre à la disposition des cultures plusieurs éléments nutritifs mais il est souvent nécessaires de faire des apports supplémentaires sous forme d'engrais minéraux, de fumiers et d'autres sources organiques pour satisfaire leurs besoins.^{8,164}

V.2. Les éléments nutritifs essentiels pour les plantes

◆ **Eléments de structure** : Le carbone (C), l'oxygène (O) et l'hydrogène (H) forment la charpente du végétal et sont très abondants. C et O proviennent de l'atmosphère et l'hydrogène provient de l'eau du sol. La photosynthèse dans les feuilles produit des hydrates de carbone à travers l'absorption du CO₂ de l'atmosphère. La respiration (des feuilles et des racines) utilise O₂ pour la production de l'ATP (énergie cellulaire).¹⁶⁴⁻¹⁶⁶

◆ **Eléments nutritifs minéraux** : Ils proviennent, en grande partie, du sol et ils sont impliqués dans toutes les fonctions métaboliques dans la plante. Ils se répartissent Comme suit :

♣ **Macroéléments**: Azote (N), phosphore (P) et potassium (K). Leur concentration est plus élevée dans les végétaux que les autres éléments nutritifs minéraux. Elles sont, généralement, exprimées en %.

♣ **Méso éléments** : Calcium (Ca), magnésium (Mg) et soufre (S). Ils présentent des teneurs, en général, intermédiaires entre les macroéléments et les oligoéléments. Leurs concentrations sont, généralement, exprimées en %.

♣ **Oligoéléments** : Fer (dans le végétal Fe), zinc (Zn), manganèse (Mn), cuivre (Cu), bore (B), chlore (Cl) et molybdène (Mo). Leurs concentrations sont les moins élevées et sont généralement exprimées en ppm (=mg/kg de tissu végétal).

Le tableau 7 donne les teneurs relative et moyenne des éléments nutritifs dans le végétal :

Tableau 7 : Les teneurs relative et moyenne des éléments nutritifs dans la végétal.

Elément nutritif	Teneur relative dans le végétal (par rapport au molybdène)	Teneur moyenne dans le végétal
H	60 000 000	6.0%
O	30 000 000	45.0%
C	30 000 000	45.0%
N	1 000 000	1.5%
K	400 000	1.0%
Ca	200 000	0.5%
Mg	100 000	0.2%
P	30 000	0.2%
S	30 000	0.1%
Cl	3 000	100 ppm
Fe	2 000	100 ppm
B	2 000	20 ppm
Mn	1 000	50 ppm
Zn	300	20 ppm
Cu	100	6 ppm
Mo	1	0.1 ppm

V.3. Notion des métaux lourds ou élément traces métalliques (ETM)

On appelle en général métaux lourds les éléments métalliques naturels ou dans certains cas, métalloïdes caractérisés par une masse volumétrique élevée supérieure à 5g /cm³. On trouve dans certaines publications anciennes, l'appellation de 'métal pesant'. L'appellation métaux lourds est cependant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni appellation juridique.

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement. Ils sont en général, en quantités très faibles. On dit que les métaux sont présents 'en traces'. Ils sont aussi 'la trace' du passé géologique et de l'activité de l'homme.

La classification en métaux lourds est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement 'lourds' (le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic par exemple).^{167, 168}

Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation 'éléments en traces métalliques' -ETM- ou par extension 'éléments traces' -ET-.

V.4. Les métaux lourds dans le sol

V.4.1. Origine des métaux présents dans le sol

Les métaux peuvent être naturellement présents dans le sol, s'il existe un fond géochimique, comme c'est le cas dans les gisements miniers et à proximité. Mais la présence de résidus métalliques dans le sol peut aussi être liée à l'activité humaine. Les sources de contamination par l'homme sont diverses :

- ◆ Apport boues d'épuration;
- ◆ Apports d'engrais (notamment les engrais phosphatés), de produits phytosanitaires divers, de lisiers, de composts urbains ou d'eaux résiduelles agro-industrielles ;
- ◆ Rejets atmosphériques à proximité d'axes routiers ou de sites industriels anciens ;
- ◆ Apports massifs lors d'accidents ponctuels;
- ◆ Transferts latéraux par ruissellement, en bordure des routes.^{164,169}

V.4.2. Localisation et devenir des métaux dans le sol

Quand la présence des métaux est due à une contamination par l'homme, ils s'accumulent le plus souvent en surface. L'accumulation des métaux dans le sol peut gêner fortement le développement de végétaux sur ces sols: on parle de phytotoxicité.^{164,169}

V.4.3. Risques liés à la présence de métaux dans le sol

La définition précise de la notion de risque de contamination pour l'homme est assez délicate. Tout d'abord il faut distinguer l'exposition au danger de ses conséquences : il faut

d'une part rechercher la probabilité pour une population d'être en contact avec l'agent polluant, et d'autre part déterminer quels peuvent être les effets de ce contact. Ici les sources principales de contamination pour l'homme sont l'ingestion d'eau ou de particules de sol, l'inhalation de poussières, et l'ingestion de végétaux souillés ou ayant accumulé ces métaux.

Il est très difficile de définir des seuils et limites à ne pas dépasser. Par exemple une substance appliquée à des concentrations très élevée pendant un court laps de temps peut être mortelle pour l'organisme testé : on parle de toxicité aiguë. Une durée d'exposition courte peut aussi entraîner une toxicité chronique ou à long terme, si l'accumulation de polluants dans les tissus est mutagène. Par contre il se peut qu'un organisme exposé à la même quantité totale de polluant mais sur un temps très long ne développe pas les mêmes pathologies. D'autre part il n'existe pas de test standard pour tous les métaux. Il semble donc difficile d'établir des normes universelles, vu la quantité de paramètres à prendre en compte. Ainsi les seuils à ne pas dépasser ne sont pas seulement fonction de la quantité de métal présente dans le sol mais plutôt de leur mobilité et de leur biodisponibilité, qui dépendent elles-mêmes de nombreux paramètres.^{164,169}

Des normes sont donc en vigueur dans les différents pays, dont voici un aperçu.(tableau 8).

Tableau 8 : Les teneurs limites en métaux lourds dans le sol

Elément	Teneurs limites (mg/kg de sol sec)	
	France	Union Européenne
Cadmium	2	3
Chrome	150	200
Cuivre	100	140
Nickel	50	75
Plomb	100	300
Zinc	300	300

V.5. Métaux lourds dans les plantes

Plusieurs métaux lourds tels que Cu, Zn, Ni, Co et Mn sont des ETM essentiels pour les plantes, mais peuvent être toxiques à forte concentration. Pour la plupart des espèces de plantes, le domaine des concentrations bénéfiques de ces métaux est souvent très étroit.¹⁷⁰

D'autres métaux tel que le Cd ne sont pas essentiels et leur présence est toxique pour

la plante. Les tableaux 9 et 10 montrent en général le rôle, les seuils de carence et de toxicité de certains métaux dans les plantes.^{171, 172}

Tableau 9 : Rôle des métaux dans les fonctions des organismes végétaux

Eléments traces (ET)	Essentiel ou bénéfique		Potentiellement toxique	
	Végétaux	Animaux	Végétaux	Animaux
Zn	Oui	Oui	Oui	Dnd
Cu	Oui	Oui	Oui	Oui ^a
Co	Oui	Oui	Oui	Oui
Cd	Non	Non	Oui	Oui
Ni	Non	Oui	Oui	Oui
Pb	Non	Non	Oui	Oui

a : toxique pour les ruminants (ovins, bétail), Dnd : données sur les limites ne sont pas disponibles

Tableau 10: Rôle au mg/kg de la matière sèche dans les plantes (ppm^{*1})

Eléments traces (TE)	Seuil de carence	Seuil de toxicité
Fe	5	10-100
Zn	15	100-400
Cu	3-5	20-200
Co	0-2	15-50
Cd	-	1
Pb	-	8
Ni	1-5	10-100

Le tableau 11 donne les teneurs normales et la phytotoxicité en métaux lourds¹⁷² dans les plantes fourragères.

Tableau 11 : La phytotoxicité des plantes fourragères en métaux lourds (ppm)

Eléments traces (ET)	Normale	Phytotoxicité
Cd	0,1-1	5-700
Co	0,01-0,3	25-100
Fe	30-300	-
Ni	0,1-5	50-100
Pb	2-5	8
Zn	15	500-1500
Cu	3-20	25-40

¹ * ppm : partie par million (mg par kg de matière sèche)

V.6. Hyperaccumulation

Les plantes, comme les invertébrés, réagissent de façon différente selon les variétés. Certaines sont peu ou pas tolérantes et meurent au contact des métaux lourds. D'autres ont des réactions de défense, et freinent l'absorption en sécrétant des acides qui vont augmenter le pH et par conséquent réduire la mobilité des éléments traces. D'autres enfin, sont tolérantes aux métaux, et même les accumulent, les concentrent. Ces plantes sont dites «accumulatrices ou hyperaccumulatrices ».

Les éléments traces sont absorbés par les racines, et y demeurent le plus souvent. Le passage dans les parties aériennes (tiges, feuilles) varient selon les métaux et sont les signes d'un accroissement de la concentration des métaux dans le sol, le plomb reste dans les racines. Le cadmium passe plus facilement dans les parties aériennes.¹⁷³

L'hyperaccumulation des métaux lourds (Ni, Zn, Cd, ...) chez les plantes, est la capacité d'accumuler certains métaux jusqu'à des concentrations anormalement élevées dans les feuilles.^{174,175} Ce caractère reste encore incompris d'un point de vue écologique et évolutif. Toutefois, plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'avantage adaptatif de l'hyperaccumulation. L'hyperaccumulation influerait notamment sur la résistance à la sécheresse, les interactions avec les plantes adjacentes et la défense contre les herbivores et les bactéries pathogènes.¹⁷⁶⁻¹⁸¹ D'autre part, ces plantes hyperaccumulatrices peuvent permettre à des bactéries métallorésistantes de se développer dans le sol alentour.

L'accumulation a lieu après le passage de la barrière endodermique des racines. Dans la grande majorité des cas, les métaux extraits du sol restent concentrés dans les racines de la plante. Ce n'est pas le cas, cependant, des plantes métalphytes où l'essentiel de l'accumulation des végétaux a lieu dans les tiges. L'un des mécanismes permettant aux plantes d'accumuler des métaux toxiques sans développer de pathologie, repose sur une stratégie de séquestration du métal, qui est en fait biologiquement indisponible. Le métal est ainsi présent dans la plante, mais sous une forme qui ne peut pas intervenir dans le métabolisme vital du végétal.

Le prélèvement du métal par la plante varie selon le métal, la plante et le type des sols.¹⁸¹ On peut toutefois énoncer quelques règles générales. Les racines de la plante exercent

une forte influence sur leur environnement direct, la rhizosphère, en y libérant des composés organiques et minéraux. Ces composés sont appelés exsudats. Ces exsudats peuvent contenir des composés chélatant les métaux et facilitant leur passage dans la plante. La manière dont les métaux ou les chélats sont transférés à travers la plante, demeure inconnue.

Le terme hyperaccumulation est introduit en 1977 pour les plantes qui accumulent plus que 1 mg de Ni par gramme de matière sèche dans les pousses, dans leur milieu naturel.¹⁷⁵ Actuellement, plus de 400 espèces hyperaccumulatrices appartenant à 45 familles ont été identifiées.¹⁸² La plupart d'entre elles, environ 300 espèces accumulent le Ni^{183, 184} et 18 espèces accumulent le Zn.

Une plante hyperaccumulatrice de Zn est définie comme plante qui accumule au moins 10 mg de Zn par gramme de matière sèche dans ses pousses, dans ses habitats naturels.¹⁸³

Les seuils de la concentration des métaux définissant l'hyperaccumulation varient selon le métal considéré : 100 mg/g pour le Cd (0.001% en MS), 1000 mg/kg pour (Pb, Ni, Co, et Cu) (0.1% en MS) et 10000 mg/kg pour le Zn et Mn (> 0.1% en Ms).¹⁸⁵

Le tableau 12 donne le nombre de plantes hyperaccumulatrices et la concentration des métaux dans les feuilles en pourcentage de matière sèche.

Tableau 12: Le nombre de plantes hyperaccumulatrices et concentrations de métaux dans les feuilles (% de matière sèche)

Métal	Concentration dans les feuilles (% de matière sèche)	Nombre de taxons	Nombre de familles
Zn	> 1	18	5
Cu	> 0,1	24	11
Co	> 0,1	26	12
Cd	> 0,001	1	1
Ni	> 0,1	Plus de 300	35
Pb	> 0,1	5	3

V.7. Intérêt de l'hyperaccumulation – phytoremédiation – phytorestauration

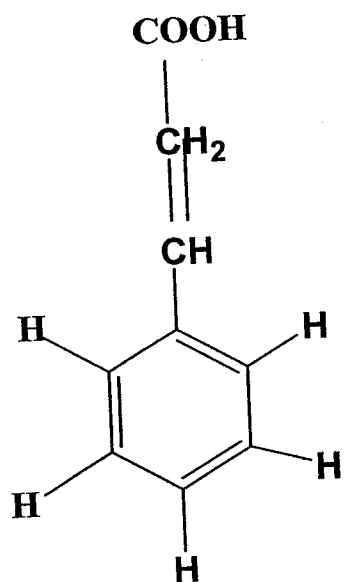
Des observations ont montré que la disparition des polluants organiques et inorganiques était plus rapide sur les sols couverts de végétaux que sur les sols nus. Ainsi, un autre aspect de la recherche sur les plantes concerne leur utilisation à dépolluer les sols contaminés par les produits organiques et inorganiques.

Connues sous le nom de phytoremédiation, les plantes hyperaccumulatrices sont utilisées pour absorber des concentrations élevées de métaux par leurs racines et les concentrer dans leurs feuilles.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸ Cette biomasse est récoltée pour l'incinérer et récupérer les métaux dans les cendres afin de les réutiliser en métallurgie. Enfin, la restauration des sites contaminés par les métaux, implique la reconstitution d'une couverture végétale (revégétalisation avec des espèces tolérantes aux métaux) tant pour des raisons esthétiques que dans un souci de protection (ruissellement, poussières).

Dans un autre contexte d'autres plantes sont actuellement utilisées dans des stations de lagunage de petites communes afin de filtrer et épurer les eaux usées. On appellera cette technique la phytorestauration des eaux usées. L'épuration de l'eau dans la nature, se fait de manière naturelle. Toute fois, depuis que l'homme s'est installé et pollué la ressource en eau, il est également obligé de l'épurer. La phytorestauration de l'eau ou l'utilisation des végétaux dans l'épuration des eaux usées et pluviales est un procédé récent qui reprend les techniques naturelles d'autoépuration.

Les technologies usuelles en matière de dépollution sont souvent mal adaptées aux petites collectivités car elles sont coûteuses et complexes. L'utilisation « de procédé rustiques » comme les filtres plantés de Roseaux semble être une bonne alternative aux stations d'épurations classiques pour ces petites collectivités.¹⁸⁸

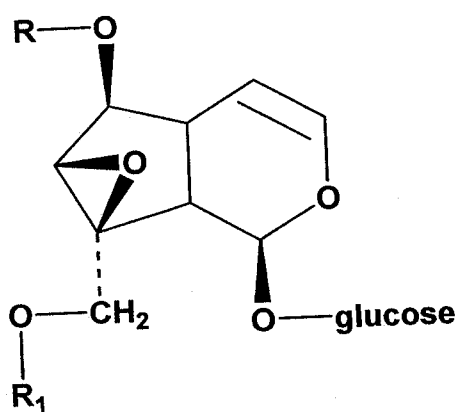
VI. STRUCTURES DES MOLECULES



1



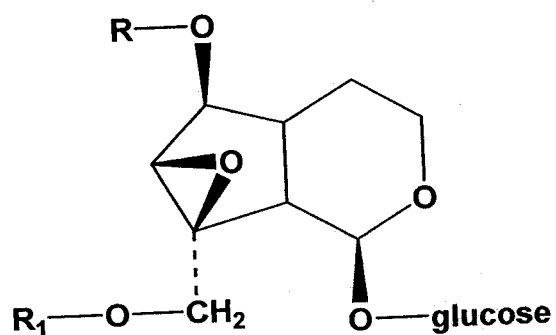
2



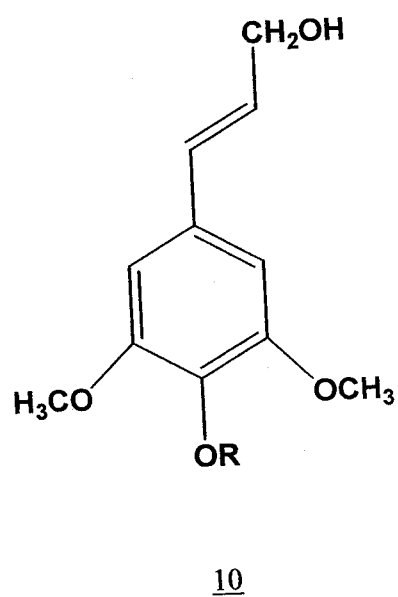
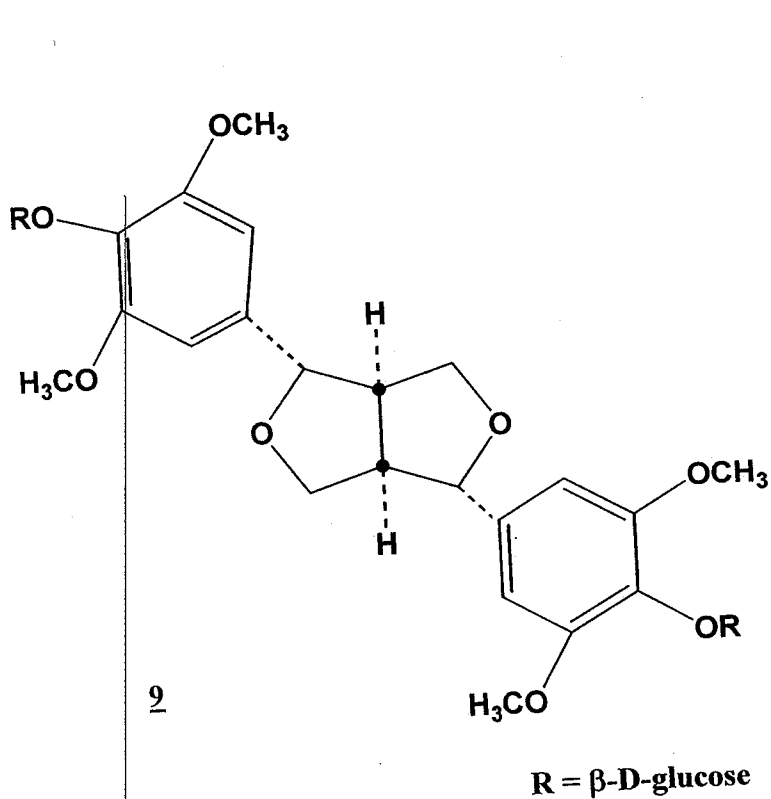
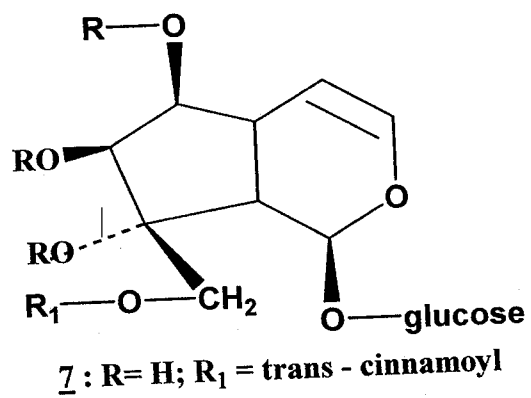
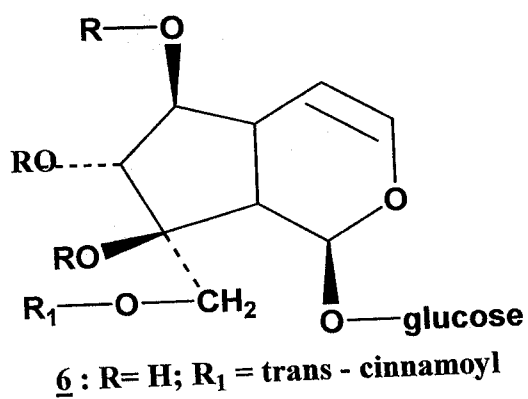
3 : R = H ; R₁ = trans-cinnamoyl

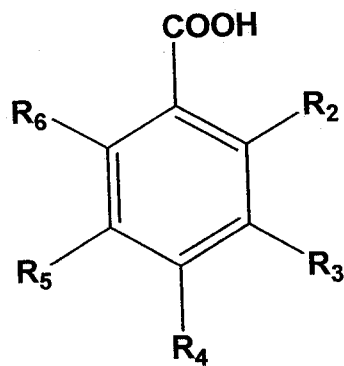
8 : R = H ; R₁ = cis-cinnamoyl

4 : R = R₁ = H

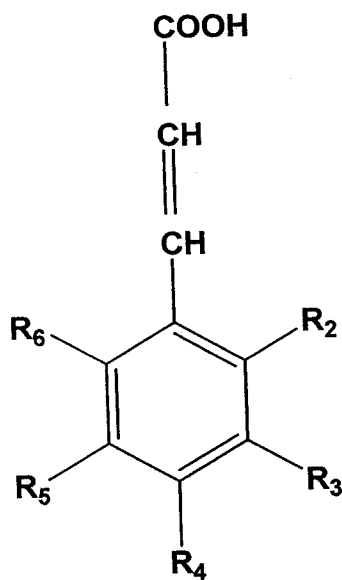


5 : R = H ; R₁ = trans-cinnamoyl

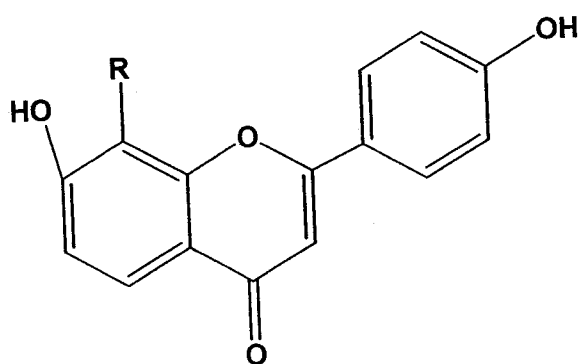




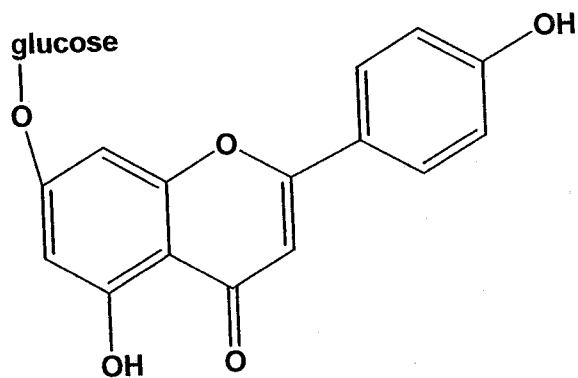
Composé	<u>11</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>
R ₂	H	H	H	H	OH	OH
R ₃	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H
R ₄	OH	H	OH	OH	OH	H
R ₅	H	H	OCH ₃	H	H	H
R ₆	H	H	H	H	H	H



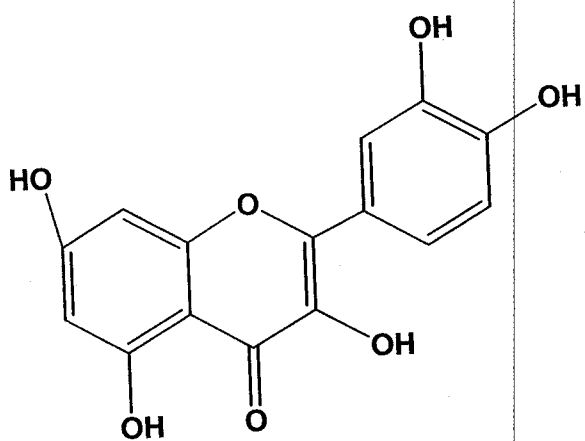
Composé	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>
R ₂	H	H	H	H
R ₃	OH	OCH ₃	H	OCH ₃
R ₄	OH	OH	OH	OH
R ₅	H	OCH ₃	H	H
R ₆	H	H	H	H



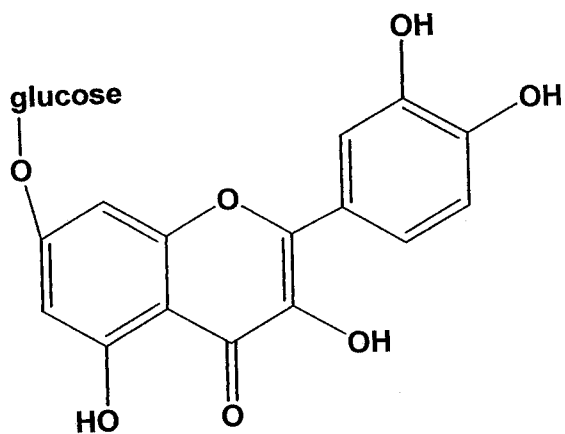
21 : R = H
25 : R = glucosyle



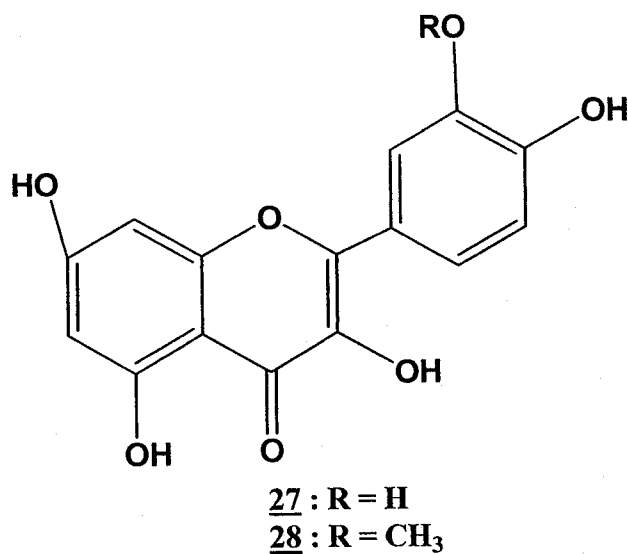
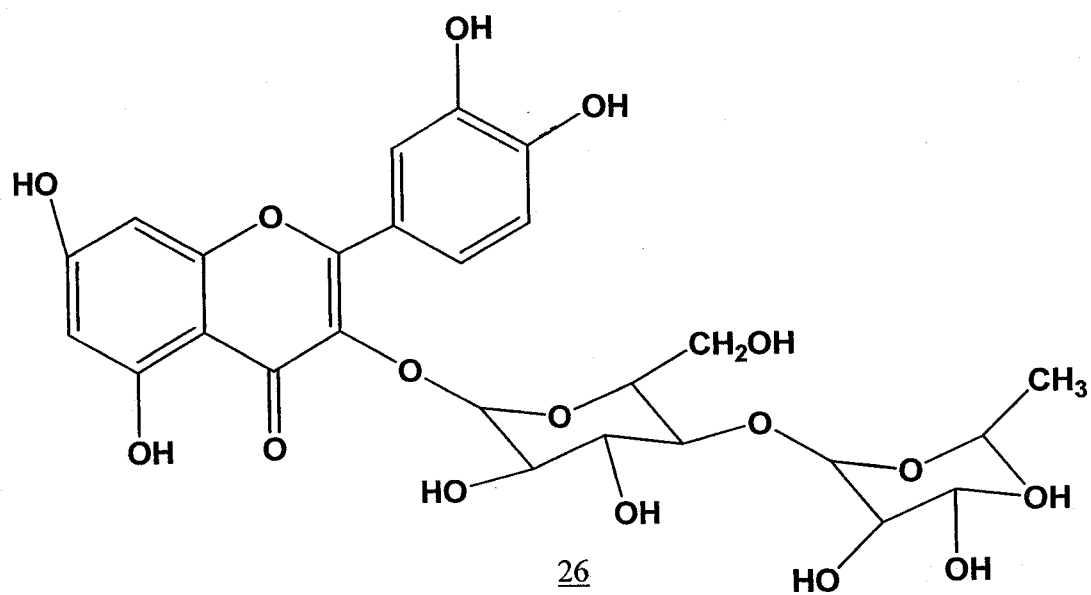
22

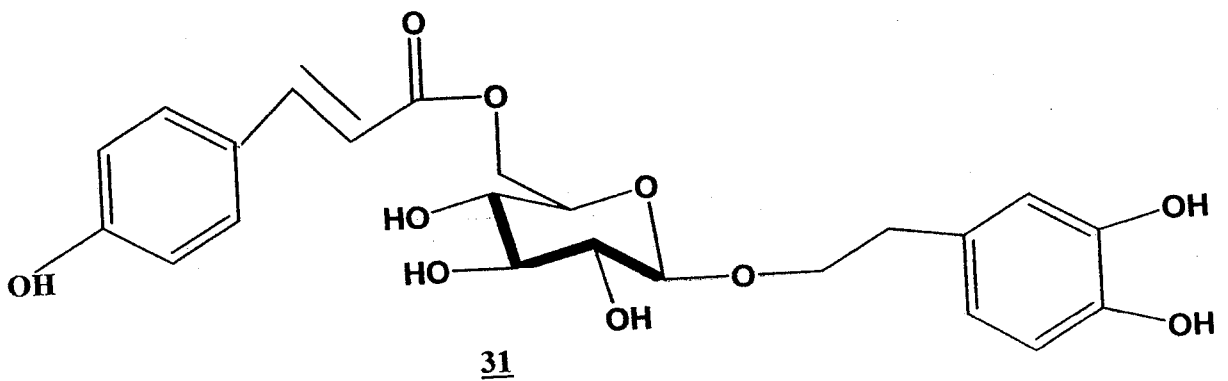
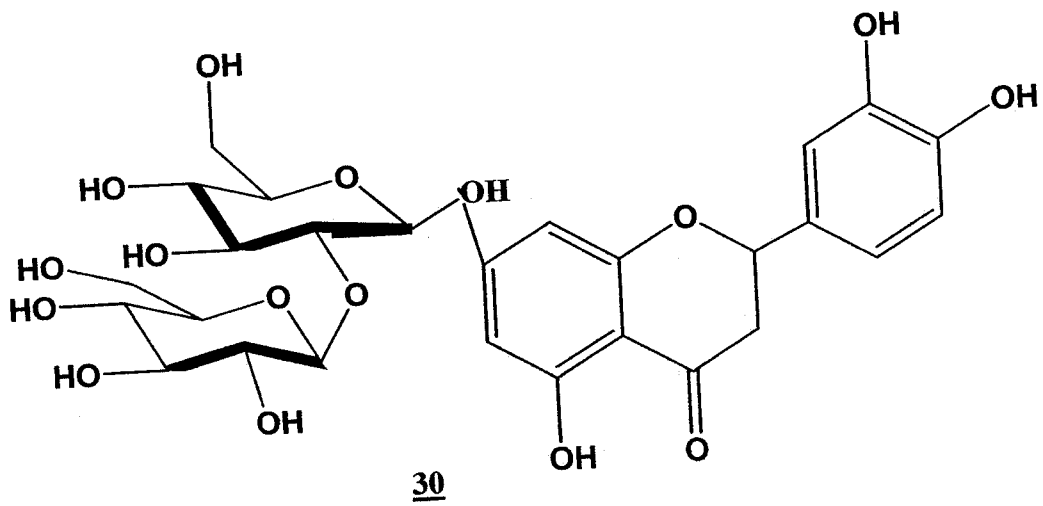
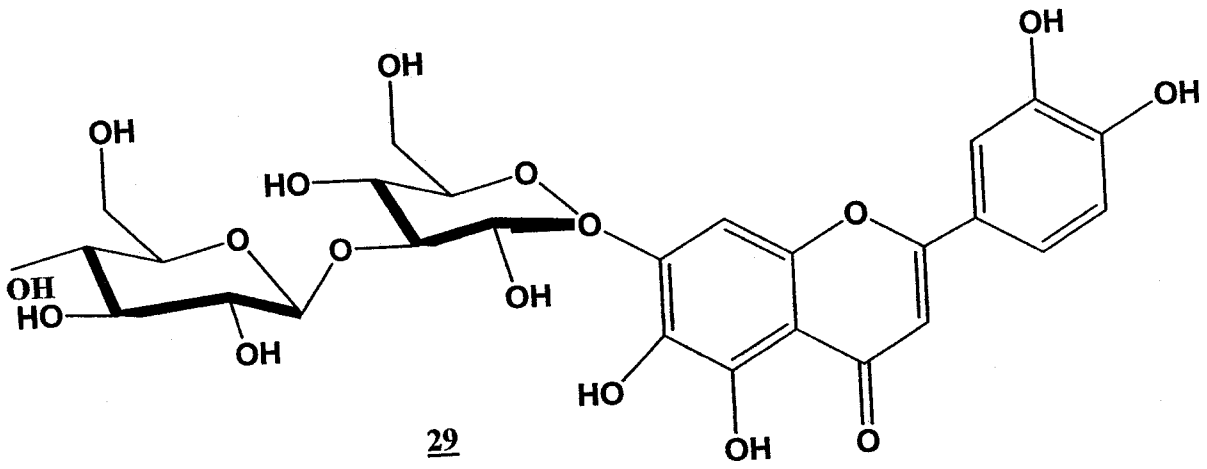


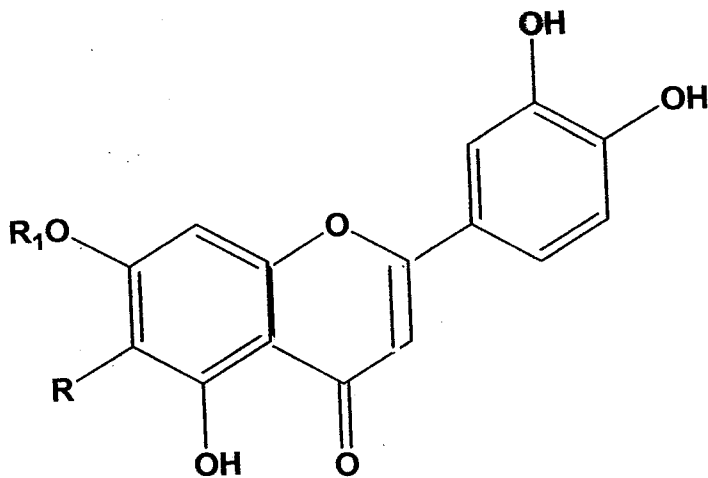
23



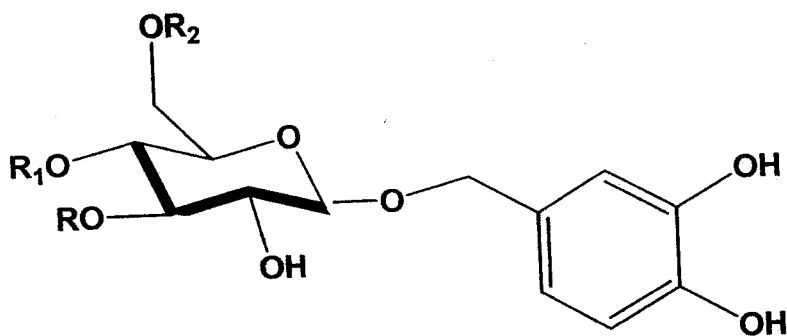
24



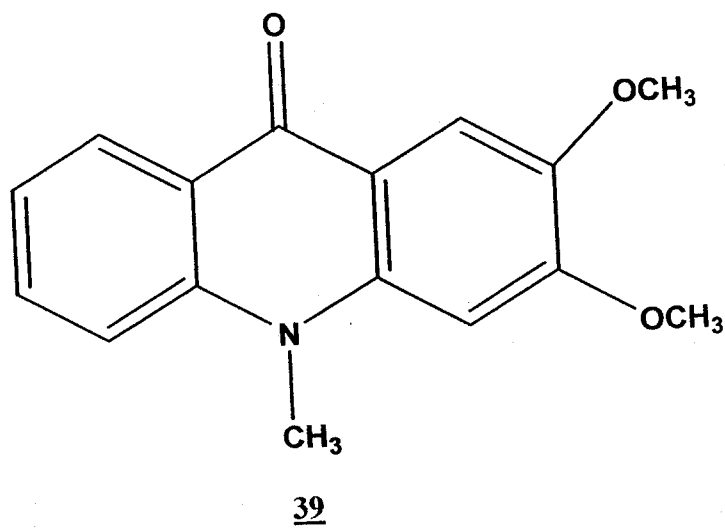
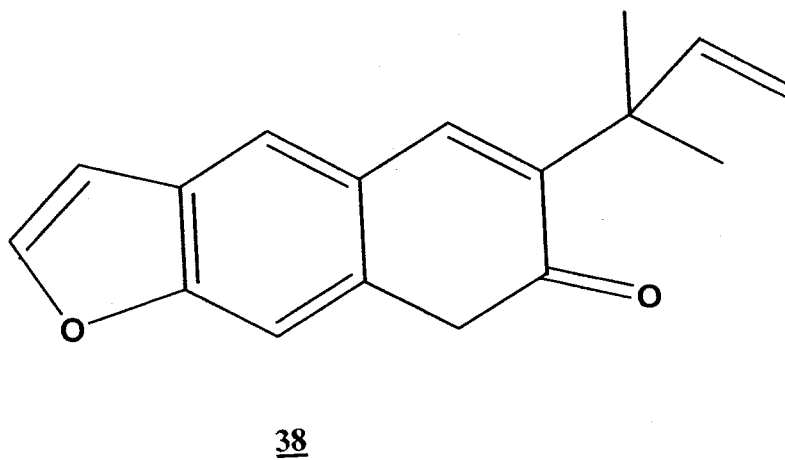
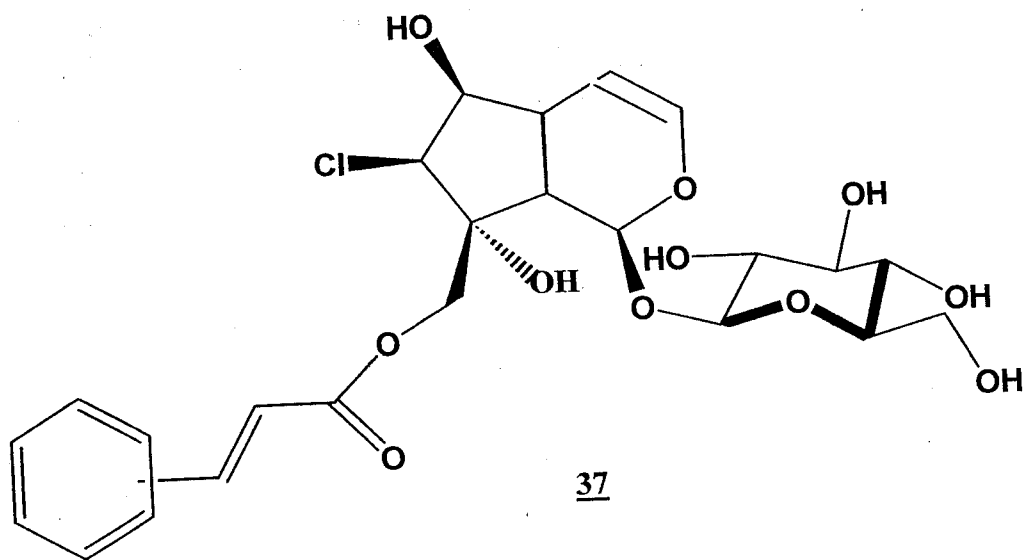


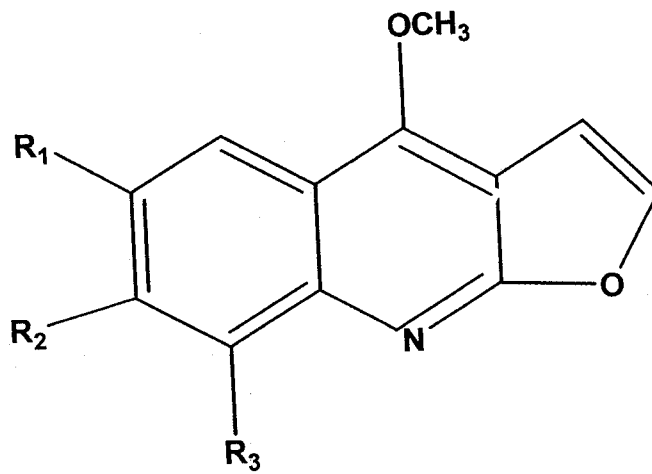


32 : R = OH; R₁ = glucosyl-(1--->3)-glucosyl
33 : R = OH; R₁ = glucosyl

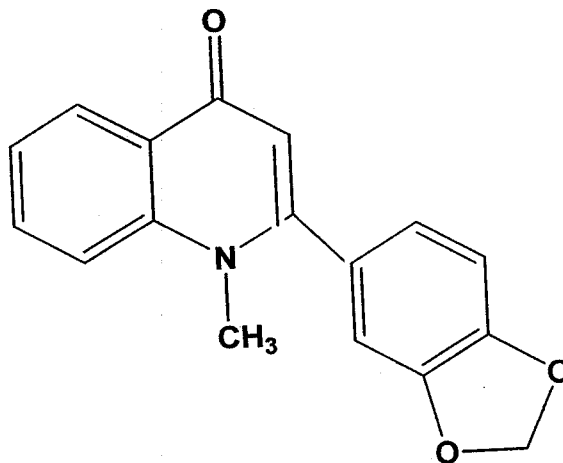


34 : R = H; R₁ = E-Caffeoyl; R₂ = Rhamnosyl
35 : R = Rhamnosyl; R₁ = E-Caffeoyl; R₂ = H
36 : R = Rhamnosyl; R₁ = H; R₂ = E-Caffeoyl

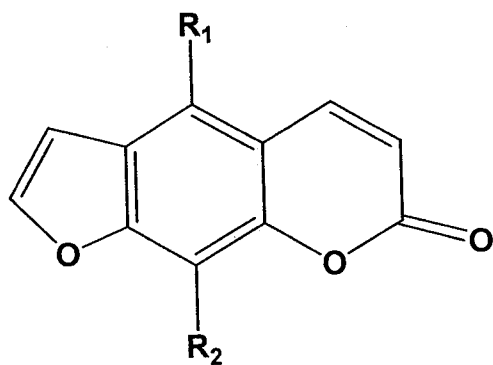




- 40 : R₁ = R₂ = R₃ = H
42 : R₁ = R₂ = OCH₃; R₃ = H
43 : R₁ = H; R₂ = R₃ = OCH₃



41

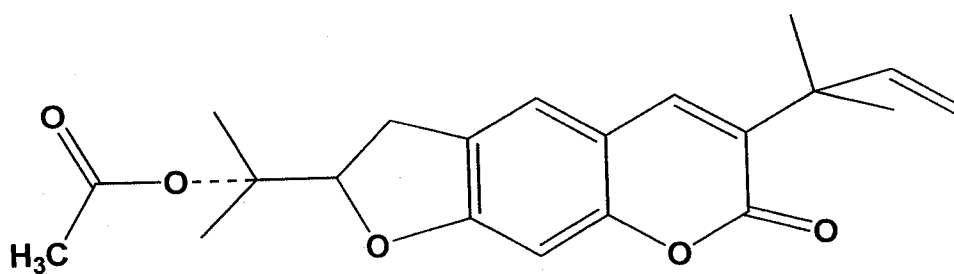


44 : $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$

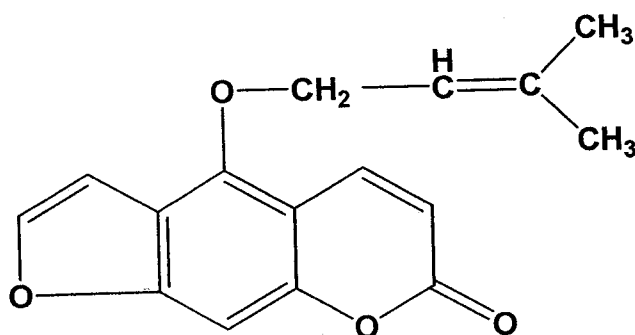
45 : $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$

46 : $R_1 = R_2 = \text{H}$

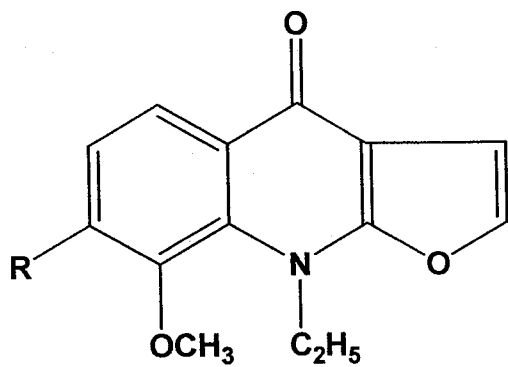
48 : $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OCH}_3$



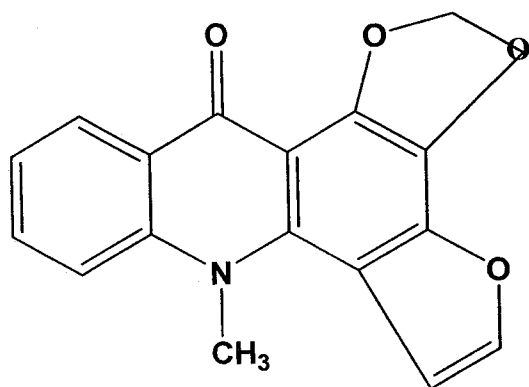
47



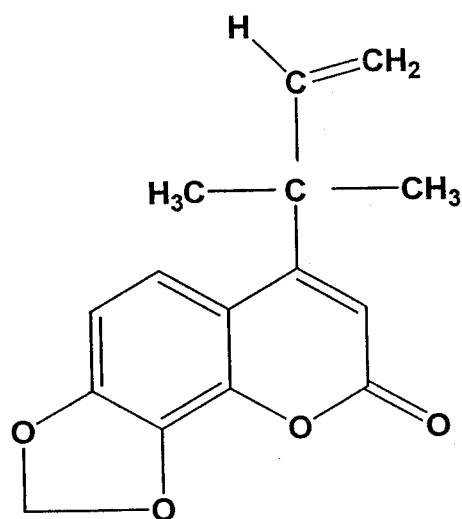
49



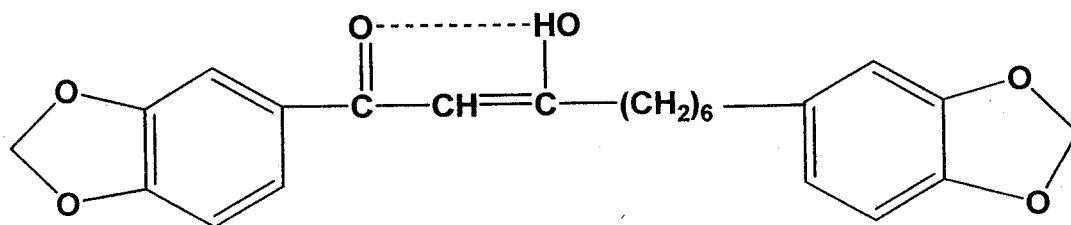
50 : R = H
51 : R = OCH₃



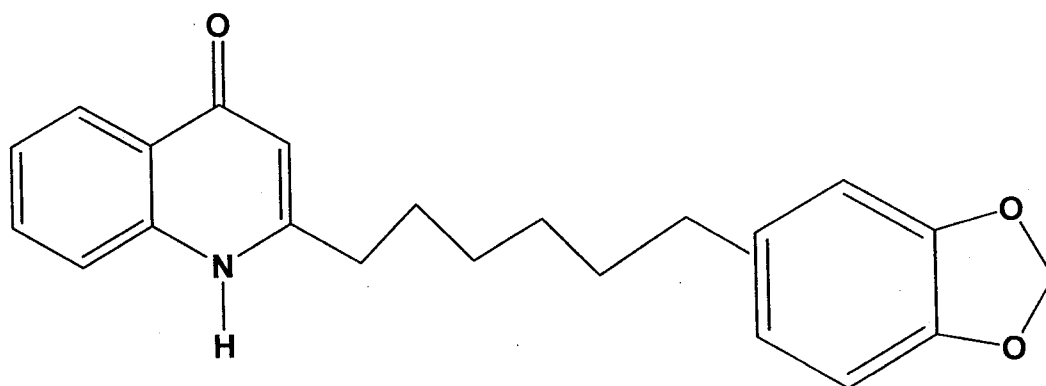
52



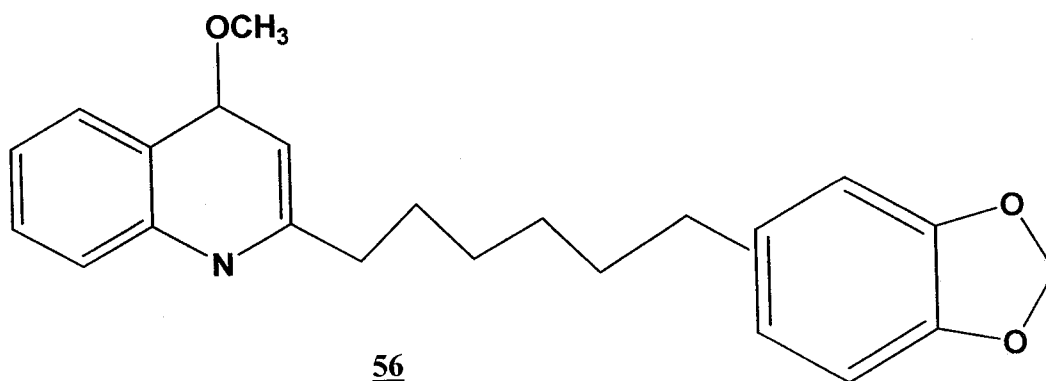
53



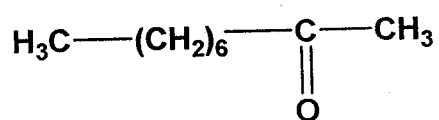
54



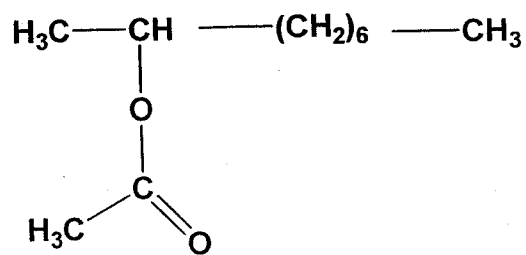
55



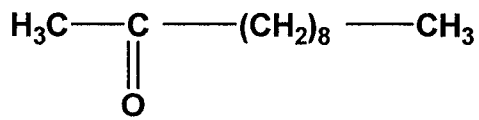
56



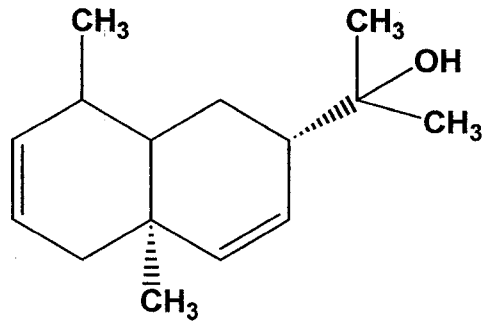
57



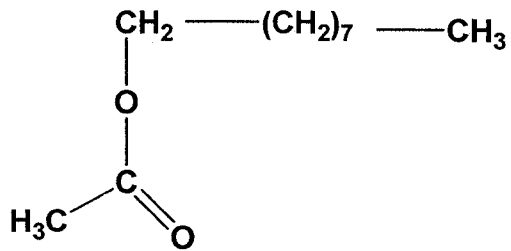
58



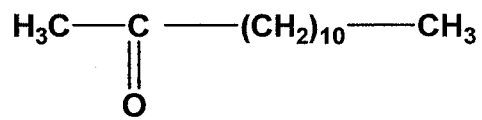
59



60



61



62

CHAPITRE II

Partie Expérimentale

I. INTRODUCTION

Si l'on s'intéresse tout particulièrement à une matrice végétale, il est important de définir son identité, décrire sa morphologie, connaître son origine, son mode de production et analyser sa composition chimique. Toutefois, cette étude n'est exhaustive et le domaine concerné, étant très vaste, nécessite plus d'approfondissement.

De nombreuses recherches continuent d'élaborer des méthodologies et des instrumentations plus optimisées. Néanmoins, bien que certaines techniques analytiques soient largement connues, il n'est pas inutile de rappeler brièvement leur concept avant de procéder aux données expérimentales et mode opératoires.

Une attention particulière sera simplement portée aux méthodes disponibles et utilisées dans nos travaux.

II. MATERIEL VEGETAL

II.1. Origine Géographique et période de récolte

Globularia alypum a été récoltée en période de fructification (Juillet 1999 et Juillet 2001) dans la région de Ouchba.

Les différentes récoltes de *Ruta chalepensis* ont été effectuées à Ouzidane en Avril 2004 et 2005 et Juin 2005, à Béni Mester en Octobre 2004 et en Février, Avril, Juin, Août et Octobre 2005 et à Ghazaouet, Ain Fezza, Terni et Sebdou en Avril 2005.

II.2. Identification botanique

Les deux espèces ont été identifiées par le Professeur M. BOUAZZA du Laboratoire de Botanique, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen. Un échantillon des plantes a été déposé au niveau de l'herbarium au niveau du laboratoire de Botanique.

II.3. Préparation des échantillons

Après leur récolte, les échantillons ont été triés. Le séchage du matériel a été réalisé dans un espace couvert (à l'abri du soleil) et bien aéré. Le matériel végétal était retourné au fur et à mesure de son séchage.

Les échantillons broyés ou sous forme de miettes (pour l'extraction des huiles essentielles) ont été mis dans des bocaux, en verres hermétiquement fermés, conservés à la température du laboratoire.

III SOLVANTS, PRODUITS CHIMIQUES ET APPAREILS

III.1. Solvants et produits chimiques

Les réactifs utilisés lors des différents travaux sont commerciaux et utilisés sans purification supplémentaire.

Les solvants utilisés lors de la séparation ou de la purification (colonne chromatographique) sont distillés à pression atmosphérique à l'aide d'une colonne.

Le gel de silice utilisé pour la chromatographie sur colonne présente une granulométrie de 0.063-0.2 mm (70-230 mesh) Merck-gel de silice 60.

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaques de silice Kieselgel 60 F254 Art. 5719 Merck.

Les produits sont révélés par extinction de fluorescence en lumière UV à 254 nm, fluorescence en lumière UV à 366 nm et par le réactif au molybdate d'ammonium (100 g de molybdate d'ammonium + 1000 ml H₂O/H₂SO₄ concentré). Ce réactif révèle beaucoup de composés organiques après pulvérisation et chauffage de quelques minutes.

Les chromatographies préparatives sur couche épaisse (CCE) ont été réalisées sur plaques de silice Kieselgel 60 PF254 Art. 7747 Merck.

III.2. Appareils utilisés

Les spectres de RMN ¹H (400 MHz ou 200 MHz) et du carbone ¹³C (50.2 MHz ou 100.61 MHz) ont été enregistrés sur un appareil Bruker AC 400 ou DPX 200 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne. Les constantes de couplage J ont été exprimées en Hertz (Hz).

Les spectres en lumière infrarouge (IR) ont été réalisés sur un spectrophotomètre GENESIS M FTIR de Marque Mattson, monofaisceau, nombre de scan : 32. Les bandes d'absorptions sont exprimées en cm⁻¹.

Le spectre en lumière ultra - violette (UV) a été enregistré sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 5 UV/visible. L'échantillon est en solution dans le méthanol et est placé dans une cuve en quartz de trajet optique 1 cm.

Les analyses élémentaires ont été effectuées sur un appareil Leco Corporation ST. Joseph MI USA. Leco CHN -900.

Le spectre de masse a été effectué sur un appareil de type AEI MS-50 pour l'impact électronique (IE).

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil :Wagner Emunz Nr 6666, Heizbank, System Kofler Type WME.

Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés sur un polarimètre de type : SCHMDT HAENSCH 22955.

Les indices de réfraction ont été mesurés sur un réfractomètre de type : Abbe Réfractometer 1T/4T, Atago.

IV. TESTS PHYTOCHIMIQUES

De nos jours, la découverte de ressources naturelles du monde végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Ces composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à caractériser les différentes catégories de molécules existantes dans la plante. Ces dernières peuvent servir, non seulement à obtenir des principes actifs utilisés comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matériaux économiques.

Pour cela, toutes les parties de *Globularia alypum* L. et *Ruta Chalepensis* L. (feuilles (F), tiges, grains (T) et racines (R)) ont été soumises aux tests phytochimiques. Au cours de ces tests, trois solvants de polarité croissante (éther diéthylique (S1), éthanol (S2) et eau (S3)) ont été utilisés pour l'extraction des différentes familles de composés chimiques.

Dans un ballon monocol, surmonté d'un appareil soxhlet et d'un réfrigérant, mettre 50 g de matière végétale (contenue dans une cartouche en papier) dans le soxhlet et 300 ml de solvants dans le ballon. Porter l'ensemble à reflux jusqu'à épuisement total (voir les schémas de l'extraction dans l'annexe A). Les extraits obtenus sont conservés dans des flacons en verre, fermés et gardés dans le réfrigérateur.

Le rendement de l'extraction **R** est exprimé par l'expression suivante :

$$R = (m/m_0) \times 100$$

m : masse en gramme de l'extrait obtenu après évaporation du solvant;

m₀ : masse en gramme de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction.

IV.1. Produit végétal épuisé avec l'éther diéthylique

Les extraits obtenus (*Globularia alypum* et *Ruta chalepensis*) sont soumis aux tests suivants :

A. Terpènes- huiles volatiles

Evaporer 20 ml de la solution étherée. Le résidu ainsi obtenu est dissout dans l'éthanol. La solution éthanolique obtenue est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme.

B. Acides gras :

Acidifier la solution aqueuse alcaline, puis l'extraire avec l'éther diéthylique. La solution étherique est ensuite concentrée à sec, un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

C. Stérols et stéroïdes

Deux essais ont été effectués :

- Evaporer 10 ml d'extrait étherique, traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre puis filtrer. Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique et ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter puis laisser reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 mn à 21°C).
- Evaporer l'extrait étherique correspondant à 10 ml puis dissoudre le résidu obtenu dans 0,5 ml d'anhydre acétique et 0,5 ml chloroforme. Traiter le filtrat avec le réactif de **Liebermann Burchardt**. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration verte - violette ou verte - bleue.

D. Alcaloïdes bases

Evaporer 10 ml de solution étherée, dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml de HCl (2%), ajouter à la solution aqueuse alcaline 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer. La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

E. Flavonoïdes

Traiter 3 ml d'extrait éthérique avec 1 ml de HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de quelques minutes.

F. Coumarines

Deux essais ont été réalisés :

- Evaporer 5 ml de la solution extractive éthérée. Dissoudre le résidu dans 1 à 2 ml d'eau chaude. Diviser le volume en deux parties. Prendre le demi-volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 ml de NH_4OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et les examiner sous la lumière UV. Une fluorescence intense indique la présence de coumarines.
- Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et placer dans un bain-marie pendant quelques minutes. L'examen sous UV, donne une fluorescence intense.

G. Emodols

Evaporer 3 ml de l'extrait éthérique, dissoudre le résidu dans 1 ml de NH_4OH , ensuite traiter la solution avec la réaction de **Bontrager**, un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orange rouge au violet pourpre.

IV.2. Produit végétal épuisé avec l'éthanol

Les extraits sont soumis aux tests suivants, en plus des tests de stérols, des stéroïdes et des flavonoïdes.

A. Alcaloïdes sels

Deux essais ont été réalisés :

- Evaporer 20 ml de la solution éthanolique. Ajouter 5 ml d'HCl (10%) au résidu et chauffer dans un bain-marie. Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes de solution de NH_4OH (10%) jusqu'à pH 9. Extraire la solution avec l'éther diéthylique, ensuite concentrer à sec. Dissoudre le résidu dans du HCl (2%). Caractériser les alcaloïdes avec les réactifs de **Mayer** et **Wagner**.

- Evaporer 20 ml de la solution éthanolique à sec. Ajouter 5 ml de HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain- marie. Filtrer le mélange puis diviser le filtrat en deux parties égales. Traiter la première avec quelques gouttes du réactif de **Mayer** et la seconde avec le réactif de **Wagner**.

Observation : Présence de turbidité ou précipitation.

(+) est enregistré si le réactif produit une légère opacité;

(++) est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation;

(+++) est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd.

B. Tanins

A 1 ml de solution alcoolique, ajouter 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire, verte ou bleu-verte et un précipité. Selon que les tanins sont cathéchiques, galliques ou éllagiques.

C. Composés réducteurs

Deux essais ont été réalisés :

- Traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de **Fehling** puis chauffer, un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique.
- Traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec le réactif **Keller kiliani**. Un test positif est révélé par la formation d'un anneau brun rouge, et la solution acétique se colore lentement en bleu-vert.

D. Anthracénosides , coumarines et anthocyanosides

Pour les Anthracénosides, Coumarines et Anthocyanosides nous avons procédé de la manière suivante : En premier lieu, prendre 25 ml de l'extrait éthanolique en présence de 15 ml de HCl (10%), porter à reflux pendant 30 mn. Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 ml d'éther. Traiter les deux phases séparément.

◆ **Anthracénosides**

Traiter 8 ml de la solution extractive étherée par le réactif de **Borntrager**. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangé - rouge au violet - pourpre.

◆ **Coumarines**

Deux essais ont été réalisés :

- Evaporer 5 ml de la solution extractive étherée. Dissoudre le résidu dans 1 à 2 ml d'eau chaude. Diviser le volume en deux parties. Prendre le demi volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 ml de NH_4OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et les examiner sous la lumière UV. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.
- Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et placer dans un bain-marie pendant quelques minutes. L'examen sous UV, donne une fluorescence intense.

◆ **Anthocyanosides**

Doser la solution aqueuse acide avec une solution de NaOH. S'il y a un virage de couleur en fonction du pH, la présence des anthocyanosides est confirmée.

- $\text{pH} < 3$, la solution prend une coloration rouge.
- $4 < \text{pH} < 6$, la solution prend une coloration bleue.

IV.3. Produit végétal épuisé avec de l'eau à chaud

Les extraits sont soumis aux tests suivants en plus des tests des flavonoïdes et des tanins.

A. Amidon

Traiter 5 ml de l'extrait avec le réactif d'amidon. L'apparition d'une coloration bleue violacée indique la présence d'amidon.

B. Composés réducteurs

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse 5 à 8 gouttes de liqueur de **Fehling**. Chauffer la solution. Un précipité rouge brique marque la présence des hydrates de carbones.

C. Saponosides

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse un peu d'eau et ensuite agiter d'une manière forte. Une écume persistante confirme la présence des saponosides. Abandonner le mélange pendant 20 mn et classer la teneur en saponosides :

- ✓ Pas de mousse \Rightarrow test négatif
- ✓ Mousse moins de 1 cm \Rightarrow test faiblement positif
- ✓ Mousse de 1-2 cm \Rightarrow test positif
- ✓ Mousse plus de 2 cm \Rightarrow test très positif

D. Alcaloïdes sels

Mettre 15 ml de l'extrait aqueux dans un ballon bicol. Ajouter NH_4OH (10%) jusqu'à $\text{pH}=9$. Extraire 3×10 ml de chloroforme. Laver la solution chloroformique avec 3×2 ml de HCl (10%). La solution aqueuse de lavage est divisée en trois parties égales. Tester les échantillons avec les réactifs de **Mayer** et de **Wagner**. Le troisième tube est considéré comme témoin.

IV.4. Réactifs de caractérisation

1) Alcaloïdes

▪ Réactif de Mayer :

Dissoudre 1,358 g de HgCl_2 dans 60 ml d'eau. Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un trouble puis un précipité blanc.

▪ Réactif de Wagner :

Dissoudre 2 g de KI et 1,27 g de I_2 dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

2) Stérol et stéroïdes :

▪ Réaction de Liebermann Burchardt :

Mélanger 5 ml de solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposer 30 mn à 21°C. les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace vivant au vert. D'autre part, cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiques et tritérpéniques respectivement les colorations verte-bleue et verte-violette.

3) Anthracénosides, Anthraquinones et Emodols

▪ Réaction de Borntrager :

En milieu alcalin aqueux ces composés donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituant de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacée.

4) Composés réducteurs :

▪ Liqueur de Fehling :

La liqueur de Fehling est un mélange de deux solutions :

- **Fehling A** : dissoudre 0,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 50 ml d'eau distillée.
- **Fehling B** : dissoudre 6,5 g de NaOH et 17,3 g tartrate de sodium dans 35 ml d'eau distillée puis compléter le volume à 50 ml.

Les composés réducteurs donnent avec ce réactif un précipité rouge brique.

▪ Réaction de Keller - Kiliani :

L'addition de 5 ml d'acide sulfurique concentré contenant des traces de sels ferriques à 5 ml d'une solution d'hétérosides dans d'acide acétique concentré contenant également des sels ferriques, conduit à la formation d'un anneau brun-rouge. La solution acétique se colore lentement en bleu-vert.

5) Amidon :

▪ **Le réactif d'amidon :**

Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium. Chauffer pendant 5 mn. Diluer jusqu'à 500 ml.

Chauffer 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition. Ajouter le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue - violacée.

V. RECHERCHE DES COMPOSES CHIMIQUES DE *Globularia alypum* L.

V.I. Extractions

Les extractions sont faites sur les différentes parties de la plante à savoir : les feuilles, les tiges (petites tiges vertes), les grains et les écorces des racines.

Une quantité de matière végétale sèche broyée, est mise dans un ballon, à laquelle, nous avons ajouté un mélange d'acétone - eau (60-40%). Le tout est mis à reflux et ceci en mettant au dessus du ballon, un réfrigérant. L'extrait obtenu est filtré. Cette extraction est refaite deux fois au marc pour épuiser la matière végétale.

Après avoir éliminé l'acétone, sous vide, nous avons fait une série d'extraction liquide - liquide sur la phase aqueuse, en utilisant plusieurs solvants à polarité croissante (l'hexane ou l'heptane, l'éther et l'acétate d'éthyle). Ceci est fait dans une ampoule à décanter. Afin d'épuiser la phase aqueuse, l'extraction liquide - liquide est refaite trois fois pour chaque solvant. Après l'extraction à l'acétate d'éthyle, l'eau de la phase aqueuse est éliminée. Nous avons récupéré un extrait solide. Ce dernier est épuisé par le méthanol (infusion à température ambiante), nous avons récupéré une fraction solide après filtration et évaporation du méthanol. A la fin, il restait un solide non soluble dans le méthanol. Les détails de cette extraction sont donnés sous forme de schéma (voir annexe A).

Nous désignons par :

Extrait 1 : extrait à l'heptane ou hexane ;

Extrait 2 : extrait à l'éther ;

Extrait 3 : extrait à l'acétate d'éthyle ;

Extrait 4 : extrait au méthanol (à froid) ;

Extrait 5 : extrait non soluble dans le méthanol.

V.2. Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles, des tiges, des grains et des racines (écorces de racines) de *Globularia alypum* L. et isolements du composé 3

Les extraits à l'acétate d'éthyle ont subi des chromatographies sur colonne en utilisant la silice. L'éluant utilisé pour 1 gramme d'extrait est un mélange d'acétate d'éthyle (A.E) et de méthanol (MeOH) : 100 ml A.E, 100 ml A.E – MeOH (98 – 2), 100 ml A.E – MeOH (95 – 5), 400 ml A.E – MeOH (90 – 10), 100 ml A.E – MeOH (85 – 15), 200 ml A.E – MeOH (80 – 20), 100 ml A.E – MeOH (75 – 25), 200 ml A.E – MeOH (50 – 50).

Nous avons regroupé les fractions en fonction de leurs Rf après analyse par CCM. Le Rf est le facteur de rétention. Les constituants d'un mélange sont caractérisés par le facteur de rétention Rf calculé par la formule :

$$\text{Rf} = \text{distance parcourue par le composé} / \text{distance parcourue par le solvant.}$$

Rf dépend des constituants analysés, de l'adsorbant et du système d'éluion.

◆ Pour 2,2 gramme de l'extrait 3 des feuilles, nous avons obtenu 07 fractions (tableau 13).

Tableau 13 : Fractionnement de l'extrait 3 des feuilles de *Globularia alypum* L.

Fraction	F ₃₋₁	F ₃₋₂	F ₃₋₃	F ₃₋₄	F ₃₋₅	F ₃₋₆	F ₃₋₇
Masse (g)	0.11	0.08	0.27	1.25	0.09	0.26	0.10

La CCM a montré que la fraction F₃₋₄ de masse 1.25 g correspond à une mono tache (ceci a été confirmé par une CCM à double dimension.) qui correspondait à la *Globularine 3*.

Cette chromatographie sur colonne a été faite plusieurs fois, ce qui nous a permis de calculer un rendement en globularine moyen.

◆ Pour 1.0 gramme de l'extrait 3 des tiges, nous avons obtenu 6 fractions (tableau 14).

Tableau 14 : Fractionnement de l'extrait 3 des tiges de *Globularia alypum* L.

Fraction	T ₃₋₁	T ₃₋₂	T ₃₋₃	T ₃₋₄	T ₃₋₅	T ₃₋₆
Masse (g)	0.04	0.13	0.01	0.07	0.52	0.18

La fraction T₃₋₅ de masse 0.52 g correspond à la *Globularine 3*.

◆ Pour 1.0 gramme de l'extrait 3 des grains, nous avons obtenu 7 fractions (tableau 15).

Tableau 15 : Fractionnement de l'extrait 3 des grains de *Globularia alypum* L.

Fraction	G ₃₋₁	G ₃₋₂	G ₃₋₃	G ₃₋₄	G ₃₋₅	G ₃₋₆	G ₃₋₇
Masse (g)	0.06	0.10	<0.01	0.15	0.51	0.01	0.14

La fraction G₃₋₅ de masse 0.51 g correspond à la *Globularine 3*.

◆ Pour 0.40 gramme de l'extrait 3 des racines, nous avons obtenu 6 fractions (tableau 16).

Tableau 16 : Fractionnement de l'extrait 3 des racines de *Globularia alypum* L.

Fraction	R ₃₋₁	R ₃₋₂	R ₃₋₃	R ₃₋₄	R ₃₋₅	R ₃₋₆
Masse (g)	0.04	0.04	0.09	0.08	<0.01	0.10

La fraction R₃₋₄ de masse 0.08 g correspond à la *Globularine 3*.

V.3. Isolements du composé 63

Le composé 63 (mannitol) est obtenu par cristallisation dans le méthanol à partir de l'extrait 5 des différentes parties de la plante. On l'a purifié par recristallisation.

V.4. Isolements du composé 64 à partir des feuilles

Une masse de 5.6 g de l'extrait 4 issu des feuilles de *Globularia alypum*, est mise à macérer dans 50 ml d'acétone à froid. Après filtration et évaporation de l'acétone, nous avons récupéré deux fractions :

- La fraction soluble dans l'acétone E₄₋₁ de masse 1.37g ;
- La fraction non soluble dans l'acétone E₄₋₂ de masse 4.23g.

La fraction E₄₋₁ est mélangée aux fractions F₃₋₂, F₃₋₃, F₃₋₅, F₃₋₆ et F₃₋₇. Le mélange (EF) obtenu (2.17 g) a subi une chromatographie sur colonne en utilisant la silice. L'éluant utilisé est le même que celui utilisé dans les chromatographies sur colonne précédentes. Nous avons obtenu 6 fractions (tableau 17).

Tableau 17 : Fractionnement du mélange EF.

Fraction	EF ₁	EF ₂	EF ₃	EF ₄	EF ₅	EF ₆
Masse (g)	0.11	0.18	0.23	0.34	0.57	0.62

La fraction EF₄ correspond au composé 3.

Après évaporation du solvant, les fractions sont stockées dans le réfrigérateur. Après trois mois, il s'est formé des cristaux blancs (ayant pour masse 60 mg) sur les parois internes du ballon contenant la fraction EF₁. Nous avons effectué une CCM. Cette dernière, a montré que ces cristaux correspondent à un seul composé qui est le produit 64 (acide crotonique).

V.5. Isolements d'autres composés non identifiés

Deux autres composés ont été isolés de *Globularia alypum*, que nous n'avons pas encore identifié.

- Premier composé (EF₅₁) est obtenu par purification de la fraction EF₅ (158 mg) en utilisant 4 plaques de CCE. L'éluant utilisé est A.E / MeOH (90 :10). Nous avons obtenu trois fractions :
 - ◆ EF₅₁ (60.0 mg) : monotache en CCM (Rf = 0.23 dans le même système d'éluant);
 - ◆ EF₅₂ (10.1 mg) : monotache en CCM qui correspondait au composé 3;
 - ◆ EF₅₃ (9.0 mg) : mélange.
- Deuxième composé (T₃₋₄₋₁) est obtenu par purification de la fraction T₃₋₄ (70 mg) en utilisant deux plaques CCE. L'éluant utilisé est A.E / MeOH (90 :10). Nous avons obtenu deux fractions :
 - ◆ T₃₋₄₋₁(21.6 mg) : monotache en CCM (Rf = 0.62 dans le même système d'éluant);
 - ◆ T₃₋₄₋₂ (38.4 mg) : monotache en CCM qui correspondait au composé 3.

VI. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES DE *Ruta chalepensis* L.

De part la volatilité des composés considérés, l'extraction, souvent délicate, est l'étape cruciale. L'hydrodistillation est une méthode simple et assez efficace. La plante dans ce cas, est au contact de l'eau qui est directement chauffée. Les vapeurs refroidies décantent, l'huile essentielle surnageante qui est séparée de la phase aqueuse.⁷¹ Toutefois, ce chauffage assez conséquent, 100°C en milieu aqueux, peut provoquer des modifications chimiques ; ce qui

aboutit à la formation de nouvelles substances (réarrangement ou destruction de certaines molécules).

Technique d'extraction : hydrodistillation ou méthode de Moritz

Le Montage utilisé est constitué d'un ballon de deux litres contenant la matière végétale et l'eau, posé au-dessus d'une source de chaleur et surmonté d'une colonne à distillation. Cette dernière est reliée à son tour à un réfrigérant qui condense les vapeurs que l'on recueille (Annexe A). Cette phase est séchée sur du sulfate de magnésium. L'échantillon d'huile essentielle est conservé à -18°C jusqu'à analyse. Les huiles obtenues possèdent des aspects physiques allant du jaune pâle huileux au jaune foncé visqueux.

La détermination des indices physicochimiques de l'huile essentielle a été réalisée suivant la norme AFNOR.¹⁸⁹

VII. TECHNIQUES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

L'identification des constituants nécessite plusieurs techniques chromatographiques et une ou plusieurs techniques spectroscopiques.

La chromatographie en phase gazeuse (CG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La détection, qui est appliquée à la quasi-totalité des molécules organiques, est faite à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme.

La revue publiée par Bartle et Myers.¹⁹¹ rappelle que si la création de la chromatographie gazeuse est attribuée à A.T. James et A. J. P. Martin (1952), le concept théorique avait été énoncé dès 1941 par le même A. J. P. Martin et R. L. M. Syngé.

La chromatographie en phase gazeuse (CG) permet d'opérer la séparation des composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit.¹⁹⁰

Les phases stationnaires peuvent être de plusieurs type.^{192,193}

Pour une identification, il est fréquent d'observer des variations, parfois importantes, lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus en laboratoire à ceux trouvés dans la littérature.

$$IR_x = [100 (TR_x - TR_n) / (TR_{n+1} - TR_n)] + 100n$$

TR_n et TR_{n+1} sont respectivement les temps de rétention des alcanes de référence comportant n et $n+1$ atomes de carbone et encadrent le temps de rétention choisi.

La composition chimique des huiles essentielles a été déterminée par la technique de chromatographie en phase gazeuse (CG) et la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG/SM) sous les conditions opératoires suivantes :

Pour la CG – FID :

- La détermination des pourcentages relatifs des constituants et la comparaison entre les différents chromatogrammes ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse de type SHIMADZU – GC 17A, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et muni d'une colonne capillaire en silice fondue de type DB35 – MS, de 30 m de longueur, 0.25 mm de diamètre interne et 0.25 μm d'épaisseur de film. La température de la colonne est programmée de 60 °C à 220°C à raison 5°C /min et en isotherme (220°C) pendant 2min. Les températures de l'injecteur et le détecteur sont fixées à 270°C. Le débit du gaz vecteur (N_2) est fixé à 1.8 ml/min.
- Analyse qualitative des huiles essentielles : l'analyse de l'huile essentielle a été effectuée à l'aide d'un chromatographe de type DANI, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et muni d'une colonne capillaire en silice fondue de type DB5 – MS (longueur : 50 m et de 0.32 mm de diamètre intérieur, l'épaisseur du film est de 0.25 μm). La température de la colonne est programmée de 50°C pendant 5 min à 228 °C à raison de 4°C/min. Les températures de l'injecteur et le détecteur ont été maintenues respectivement à 230 et 235°C. Le gaz vecteur utilisé est l'azote (1.2 ml/min). Une solution de calibration interne contenant un mélange de n - alcanes (C_9 à C_{20}) est injectée dans les mêmes conditions pour calculer les indices de rétentions des différents pics du chromatogramme de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis*.

Pour la CG – SM :

L'huile essentielle a été analysée sur un chromatographe de type Varian CP 3800, équipé d'une colonne capillaire DB5 – MS (longueur : 30 m et de 0.25 mm de diamètre intérieur, l'épaisseur du film est de 0.25 μm) couplé à un spectromètre de masse (SM) de type Varian Saturn 2000, avec un détecteur à impact électronique. Les spectres ont été enregistrés à 70 eV. Les conditions analytiques sont les suivantes : température de l'injecteur :

220 °C; température du four : 80°C (1min), 80 à 300°C à raison de 10°C/ min et en isotherme (300°C) pendant 30 min. Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1 ml/min (voir quelques chromatogrammes et les spectres de masse en Annexe E).

Identification des constituants : les différents constituants de huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux des composés des bases de données **Nist 98** et **Replib** du spectromètre de masse **CG/SM**. L'identification de la plupart des molécules a été confirmée par comparaison de leurs indices de rétention avec ceux connus dans la littérature.^{76, 194-201}

VIII. L'ETUDE DE L'EFFET ANTIDIABETIQUE DE LA GLOBULARINE ISOLEE DES FEUILLES DE *Globularia alypum* L. CHEZ DES RATS « WISTAR »

Cette étude a été réalisée au département de biologie – faculté des sciences – université de Tlemcen sur l'activité antidiabétique d'un irridoïde glucosidique, isolé des feuilles de *Globularia alypum* « la globularine ».

VIII.1. Animaux

Nous avons utilisé pour ce travail des rats, mâles et femelles, de souches «Wistar» (*Rattus norvegicus*), âgés de 2 à 3 mois ayant un poids de 150 à 300 g. Ces animaux sont nourris « ad libitum » avec une alimentation du commerce : ONAB.

Les animaux ont été maintenus dans des cages propres sous des conditions standards de laboratoire et ont été traités et manipulés selon les normes dictées. La répartition des lots a été faite en fonction de l'expérience.

VIII.2- Evaluation de la toxicité de la globularine chez les rats

Des femelles à jeûne pendant 16 heures, de poids corporel compris entre 150 et 200 g ont été utilisées. Différentes doses 300, 600, 800 et 1000mg/kg de la globularine ont été administrées par injection intra péritonéale unique à différents lots de rats (2 rats par lot), le lot témoin reçoit du sérum physiologique à 0.9% (5ml/kg de poids corporel).

Le comportement général et la mortalité des animaux ont été observés périodiquement pendant 48 heures. L'observation des animaux est poursuivie une fois par jour pendant 14 jours.

A la fin de l'expérience les animaux ont été pesés et sacrifiés.

VIII.3. Induction du diabète expérimental :

Un diabète expérimental a été provoqué chez des rats à jeun (16 heures) mâles et femelles par unique injection intra péritonéale de la streptozotocine (Fluka, $C_8H_{15}N_3O_7$) à une dose de 60mg/kg qui est préparée, juste avant l'administration, dans un tampon citrate (0.01M, pH 4.5). Le tampon citrate (5ml/kg) a été injecté aux rats témoins..

Après 72h de l'injection de la streptozotocine, les rats qui ont une glycémie supérieure ou égale à 3g/l sont considérés comme diabétiques et ont été utilisés pour réaliser ces expériences.

VIII.4. Etude aiguë de l'activité antidiabétique de la globularine

Des rats mâles diabétiques et normaux ont été soumis à un jeun de 16 heures. Le poids des rats a été déterminé le jour même de l'expérience, avant l'administration des substances à tester. Les substances à tester ont été administrées par voie intra péritonéale (injection unique). Six groupes de rats (5 rats par groupe) ont été utilisés : 3 normo glycémiques et 3 diabétiques.

Groupe 1 : Normaux témoins : sérum physiologique à 0.9%, (5ml/kg).

Groupe 2 : Contrôle positif : glibenclamide à 0.6mg/kg.

Groupe 3 : Normaux : la globularine 100mg/kg.

Groupe 4 : Diabétiques témoins : sérum physiologique à 0.9% (5ml/kg).

Groupe 5 : Diabétiques contrôle positif ; glibenclamide 0.6mg/kg.

Groupe 6 : Diabétiques : la globularine 100mg/kg.

Le sang a été prélevé à partir de l'extrémité de la queue à 0 min (avant l'injection) et à 60, 120, 180, 240, 360 et 480mn (après injection).

La glycémie a été mesurée directement après prélèvement par des bandelettes Accu Chek active et lecteur glycémie Accu Chek.

VIII.5. Test de tolérance au glucose chez des rats normaux (TTG)

Un test de tolérance au glucose a été réalisé sur 3 groupes de rats mâles normaux glycémiques. Après un jeun de 16 heures, les rats ont été chargés d'une solution de glucose (2.5g/kg), après 90 min, nous avons effectué les administrations des molécules suivantes ; NaCl (0.9% ; 5ml/kg), le glibenclamide (0.6 mg/kg) et la globularine (100 mg/kg).

Un échantillon de sang a été collecté de l'extrémité de la queue à 0 min (avant gavage) et à 30, 60, 90, 120, 180 min après gavage. La glycémie est mesurée par lecteur glycémie Accu Chek.

VIII.6. Etude sub - chronique de l'activité antidiabétique de la globularine

Des rats mâles et femelles diabétiques et normaux ont été utilisés, le nombre total est de 28 rats répartis de la manière suivante :

Groupe 1 (3 mâles+3 femelles) : utilisés comme témoins des normaux, ils sont traités par du sérum physiologique à 0.9% (5ml/kg : injection intra péritonéal, 2 fois/jour).

Groupe 2 (3 mâles+3 femelles) : utilisés comme témoins des diabétiques, ils sont traités par du sérum physiologique à 0.9% (5ml/kg : 2 fois/jour).

Groupe 3 (4 mâles+4 femelles) : utilisés comme diabétiques - contrôle positif, ils sont traités par du glibenclamide (0.6mg/kg : 2 fois/jour).

Groupe 4 (4 mâles+4 femelles) : utilisés comme diabétiques, ils sont traités par la globularine (100mg/kg : 2 fois/jour).

Les rats des différents lots ont été traités de la même manière durant une période de 7 jours. La glycémie des rats journalière a été déterminée après la première injection, en prélevant du sang de l'extrémité de la queue à l'aide d'un glucomètre (Accu Chek).

Le pourcentage de diminution de la glycémie a été calculé selon la formule suivante :

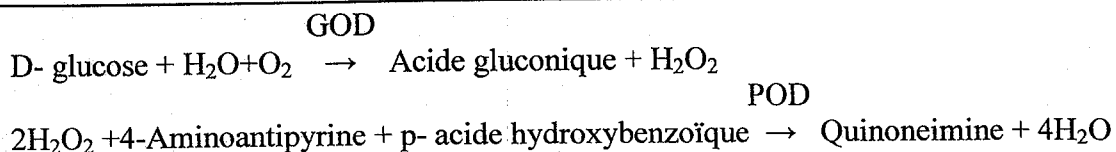
$G\% = \frac{G_t - G_0}{G_0} \times 100$; avec G_t = glycémie au temps t , G_0 = glycémie au temps ($t=0$).

Après la dernière injection, les rats ont été privés d'aliments pendant toute une nuit.

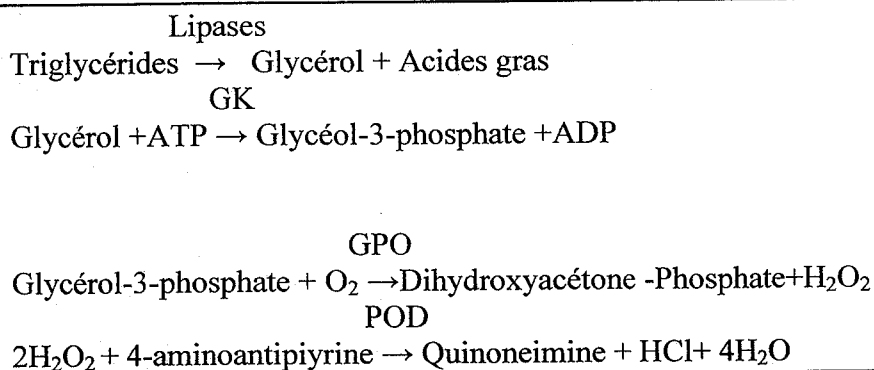
Un prélèvement du sang a été effectué le matin à partir du sinus rétro orbital, les paramètres suivants ont été dosés sur sérum sanguin : la glycémie à jeun, les triglycérides et le cholestérol total.

Les dosages ont été réalisés comme suit :

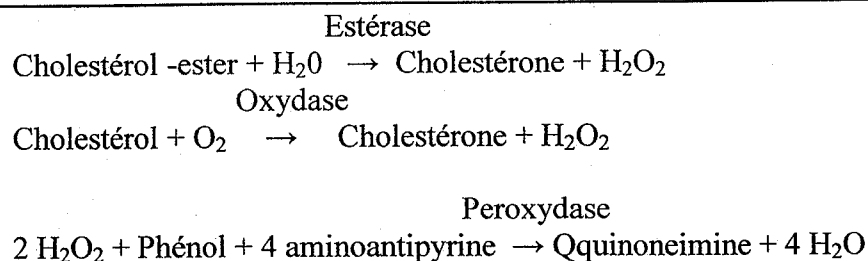
Le dosage du glucose sérique a été réalisé par un test enzymatique colorimétrique (Kit Quimica Clinica Aplicada S.A) basé sur la méthode de Trinder (1969) dont le principe est le suivant :



Le dosage des triglycérides sériques a été réalisé par un test enzymatique colorimétrique (Kit Quimica Clinica Aplicada S.A) basée sur la méthode de Fassati et Prencipe (1982), dont le principe est le suivant :



Le dosage du cholestérol total sérique a été réalisé par un test enzymatique colorimétrique (Kit SARL Prochima,) basée sur la méthode de Fasce (1982), dont le principe est le suivant :



La lecture a été réalisée par un spectrophotomètre visible. L'intensité de la coloration mesurée à 505 nm est proportionnelle à la concentration en produit coloré.

L'étude statistique de comparaison entre les quatres lots est réalisée par un test de Student de distribution bilatérale et de type hétéroscédastique (type 3). Ce test nous donne le degré de signification P. On dit que la différence est :

- Peu significative Si $P < 0,05$ (*);

- Significative Si $P < 0,01$ (**);
- Très significative Si $P < 0,001$ (***)
- Hautement significative Si $P < 0,0005$ (****)

Les résultats sont représentés sous la formule : Moyenne \pm Erreur standard (ES).

IX. ETUDE DU POUVOIR ANTIMICROBIEN DE *Ruta chalepensis* L.

La présence des composés volatiles, des flavonoïdes, des saponosides, des tanins, des stérols et des stéroïdes peut conférer à la plante une activité antimicrobienne.

Cette étude a été réalisée au département de biologie – faculté des sciences – université de Tlemcen sur la résistance des antibiotiques aux bactéries hospitalières, nous avons jugé utile de tester les huiles essentielles (HE1, HE2) et les extraits des différentes parties de *Ruta chalepensis* (RCS1F, RCS1T, RCS1G, RCS1R, RCS2F, RCS2T, RCS2G, RCS2R, RCS3F, RCS3T, RCS3G et RCS3R) vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries, levures et moisissures. Cette activité est ensuite comparée avec celle des antibiotiques et des antifongiques couramment employés.

IX.1. Provenance des germes

Les souches pathogènes utilisées sont indiquées dans le tableau 18. Elles sont celles qui causent les maladies courantes (infections urinaires, broncho-pulmonaires, cutanées, digestives, causées par les bactéries). Ce sont aussi des contaminants fréquents (les moisissures) provoquant d'importantes mycoses (les levures). Concernant, les bactéries hospitalières, elles sont isolées des dispositifs médicaux (cathéters, sondes)

IX.2. Choix des antibiotiques et des antifongiques

La disponibilité des souches a été testée vis-à-vis de deux antibiotiques et de deux antifongiques, ceci en fonction de ceux utilisés au laboratoire de microbiologie à l'hôpital de Tlemcen, et aussi en fonction de leur disponibilité (tableau 19)

Tableau 18: Provenance des germes étudiés

Souches utilisées	Origine
<p align="center"><u>BACTERIES :</u></p> <p align="center">Bactéries à GRAM (-) :</p> <p align="center"><i>Pseudomonas aeruginosa (Pa) ATCC 27853</i></p> <p align="center"><i>Escherichia coli (Ec) ATCC 25922</i></p>	<p align="center">Souches pures fournies par l'institut Pasteur de Paris (IPP)</p>
<p align="center">Bactéries à GRAM (+) :</p> <p align="center"><i>Staphylococcus aureus (St) ATCC 25923</i></p> <p align="center"><i>Listeria monocytogens (LM) ATCC 19115</i></p>	
<p align="center"><u>LEVURES :</u></p> <p align="center"><i>Candida albicans (Ca) 444</i></p>	<p align="center">I.P.P (Institut Pasteur de Paris)</p>
<p align="center"><u>MOISSISSURES :</u></p> <p align="center"><i>Aspergillus flavus (Af)</i></p> <p align="center"><i>Aspergillus Niger (An)</i></p> <p align="center"><i>Alternaria sp. (A)</i></p> <p align="center"><i>Trichoderma sp. (T)</i></p>	<p align="center">Souches isolées et purifiées au Laboratoire de Microbiologie, Département de chimie – Université de Tlemcen</p>

Tableau 19 : Les antibiotiques (ATB) et les antifongiques (ATF) utilisés.

Groupe microbien	ATB et ATF	Sigle	Charge du disque
Bactéries	Gentamicine	GT	100 UI
	Pipéracilline	Pip	100 µg
Champignon	Amphotéricine B	AmB	100 µg
	Econazole	EC	50 µg

IX. 3. Méthode utilisée

- Pour les bactéries, la méthode utilisée est celle de la diffusion des ATB sur gélose ou méthode des disques. Après la préparation des inoculums, et l'ensemencement de la gélose Muller-Hinton (MH) par inondation l'excès du liquide est aspiré et la surface de la gélose est laissée sécher 15 à 20 minutes à $37\pm 1^\circ\text{C}$. A l'aide d'un distributeur de disques, on place sur la surface de la gélose les différents disques d'ATB choisis. Les boîtes ont été laissées durant 20 minutes à la température ambiante pour permettre une bonne diffusion de l'ATB. Elles ont été ensuite incubées à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 heures. La lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque, puis comparée à une échelle étalonnée fournie par l'institut Pasteur.
- Pour les levures et les moisissures, la même technique de l'antibiogramme a été utilisée. Les ATF sont déposés sous forme de disques à la surface du milieu de culture. Ensuite, les boîtes sont incubées à $30\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 à 48 heures pour les levures et à $25\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 10 à 12 heures pour les moisissures.

IX.4 Etude du pouvoir antimicrobien des extraits et des huiles essentielles issus de *Ruta chalepensis* L.

Les techniques utilisées sont celles de la diffusion sur gélose ou méthode des disques (en milieux solides). Cette méthode se base sur la diffusion de l'extrait testé dans la gélose. Elle consiste à déposer à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé par la suspension de germes choisis, des disques de papier filtres imprégnés des extraits à tester.

➤ **Méthode utilisée**

Après l'ensemencement du milieu gélosé par l'inoculum préalablement calibré, nous avons déposé à la surface des disques de papier filtre (de 6 mm de diamètre) imprégnés des extraits à raison de 10 µl pour les différents extraits. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm.

IX.5. Détermination des intervalles des CMI par la méthode de contact direct

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle on n'observe pas de croissance visible à l'œil nu ;

Cette technique consiste à disperser l'extrait à des concentrations variables dans le milieu gélosé avant sa solidification.

➤ **Méthode**

Préparation de la solution mère (SM)

A 9 ml d'eau distillée stérile, on ajoute aseptiquement 1ml de notre extrait de façon à ce que le solvant (miscible à l'eau), ne dépasse pas les 5% car, après des essais, on a pu prouver qu'à ce pourcentage le solvant n'agit pas sur la croissance des germes. On agite énergiquement pendant quelques minutes pour disperser l'extrait dans l'eau distillée.

Pour les huiles essentielles, il a été montré qu'une solution d'agar à 0.2 % permet d'obtenir une dispersion stable des huiles essentielles en milieu aqueux, comparable à celle obtenue avec le tween 80 (0.25%) et l'éthanol (0.2%) , pratiquement aussi homogène que lors d'une solubilisation par l'éthanol absolu.

Alors, on prépare une solution d'agar à 0.2% stérilisée à 120 °C pendant 15 mn. A 9 ml de cette solution, on ajoute aseptiquement 1 ml d'huile essentielle, on agite énergiquement pour disperser l'huile essentielle dans la solution.

On obtient ainsi la solution mère (SM) à partir de laquelle on procédera à des dilutions successives allant de 10^{-2} jusqu'à 10^{-3} .

Dans des tubes contenant chacun 13.5 ml de milieu gélosé et encore en état de fusion, on ajoute aseptiquement 1.5 ml de la « SM » ou des diverses dilutions de façon à obtenir les concentrations finales suivantes en extrait : 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} . Les boîtes témoins sont préparées de la même manière que la méthode précédente. Après passage au vortex, on coule les suspensions dans des boîtes de pétri et on laisse refroidir.

Des souches jeunes sont ensuite ensemencées (en stries pour les bactéries et les levures et en spots pour les moisissures) et incubées (les températures et les temps d'incubation sont déjà cités), après on note le développement ou l'inhibition de chaque germe à diverses concentrations de l'extrait.

Remarque

Les milieux de culture utilisés pour les différentes méthodes sont :

- Muller Hinton pour les bactéries.
- Sabouraud Dextrose Agar + chloramphénicol pour les levures.
- Sabouraud Dextrose Agar pour les moisissures.

IX.6. Préparation des inoculums

a) Bactéries

Les souches conservées dans la gélose nutritive (GN) inclinée à 4°C sont revivifiées dans du bouillon nutritif et incubées à 37±1°C pendant 18 à 24 heures. 0.1 ml de cette culture, est ajoutée à 10 ml de BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Pronadisa Hispanalab, S.A.).

b) Levures

Les souches conservées dans la gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol à 4°C sont revivifiées dans du bouillon nutritif et incubées à 30±1°C pendant 24 à 48 heures. 0.1ml de cette culture est ajoutée à 10 ml d'eau physiologique stérile.

c) Moisissures

L'inoculum se présente sous forme d'une suspension de spores dans de l'eau physiologique stérile à 0,1% de Tween 80²⁰¹. L'inoculum utilisé pour tous les tests, est de l'ordre de 10⁶ à 10⁷ UFC/ml pour les bactéries et les levures et de 10⁸ à 10⁹ spores/ml pour les moisissures.

X. TENEUR DES METAUX LOURDS

X.1- Spectrométrie D'absorption Atomique (SAA)

La spectrométrie d'absorption atomique permet le dosage de nombreux matériaux inorganiques et étudie les émissions ou absorptions de lumière par l'atome libre. Généralement, seuls les électrons externes de l'atome sont concernés.

a) Principe

L'absorption des radiations électromagnétiques des régions visibles et UV du spectre par les atomes libres résulte d'un changement dans la structure électronique. On l'observe lorsque la radiation caractéristique (de résonance en général) d'un élément passe dans un nuage de vapeur atomique de l'échantillon. L'échantillon est vaporisé par aspiration de la solution dans une flamme ou par évaporation d'une surface chauffée électriquement.²⁰²

b) Loi d'absorption en absorption atomique

L'intensité de l'absorption dépend directement du nombre de particules absorbant la lumière. Selon la loi de Beer Lambert, l'absorbance est proportionnelle au coefficient d'absorption spécifique ϵ , au trajet optique l et à la concentration c .

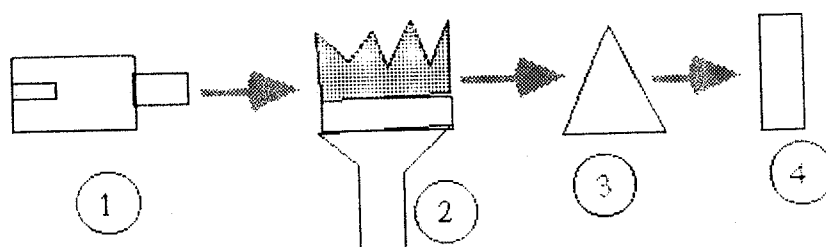
$$A = \epsilon.l.c$$

Où, $A = \log I_0/I$; I = intensité après absorption par les atomes ; I_0 = intensité initiale de la source lumineuse.

Il a été noté qu'en pratique, cette relation n'est pas toujours vérifiée. La courbe d'étalonnage n'est pas toujours une droite surtout si la concentration devient trop élevée. La gamme de dosage est le domaine dans lequel la courbe d'étalonnage est pratiquement une droite. Il est limité pour les faibles concentrations par la limite de détection et pour les fortes concentrations par l'erreur sur la fidélité : à une très forte variation de la concentration correspond une faible variation de l'absorbance. La gamme de dosage est généralement donnée par le constructeur. Elle dépend de la raie de dosage utilisée.²⁰²

c) Appareillage

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose d'une source, d'une lampe à cathode creuse ①, d'un brûleur et un nébuliseur ②, d'un monochromateur ③ et d'un détecteur ④ relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition.²⁰³



d) Lampe à cathode creuse

La lampe à cathode creuse est constituée par une enveloppe de verre scellée et pourvue d'une fenêtre en verre ou en quartz contenant une cathode creuse cylindrique et une anode. La cathode est constituée de l'élément que l'on veut doser. Un vide poussé est réalisé à l'intérieur de l'ampoule qui est ensuite remplie d'un gaz rare (argon ou néon) sous une pression de quelques mm de Hg.

Lorsqu'on applique une différence de potentiel de quelques centaines de volts entre les deux électrodes, une décharge s'établit. Le gaz rare est alors ionisé et ses ions bombardent alors la cathode, arrachant des atomes à celle-ci. Ces atomes sont donc libres et sont excités par chocs : il y a émission atomique de l'élément constituant la cathode creuse. La particularité du rayonnement ainsi émis est qu'il est constitué de raies très intenses et très fines.

e) Nébuliseur

L'échantillon à analyser est en solution. Celle-ci est aspirée au moyen d'un capillaire par le nébuliseur. A l'orifice du nébuliseur, du fait de l'éjection d'un gaz à grande vitesse, il se

créé une dépression (effet Venturi). La solution d'analyse est alors aspirée dans le capillaire et à la sortie, elle est pulvérisée en un aérosol constitué de fines gouttelettes. Cet aérosol pénètre alors dans la chambre de nébulisation dont le rôle est de faire éclater les gouttelettes et d'éliminer les plus grosses. Ce brouillard homogène pénètre alors dans le brûleur.

f) Flamme – atomisation

L'aérosol pénètre dans le brûleur puis dans la flamme. Au bout d'un certain parcours au seuil de la flamme, le solvant de la gouttelette est éliminé, il reste les sels ou particules solides qui sont alors fondus, vaporisés puis atomisés. La flamme air acétylène est la plus répandue et permet de réaliser le dosage de nombreux éléments. Sa température est de 2500°C environ. A la place d'une flamme, on peut également utiliser un four cylindrique en graphite pour atomiser l'échantillon.

g) Monochromateur et amplificateur

Le monochromateur est destiné à défaire la sélection de la longueur d'onde émise, modifiée par la traversée au niveau du brûleur. La réception constituée par un photomultiplicateur associé à un amplificateur linéaire à logarithmique, fournit la valeur de l'absorption. Les principales caractéristiques du dosage et de l'atomisation de nos échantillons sont définies dans le tableau 20 et celles des appareils dans le tableau 21.

Tableau 20: Les conditions d'atomisation pour les éléments traces dosés.

Elément	Raie principale (nm)	Sensibilité (mg/l)	Max absolu (mg/l)
Cu	324.8	0.077	4
Co	228.8	0.12	3.5
Ni	341.5	0.17	5
Pb	283.3	0.45	5
Cd	228.8	0.028	2
Zn	213.7	0.018	0.8
Fe	271.9	0.34	10

Tableau 21: Les caractéristiques des spectromètres d'absorption atomique à flamme*.

Référence de l'appareil I (échantillons de <i>Globularia alypum</i> L.)	Aurora AI 1200 (AlZinc - Ghazaouet)
Référence de l'appareil II (échantillons de <i>Ruta chalepensis</i> L.)	Analyst 300 PerkinElmer (Tlemcen)
Lampe	cathodique HCl
Flamme	acétylène/air

* : Les échantillons issues des deux plantes sont analysés sur deux appareils différents.

X.2. Extraction des métaux lourds

Les techniques d'analyses des métaux lourds consistent essentiellement à transformer les constituants du végétal en sels dosables. Le dosage de ces cations concerne donc la matière minérale c'est-à-dire ce qui reste après l'incinération.

Les différentes parties (fruits (grains), feuilles, tiges et racines) des deux plantes *Globularia alypum* et *Ruta chalepensis* sont broyées pour être ensuite calcinées.

X.2.1. Protocole expérimental de l'incinération

On pèse dans une capsule de porcelaine 25 g de poudre végétale. La capsule est placée dans four tubulaire. Les meilleurs résultats sont obtenus en gardant le four à 700°C pendant 2 heures. Ceci est répété plusieurs fois jusqu'à ce que la masse devienne constante. A la fin, on obtient des cendres blanches friables. L'oxydation des dernières traces du matériel organique est alors réalisée en ajoutant 1 à 2 ml de HNO₃ (1N), après refroidissement de la capsule dans un dessiccateur. On évapore cette dernière à sec sur une plaque chauffante ou au bain de sable et on la replace au four à 700°C pendant deux heures.

X.2.2. Préparation des différentes solutions par attaque acide

Au cours de notre travail, trois solutions acides (solution d'acide chlorhydrique concentrée, solution d'acide nitrique concentrée et l'eau régale) ont été utilisées pour essayer d'extraire la totalité des métaux lourds dans la matière végétale calcinée.

a) Mise en solution des métaux lourds l'acide chlorhydrique (HCl)

Une masse de 0.5 g de cendre a été introduite dans un erlenmeyer, à laquelle on ajoute 5ml de l'acide chlorhydrique concentré HCl (35%). Après avoir fermé l'erlenmeyer, on chauffe à une température entre 40-60°C pendant 8 heures sous une agitation. Après refroidissement, une filtration est effectuée avec un rinçage à l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 25 ml.

b) Mise en solution des métaux lourds par l'acide nitrique (HNO₃)

Une masse de 0.5 g de cendre a été introduite dans un erlenmeyer, à laquelle on ajoute 5 ml de l'acide nitrique concentré HNO₃ (65%). Après avoir fermé l'erlenmeyer, la réaction est abandonnée à température ambiante, pendant 16 heures sous agitation. Puis la réaction est apportée à 70°C dans un bain-marie et suivie d'une agitation pendant 8 heures. Après refroidissement, une filtration est effectuée avec un rinçage à l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 25 ml.

c) Mise en solution des métaux lourds par l'eau régale

Une masse de 0.5 g de cendre a été introduite dans un erlenmeyer où on réalise l'attaque par 5 ml d'eau régale (HNO₃/HCl (1:3)). Après avoir fermé l'erlenmeyer, on chauffe sur plaque chauffante pendant 3 heures. Après refroidissement, une filtration est effectuée avec un rinçage à l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 25 ml.

X.3. Dosage des solutions

Nous avons soumis les solutions préparées des différentes parties nos plantes étudiées aux analyses des métaux lourds (Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Zn et Ni) par spectromètre d'absorption atomique (SAA). Pour ce faire, il est impératif de préparer des solutions étalons de concentrations connues.

X.3.1. Préparation des solutions étalons

Cadmium (Cd)

Une solution étalon de 2 ppm est préparée en pesant exactement 0.54 mg de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 1 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Une troisième solution de 0.5 ppm est préparée par dilution de la précédente.

Cobalt (Co)

Une solution étalon de 3.5 ppm est préparée en pesant exactement 1.41 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 2 ppm est préparée à partir de 57.1 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 1 ppm est préparée à partir de 28.5 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Cuivre (Cu)

Une solution étalon de 10 ppm est préparée en pesant exactement 2.68 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 5 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 2.5 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Fer (Fe)

Une solution étalon de 10 ppm est préparée en pesant exactement 7.00 mg de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 5 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 2.5 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Plomb (Pb)

Une solution étalon de 10 ppm est préparée en pesant exactement 1.57 mg de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 5 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 2.5 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Zinc (Zn)

Une solution étalon de 3.2 ppm est préparée en pesant exactement 1.2 mg de $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 0.8 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 0.2 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon de 0.8 ppm que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Nickel (Ni)

Une solution étalon de 10 ppm est préparée en pesant exactement 4.78 mg de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau. Distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution étalon intermédiaire de 5 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 1 ppm est préparée à partir de 10 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

NOTA : Ces solutions étalons sont utilisées dans le cas du dosage des métaux dans *Ruta chalepensis*. Pour *Globularia*, nous avons utilisé des solutions préparées à partir d'une solution mère de concentration 1g/l (Unité AIZINC - GHAZAOUET)

X.4. Calcul de la concentration des métaux

La teneur ou concentration des métaux dans la matière sèche de l'échantillon, est exprimée comme suit :

$$T(\text{ppm}) = (R \cdot D \cdot X \cdot V) / 100 m$$

R : masse de cendre en grammes contenue dans 100 g de matière végétale sèche ;

D : facteur de dilution ;

X : est la concentration de l'analyte en mg/ml, au niveau de la solution d'attaque;

V : volume en ml de la solution préparée ($V = 25 \text{ ml}$) ;

m : la masse en grammes de la prise d'essai (cendre).

CHAPITRE III

Résultats et Discussions

I. TESTS PHYTOCHIMIQUES

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

I.1. *Globularia alypum* L.

Les résultats concernant le calcul de rendements (%) des différentes extractions faites sur les différents organes de la plante en utilisant des solvant à polarité croissante (éther diéthylique, éthanol et eau), sont donnés dans le tableau 22.

Tableau 22 : Les rendements des extractions faites sur les différents organes de *Globularia alypum* L.

Les extraits Les organes	Extrait \bar{a} l'éther diéthylique	Extrait \bar{b} l'éthanol	Extrait \bar{c} l'eau
Feuilles	3.52	35.73	14.00
Tiges	0.67	11.30	10.63
Grains	12.50	10.83	30.83
Racines	1.20	5.80	1.10

Pour les feuilles, les tiges et les racines les rendements des extraits de l'éthanol comme le montre le tableau sont les plus élevés. Par contre, le rendement le plus élevé des extraits des grains est obtenu pour l'eau. D'autres part, les résultats révèlent que les grains sont plus riches en composés que les feuilles, que les tiges, que les racines.

Les résultats des examens phytochimiques obtenus sur les différents organes de la plante sont résumés dans les tableaux 23, 24 et 25.

Tableau 23 : Les Résultats des tests phytochimiques faits sur les extraits \bar{a} l'éther diéthylique.

Les familles \ Les extraits	Feuilles	Tiges	Grains	Racines
huiles essentielles	-	-	-	-
Stérol et stéroïdes	+	+	-	-
Flavonoïdes	-	-	-	-
Emodols	-	-	-	-
coumarines	+	++	++	+
Alcaloïdes	-	-	-	-
Acides gras	+	-	-	++

Tableau 24 : Les Résultats des tests phytochimiques faits sur les extraits \bar{a} l'éthanol.

Les familles \ Les extraits	Feuilles	Tiges	Grains	Racines
Coumarines	-	++	+	-
Anthracénosides	-	+	-	+
Stérols et stéroïdes	+	++	-	+
Anthocyanosides	+	++	+	+
Tanins	+	+	-	+
Flavonoïdes	+	+	+	+
Alcaloïdes	-	-	-	-
Composés réducteurs	+++	+++	+	+

Tableau 25 : Les Résultats des tests phytochimiques faits sur les extraits de l'eau.

Les Famille \ Les extraits	Feuilles	Tiges	Grains	Racines
Tanins	++	+	++	+
Composés réducteurs	+++	+++	+	++
Alcaloïdes	-	-	-	-
Flavonoïdes	+	-	-	+
Amidon	-	-	-	-
Saponosides	+++	+	+	+++

- : absence ;

++ : présence en quantité moyenne ;

+ : présence en faible quantité ;

+++ : présence en forte quantité

L'analyse de ces résultats expérimentaux nous conduit aux conclusions suivantes :

- Les flavonoïdes, les saponosides, les tanins, Anthracénosides, Anthocyanosides, coumarines, les acides gras, les stérols et stéroïdes sont présents dans la plante étudiée en quantité variable.
- Les saponosides sont présent dans toutes les parties de la plante avec une dominance importante dans les feuilles et les racines.
- Les huiles essentielles, les alcaloïdes, les émодols et l'amidon sont absents dans toutes les parties de la plante.
- La présence des composés réducteurs dans toutes les parties de la plante en quantité variable a été vérifiée par la liqueur de Fehling donnant un précipité rouge brique.

I.2. *Ruta chalepensis* L.

Les rendements (%) des extractions sélectives faites sur les différentes parties de la plante, en utilisant l'appareil de soxhlet sont donnés dans le tableau 26

Une partie de ces extraits est utilisée pour effectuer les examens phytochimiques, et l'autre partie est utilisée pour tester leurs activités antimicrobiennes (**RCS1F, RCS1T, RCS1G, RCS1R, RCS2F, RCS2T, RCS2G, RCS2R, RCS3F, RCS3T, RCS3G et RCS3R**, avec RC : *Ruta chalepensis*, S1, S2, S3 sont respectivement l'éther diéthylique, l'éthanol et l'eau, F, T, G et R sont respectivement feuilles, tiges, grains et racines).

Tableau 26 : Les rendements des extractions faites sur les différents organes de *Ruta chalepensis* L.

Les organes \ Les extraits	Extrait à l'éther diéthylique	Extrait à l'éthanol	Extrait à l'eau
Feuilles	8.36	20.36	9.90
Tiges	1.96	2.30	6.00
Grains	8.84	25.92	13.70
Racines	2.30	3.12	5.70

L'analyse de ces résultats expérimentaux nous conduit aux conclusions suivantes :

- Pour les feuilles et les grains, les rendements des extraits éthanoliques sont plus importants que ceux obtenus par l'eau, ces derniers sont supérieurs à ceux obtenus par l'éther diéthylique. Ceci s'explique par la forte polarité de l'éthanol comparée à celle de l'éther diéthylique, qui permet d'extraire la totalité des composés présents dans la plante qui ne sont pas extraits par l'éther diéthylique. L'eau est un solvant très polaire, il extrait surtout les composés fortement polaires.

- Pour les tiges et les racines, les résultats obtenus montrent que les rendements obtenus par l'eau sont supérieurs à ceux obtenus par l'éthanol, supérieurs à ceux obtenus par l'éther diéthylique. Ceci peut être expliqué par le fait que ces parties de la plante contiennent beaucoup plus de composés fortement polaires que ceux moyennement ou non polaires.

- D'autres part, les résultats révèlent aussi que les grains sont plus riches en composés que les feuilles, que les racines et les tiges.

Les résultats des examens phytochimiques obtenus sur les différents organes de la plante sont résumés dans les tableaux 27, 28 et 29.

Tableau 27 : Les Résultats des tests phytochimiques faits sur les extraits à l'éther diéthylique.

Les familles \ Les extraits	Feuilles	Tiges	Grains	Racines
huiles essentielles	+++	++	+++	+
Stérol et stéroïdes	+++	+++	+++	+
Flavonoïdes	-	-	-	-
Emodols	-	-	-	+
coumarines	++	+	++	+++
Alcaloïdes	++	++	+++	+++
Acides gras	+	+	++	-

Tableau 28 : Les Résultats des tests phytochimiques faits sur les extraits à l'éthanol.

Les familles \ Les extraits	Feuilles	Tiges	Grains	Racines
Coumarines	+	+	+	+
Anthracénosides	-	-	-	-
Stérol et stéroïdes	+	+	+	+
Anthocyanosides	-	-	-	-
Tanins	-	-	-	-
flavonoïdes	+	+	+	+
Alcaloïdes	+++	++	+++	++
Composés réducteurs	+	+	+	+

Tableau 29 : Les Résultats des tests phytochimiques faits sur les extraits à l'eau.

Les extraits Les Famille	Feuilles	Tiges	Grains	Racines
Tanins	-	-	-	-
Composés réducteurs	+	++	+	++
Alcaloïdes	+	+	+	++
Amidon	-	-	-	-
Saponosides	++	+	+++	+

- : absence ;

++ : présence en quantité moyenne ;

+ : présence en faible quantité ;

+++ : présence en forte quantité

D'après les résultats des tableaux précédents, nous pouvons constater que :

- Les flavonoïdes et les émодols sont faiblement présents dans la plante étudiée.
- Les Anthracénosides, les Anthocyanosides, les tanins et l'amidon sont totalement absents dans la plante.
- Les acides gras sont présents dans les feuilles, les tiges et les grains en quantité variable.
- Les alcaloïdes sont présents dans toutes les parties de la plante avec une dominance importante dans les feuilles, les racines et les grains.
- Les coumarines sont présentes dans toutes les parties de la plante avec une dominance importante dans les racines.
- Les stérols et stéroïdes sont présents dans toutes les parties de la plante avec une dominance importante dans les feuilles, les tiges et les grains.
- Les huiles volatiles sont présentes dans toutes les parties de la plante avec une dominance importante dans les feuilles et les grains.
- Les composés réducteurs et les saponosides sont présents dans toutes les parties de la plante en quantité très variable.

Les différentes familles existantes dans les deux plantes, justifient leur utilisation thérapeutique.

II. EXTRACTION - PURIFICATION

II.1. *Globularia alypum* L.

II.1.1. Rendements d'extractions

Les rendements en pourcentage des extractions liquide - liquide faites sur les différents organes de *Globularia alypum*, sont donnés dans le tableau 30.

Tableau 30: les rendements moyens d'extractions.

Organes de la plante		Feuilles	Tiges	Grains	Racines
R (%)	Extrait 1	0.26	0.41	0.75	0.01
	Extrait 2	0.77	0.74	0.88	0.27
	Extrait 3	5.83	2.79	4.05	0.77
	Extrait 4	16.76	8.61	14.15	7.88
	Extrait 5	3.84	4.76	5.43	8.58

Extrait 1 : extrait à l'heptane ou hexane ;

Extrait 2 : extrait à l'éther ;

Extrait 3 : extrait à l'acétate d'éthyle ;

Extrait 4 : extrait au méthanol (à froid) ;

Extrait 5 : extrait non soluble dans le méthanol.

Nous remarquons que pour les feuilles, les tiges et les grains, les rendements des extraits de MeOH sont plus élevés que ceux obtenus avec les autres solvants. Par contre, celui des racines est inférieur à celui de l'eau.

II.1.2. Caractéristiques des composés isolés

L'analyse des différentes données spectrales de RMN, d'IR, d'UV et de masse, ainsi que l'examen de la littérature nous ont permis d'établir les structures de nos composés.

♣ **Composé 3**

Nous avons isolé le composé **3** (Globularine) à partir de l'extrait 3 (tableau 13, partie expérimentale). Ce composé possède un R_f égal à 0.44 dans le système d'éluant A.E / MeOH

(90 :10), un point de fusion appartenant à l'intervalle : 115 -118°C (point de fusion théorique : 115 – 117°C²⁵) et un pouvoir rotatoire α_D^{25} (MeOH) égal à -63.48 (α_D^{20} théorique égal à -64.85 (MeOH)²⁵).

Nous donnons dans le tableau 31, les rendements moyens d'isolement du composé **3** à partir des feuilles, tiges, grains et racines.

Tableau 31: les rendements moyens en globularine.

Organes de plante	Feuilles	Tiges	Grains	Racines
Rendement par rapport à l'extrait de l'acétate d'éthyle (%)	59.60	52.00	51.00	20.00
Rendements par rapport à la matière végétale sèche (%)	3.40	1.45	2.07	0.15

Ce composé a été isolé pour la première fois des tiges, grains et racines.

Nous remarquons que les feuilles sont plus riches en globularine que les grains, que les tiges. La plus faible quantité est obtenue dans le cas des racines.

Ce composé a été identifié par comparaison de nos données spectrales avec celles publiées.

En IR (KBr) : on observe les bandes caractéristiques suivantes en cm^{-1} : 3401.14 (OH) , 2888.12 - 2919.90 (C-H), 1701.41 (C=O ester), 1636.44 (C=C cyclique), 1184.9 (C-O alcool primaire), 1076.33 (C-OC époxyde).

Le spectre I.R est donné dans l'annexe B.

En UV (méthanol) : $\lambda_{\text{max}} = 279.55 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ théorique} = 278 \text{ nm}$.²¹

En Analyse Élémentaire :

Pourcentage trouvé (%) : C 56.22 ; H 4.20 ; O 39.58

Pourcentage calculé (%) : C 58.48 ; H 5.69 ; O 35.74

L'analyse des différentes données spectrales de RMN ¹H, Cosy, ¹³C, DEPT et HMBC, ainsi que l'examen de la littérature²⁰⁴, nous ont permis d'établir la structure de notre composé **3** « la globularine ». Cette structure a été déterminée par RMN ¹H, et par corrélation en RMN 2D (Correlated Spectroscopy) Cosy ¹H/¹H qui permet le couplage entre protons d'une

part et d'autre part par la RMN ^{13}C et par corrélation du DEPT (Distortionless Enhanced by Polarisation Transfert).

L'expérience DEPT permet de différencier les carbones primaires, secondaires et tertiaires (les pics des CH_2 sont en effet projetés vers le bas, alors que les pics de CH_3 et CH sont orientés vers le haut). Les carbones quaternaires n'apparaissent pas sur les spectres DEPT (ce qui permet aussi de les identifier par comparaison avec les spectres de ^{13}C).

L'expérience 2D HMBC (Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity) $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ permet de visualiser les corrélations $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ longues distances (entre noyau séparés par au moins deux liaisons).

Le solvant utilisé pour l'ensemble des ces expériences est le méthanol deutéré CD_3OD .

Les résultats théoriques et expérimentaux sont résumés dans les tableaux 32 et 33. Les spectres correspondants sont donnés dans l'annexe C.

Tableau 32 : Données expérimentales et théoriques du ^1H , du Cosy pour la globularine.

N° du H	$\delta_{\text{théorique}}$ (ppm)	$\delta_{\text{expérimentale}}$ (ppm)	COSY Corrélations $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$	Constantes de couplage J (Hz)
H-5	2.29	2.29	H-9, 6, 4	7.7 ; 7.9 ; 4.4
H-3',4',5'	3.20	3.27		
H-2'	3.17	3.24	H-1' ; 3'	7.7 ; 8.8
H-6	3.50	3.92	H-5 ; 7	7.9 ; 1.2
H-7	3.50	3.45	H-6	1.2
H-9	2.66	2.66	H-5, 1	7.7 ; 9.8
H-1'	4.99	4.95	H-2'	7.7
H-6'a, H-6'b	3.92 ; 3.65	3.89		
H-10a	4.29	4.17	H-10b	-12.7
H-10b	5.09	4.24	H-10a	-12.7
H-4	5.07	5.04	H-5, 3	4.4 ; 6.0
H-3	6.35	6.31	H-4, 5	6.0 ; 1.9
H- α	6.57	6.55	H- β	16.0
H- β	7.72	7.70	H- α	16
H-2'', 4'', 3''	7.50	7.35		

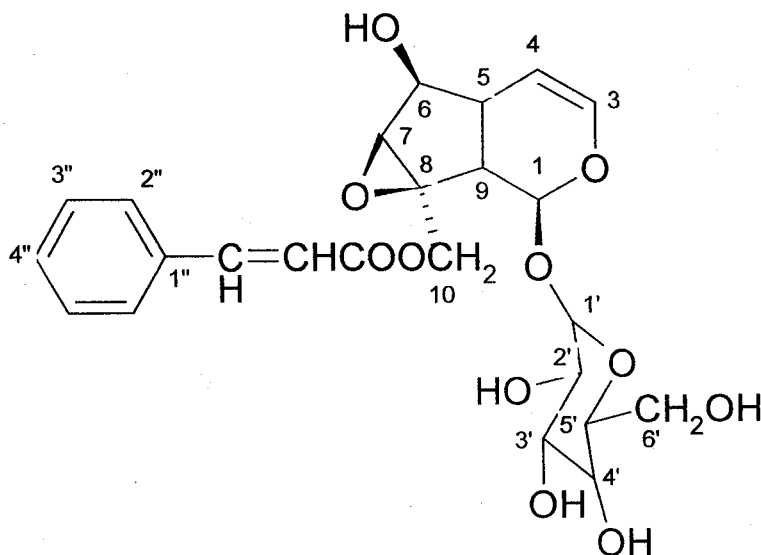
Tableau 33 : Données expérimentales et théoriques du ^{13}C , du DEPT et du spectre 2D HMBC pour la Globularine.

N° du C	DEPT	$\delta_{\text{théorique}}$ (ppm)	$\delta_{\text{expérimentale}}$ (ppm)	HMBC corrélations $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$
Co	Cq	168.39	166.89	
C β	CH	146.68	145.16	
C3	CH	141.75	140.32	
C1''	Cq	135.72	134.21	H-3
C4''	CH	131.49	130.06	
C2'', C6''	CH, CH	129.96	128.50	
C3'', C5''	CH, CH	129.28	127.87	H- β
C α	CH	118.67	117.11	
C-4	CH	103.82	102.20	
C-1'	CH	100.43	98.76	
C-1	CH	95.74	94.07	H-1'; 9
C-6	CH	79.48	77.95	H-7; 9
C-5'	CH	78.34	76.95	H-4'; 3'; 2'
C-3'	CH	77.88	76.30	
C-2'	CH	74.83	73.28	
C-4'	CH	71.48	69.95	H-3'; 5'; 2'
C-10	CH ₂	64.28	63.01	H-9
C-8	Cq	63.64	62.02	H-10; 9
C-7	CH	63.01	61.51	
C-6'	CH ₂	62.83	61.28	
C-9	CH	43.74	42.07	H-1 ; 1' ; 4 ; 10 ; 6
C-5	CH	39.04	37.51	H-3 ; 7

En spectrométrie de masse, les principaux fragments observés sont : m/z : 131(100.00%), 28(40.06%), 103(35.8%), 148(28.02%), 182(7.38%), 330(4.48%), 492(5.8%). Ce qui correspond à une masse molaire 492.14 g/mole (masse molaire théorique est égale à 492.48 g/mole).

Toutes ces données nous ont permis de proposer la structure **3** à ce composé solide, qui correspond à la **globularine** de formule chimique $C_{24}H_{28}O_{11}$ et de couleur blanche cassée légèrement par le jaune. Ce dernier appartient à la famille des irridoïdes glucosidiques.

La globularine possède un pouvoir antioxydant modéré.³¹



3

♣ **Composé 63**

Le composé **63** (mannitol) est obtenu par cristallisation dans le méthanol à partir de l'extrait 5 des différentes parties de la plante. On l'a purifié par recristallisation.

Ce composé possède un point de fusion appartenant à l'intervalle : 168 -169°C (point de fusion théorique : 164 – 169°C) et un pouvoir rotatoire α_D^{25} (Eau) égal à +21.55 (α_D^{20} théorique égal à +23 à +25(solution boratée)).

Nous donnons dans le tableau 34, les rendements d'isolement du composé **63** à partir des feuilles, tiges, grains et racines.

Tableau 34 : les rendements en mannitol.

Organes de plante	Feuilles	Tiges	Grains	Racines
Rendement par rapport à l'extrait 5 (%)	22.22	49.00	4.44	3.58
Rendements par rapport à la matière végétale sèche (%)	0.85	2.33	0.24	0.31

Ce composé a été isolé pour la première fois de *Globularia alypum*.

Le plus grand rendement est obtenu dans le cas des tiges, par contre le plus faible est obtenu pour les racines.

Ce composé a été identifié par comparaison de nos données spectrales avec celles publiées.

En IR (KBr): on observe les bandes caractéristiques suivantes en cm^{-1} : 3336.32 (O-H), 1190.00 (C-O), 1330.00 (C-H).

Le spectre I.R est donné dans l'annexe B.

En Analyse Élémentaire :

Pourcentage trouvé (%) : C 39.05 ; H 6.05 ; O 54.90

Pourcentage calculé (%) : C 39.51 ; H 7.68 ; O 52.81

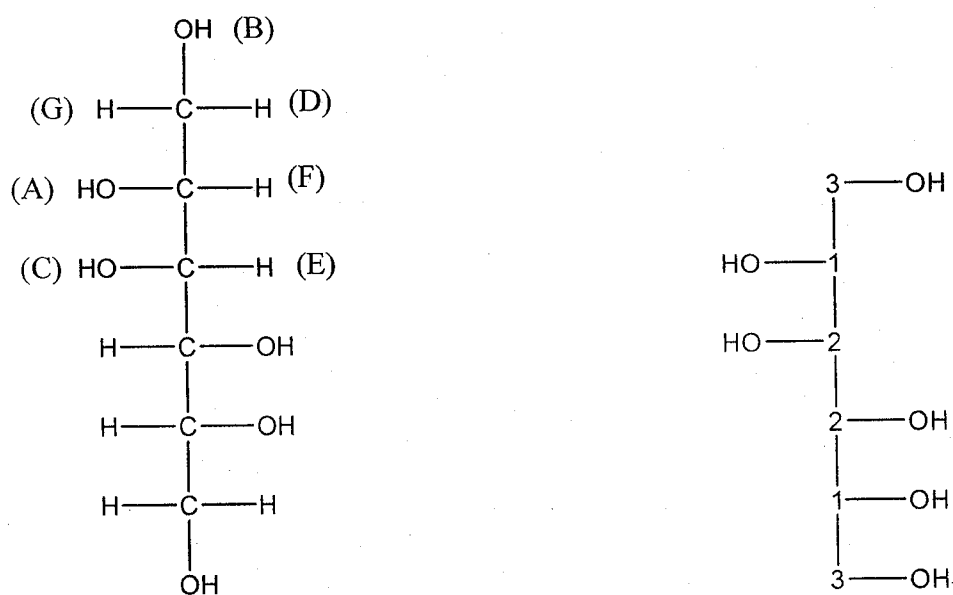
Par comparaison des spectres obtenus de la RMN ^1H , ^{13}C et par corrélation de DEPT avec ceux données dans la littérature²⁰⁵, nous avons identifié la molécule au D-mannitol. La RMN ^1H nous a indiqué la présence d'un large signal à 4.65 ppm correspondant au proton des groupements OH (voir les tableaux 35 et 36). Les spectres RMN sont donnés dans l'annexe C.

Tableau 35 : Données expérimentales et théoriques de la RMN ^1H et COSY du D-mannitol.

N° du H	$\delta_{\text{théorique}}$ (ppm)	$\delta_{\text{expérimentale}}$ (ppm)	COSY théorique	Constante de couplage théorique
H-G	3.38	3.52	F	$J(\text{G}, \text{F}) = 5.6$
H-F	3.45	3.62	A, G, D	
H-B	4.35	4.65	D, G	$J(\text{B}, \text{D}) = J(\text{B}, \text{G}) = 5.7$
H-D	3.61	3.72	G, F	$J(\text{D}, \text{G}) = -10.7$ $J(\text{D}, \text{F}) = 3.3$
H-C	4.15	4.65	E	$J(\text{C}, \text{E}) = 7.1$
H-A	4.42	4.65	F	$J(\text{A}, \text{F}) = 5.4$
H-E	3.45	3.66		

Tableau 36 : Données expérimentales et théoriques de la RMN ¹³C et du DEPT du D-mannitol.

N° du C	δ _{théorique} (ppm)	δ _{expérimentale} (ppm)	DEPT
C1	71.18	71.03	CH
C2	69.54	69.33	CH
C3	63.72	63.57	CH ₂



63

Le D-mannitol est une poudre blanche cristallisée, inodore, ayant pour formule C₆H₁₄O₆, appartient à la famille des sucres polyols.

Le mannitol est un médicament diurétique, qui est administré pour éliminer les liquides excédentaires de la circulation sanguine et accroître l'excrétion d'urine. Il peut également permettre de réduire la pression des liquides dans le cerveau chez les patients atteints d'une tumeur cérébrale.

Le mannitol est un édulcorant, il est absorbé lentement et n'est pas complètement métabolisés. L'énergie moyenne produite est de 10 KJ par gramme contre 17 KJ par gramme pour les sucres (glucose, saccharose, ...). Il est toléré par les diabétiques mais la consommation journalière à 50 grammes peut provoquer un gêne intestinal.²⁰⁶

Le mannitol peut être le constituant responsables de l'activité hypoglycémiant de l'extrait aqueux des feuilles de *Globularia alypum*.

♣ **Composé 64**

Le mélange (EF) obtenu (2.17 g) a subi une chromatographie sur colonne en utilisant la silice. L'éluant est A.E / MeOH (90 :10). Le composé **64** (60 mg) est isolé de la fraction EF1.

Ce composé possède un Rf égal à 0.33 dans le système d'éluant pentane / A.E (95 : 5) Ce composé a été identifié par comparaison de nos données spectrales avec celles publiées.

En IR (KBr) : on observe les bandes caractéristiques suivantes en cm^{-1} : 3069-2854.44 (OH), 1316.54 (C-O), 1652.75 (C=C).

Le spectre I.R est donné dans l'annexe B.

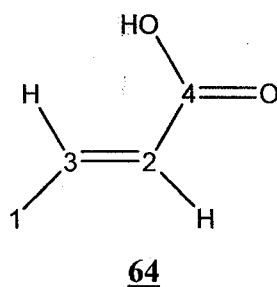
Par comparaison des spectres obtenus de la RMN ^{13}C et par corrélation de DEPT avec ceux données dans la littérature ²⁰⁷, nous avons identifié la molécule à l'acide crotonique. (Voir le tableau 37). Les spectres RMN sont donnés dans l'annexe C.

Cette identification est aussi confirmée par CCM en utilisant de l'acide crotonique commerciale, qui possède un Rf égal à 0.93 dans un système d'éluant CH_2Cl_2 / MeOH (80 :20)

Tableau 37 : Données expérimentales et théoriques de la RMN ^{13}C et du DEPT de l'acide crotonique.

N° du C	$\delta_{\text{théorique}}$ (ppm)	$\delta_{\text{expérimentale}}$ (ppm)	DEPT
C1	18.08	18.32	CH ₃
C2	122.38	122.21	CH
C3	147.55	147.52	CH
C4	172.35	172.03	Cq

Ce composé a été isolé pour la première fois de *Globularia alypum*. C'est un solide cristallisé blanc, ayant pour formule $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$.



II.2. *Ruta chalepensis* L.

Ruta chalepensis « la rue », étant que plante aromatique est largement exploitée pour ces huiles essentielles destinées pour la parfumerie et l'industrie agroalimentaire.

La composition chimique des huiles essentielles varie avec le lieu de récolte. Il a été reporté que le 2-undécanone est le constituant majoritaire de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* de provenance l'Argentine (38.1%), la Turquie (66.5%), l'Iran (52.5%) et l'Inde (4.3 – 67.8%).⁷²⁻⁷⁹

Quant à l'huile essentielle de l'Arabie Saoudite, le pourcentage en 2-undécanone est inférieur ou égal à 4.5%. Cependant l'huile essentielle de provenance l'Italie contient deux constituants majoritaires le 2-nonanone (49.9 %) et le 2-undécanone (30.0 %). L'huile essentielle de l'Algérie n'est pas encore étudiée et sa composition chimique reste inconnue.

La connaissance des propriétés physicochimiques et de la composition des huiles essentielles est un critère de qualité très recherché par les utilisateurs

Dans cette partie, nous reportons les résultats d'une étude faite sur *Ruta chalepensis* L. de l'Algérie et qui a pour objectif de contribuer à la valorisation des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L., produits qui généralement posent de sérieux problèmes de normalisation pour leurs commercialisations, à cause de la grande diversité de leurs composition, reconnue par l'ensemble des scientifiques et utilisateurs. Cette étude, nous a permis de déterminer les propriétés physicochimiques et la composition chimique de l'huile essentielle et d'identifier de ses chemotypes.

Ces travaux ont également permis de mettre en évidence l'influence de quelques facteurs sur la teneur et la qualité des huiles essentielles. Les facteurs considérés sont : l'état de la matière végétale et l'année de récolte, la partie de la plante étudiée, la période de récolte, le lieu de récolte et la durée de conservation de la matière végétale. Pour l'avant dernier facteur, nous avons tenté de définir les chemotypes de la plante suivant un itinéraire nord-sud

de la wilaya de Tlemcen, dans l'ouest Algérien allant de la côte (Ghazaouet) jusqu'à Sebdou sur une distance d'environ une centaine de kilomètres.

Les matières végétales utilisées pour l'extraction des huiles essentielles sont composées de parties aériennes de *Ruta chalepensis* L., récoltées durant l'année 2005, à partir de six différentes régions de la wilaya de Tlemcen dans le nord ouest Algérien, ayant des situations géographiques et des conditions climatiques différentes. La wilaya de Tlemcen est limitée au Nord par la mer Méditerranéenne et la wilaya de Ain-Temouchent, à l'Est par la wilaya de Sidi Bel-Abbes, au Sud par la wilaya de Naâma et à l'Ouest par le Maroc (figure 3). Les données bioclimatiques des différentes zones sont citées dans le Tableau 38.²⁰⁹

Tableau 38 : Etude bioclimatique des six zones d'études.

Caractères Zones	Longitude	Latitude	Altitude	Climat
Ghazaouet	1° 52'	35°46'	45 m	Semi-aride à hiver tempéré
Ouzidane	1°19'	34°55'	650 m	Semi-aride à hiver chaud
Beni Mester	1°21'	34°54'	700 m	Semi-aride à hiver doux
Ain Fezza	1°16'	34°50'	800 m	Semi-aride à hiver frais
Terni	1°21'	34°48'	1000 m	Semi-aride à hiver froid
Sebdou	1°20'	34°37'	730 m	Semi-aride à hiver doux

II.2.1. Détermination de la durée optimale d'extraction :

Nous avons déterminé le temps optimal moyen de l'extraction de l'huile essentielle de *Ruta Chalepensis* L., c'est le temps nécessaire pour extraire la totalité des huiles essentielles de notre plante (temps au bout duquel, le volume de l'huile extraite devient constant). La matière végétale utilisée est récoltée en octobre 2004 de Beni Mester. Nous donnons dans le tableau 39 , les résultats d'une extraction faite sur la partie aérienne de la plante (146 g).

Tableau 39 : La variation du volume d'H.E en fonction de la durée d'extraction.

Temps (mn)	0	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210
V (ml)	0.0	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

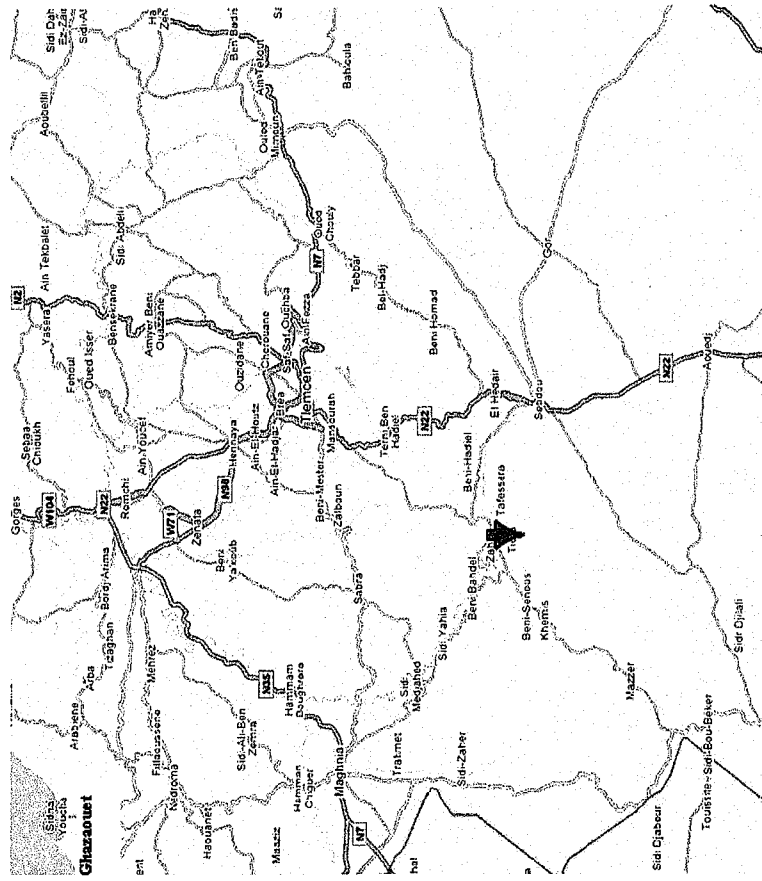
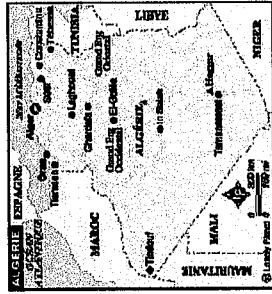


Figure 3 : Situation géographique des sites étudiés

Plusieurs extractions de ce genre ont été faites. Le temps optimal moyen d'extraction est alors, estimé à 135 minutes, c'est-à-dire **2^h15 min.**

N.B : La durée de toutes les extractions faites était supérieure **2^h15'** (généralement 05^h).

II.2.2. Influence de certains paramètres sur le rendement, les propriétés physicochimiques et la composition chimique de l'huile essentielle

a) Etat de la matière végétale et l'année de récolte

Cette étude est faite sur la partie aérienne de *Ruta chalepensis* L. récoltée en Avril 2004 et 2005 de Ouzidane. Elle nous a permis de connaître la composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* de l'Algérie. Elle consiste à faire une étude comparative entre la teneur, les propriétés physicochimiques, la composition de l'huile essentielle obtenue en utilisant une matière fraîchement récoltée (Avril 2004) et celles d'une huile essentielle obtenue à partir d'une matière végétale séchée durant deux semaines. Ceci va nous permettre de voir l'effet de la durée de séchage qui est de deux semaines. Cette étude a permis aussi de voir l'effet des conditions climatiques sur la production et la qualité de l'huile essentielle.

L'année 2004 s'est caractérisée par un hiver doux, par contre l'année 2005 était connue par son hiver froid. Les résultats de cette étude sont résumés dans les tableaux 40 et 41.

Tableau 40 : Le rendement et les propriétés physicochimiques de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L.

	Avril 2004		Avril2005
	Matière fraîche	Matière sèche	Matière sèche
H ^a (% H ₂ O)	64.00	16.67	16.00
R ^b (%)	2.86	2.82	1.28
d ₄ ²⁰	0.8131	0.8141	0.8193
n _D ²⁰	1.4309	1.4305	1.4328
α _D ²⁵	+6	+6	+10
Point de fusion (°C)	+12	+11.5	+5
Miscibilité à l'éthanol 70% à 20°C	1V/2V	1V/2V	1V/2V
Indice d'acide	2.91	2.48	3.78

^a la teneur en eau. ^b rendement en huile essentielle de la partie aérienne de *Ruta chalepensis*, calculé par rapport à la matière végétale sèche (H=0%).

Tableau 41 : La composition chimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L.

Composés ^a	M _w ^b	IR _{calculé}	IR _{littérature}	Avril 2004		Avril 2005		M.I. ^d
				Matière végétale fraîche	Matière végétale sèche	Matière végétale fraîche	Matière végétale sèche	
Limonène	136	1030	1031	0.05	0.09	0.06	0.06	SM, IR
2-Nonanone	142	1086	1083	0.34	0.57	0.26	0.26	SM, IR
2-Nonanol	144	1097	1099	0.32	0.71	0.16	0.16	SM, IR
2-Décanone	156	1192	1194	3.53	4.38	3.67	3.67	SM, IR
1-Décanol	158	1272	1273	0.05	0.03	0.05	0.05	SM, IR
2-Undécanone	170	1297	1297	80.11	79.06	82.74	82.74	SM, IR
2-Undécanol	172	1305	1308	2.68	1.18	0.31	0.31	SM, IR
1,7-Octadiène 2,7-diméthyl 3,6 bis (méthylène) ^e	162	1311	-	tr	tr	0.93	0.93	SM
1-Undécanol	172	1364	1367	0.76	0.42	0.15	0.15	SM, IR
2-Dodécanone ^f	184	1365	-	0.69	0.50	0.54	0.54	SM
2-Dodécanone	184	1390	1388	1.76	1.78	2.11	2.11	SM, IR
1-Dodécanol	186	1463	1466	0.11	0.04	0.12	0.12	SM, IR
Inconnu ^g	284	1470	-	0.13	0.10	0.16	0.16	-
2-Tridécanone	198	1491	1489	0.99	1.42	1.30	1.30	SM, IR
E-11, 13-diméthyl-12-tétradécen-1-ol acetate ^e	282	1525	-	0.03	0.58	0.37	0.37	SM
Elémol	222	1553	1554	3.02	0.43	0.33	0.33	SM, IR
Elemicin	208	1565	-	0.35	0.69	0.19	0.19	SM
2-Butyl 4-(3',5'-benzo-dioxy)-acetate ^e	236	1700	-	1.39	2.19	tr	tr	SM
6-(3',5'-Benzo-dioxy)-3,3-diméthyl-1-hexène ^e	232	1753	-	1.79	2.81	tr	tr	SM
Chalepensisin ^e	254	1890	-	Tr	tr	0.29	0.29	SM
Clausindin ^e	254	1898	-	0.61	0.93	0.41	0.41	SM
Total identifié (%)				98.58	97.81	93.99	93.99	

^a Les composés sont listés selon leur temps de rétention sur colonne DB5. Les composés identifiés ayant une valeur inférieure à 0.01% sont notés comme traces (tr). ^b Masse molaire. ^c Indices de rétention (IR), déterminés sur colonnes DB5 en utilisant la série de n - alcanes. ^d Méthode d'identification : SM spectrométrie de masse et IR indice de rétention. ^e Tentative d'identification en utilisant uniquement les résultats de la spectrométrie de masse. ^f 2-dodécanone en forme ramifiée. ^g Inconnu : m/z : 284(2), 251(1), 225(1), 211(2), 193(2), 178(4), 160(24), 145(64), 120(45), 105(90), 91(100), 43(48).

Nos résultats sont dans l'ensemble conformes aux données de la littérature. Les rendements en huile essentielle de *Ruta chalepensis* cités dans la littérature sont compris entre 0.1% et 1.13%.⁷²⁻⁷⁹ K.H. Baser et al.⁷⁴ qui ont déterminé quelques propriétés physicochimiques de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis*, ont trouvé: $d^{25}=0.8363$; $n_D^{20} = 1.4325$; $\alpha_D^{25} = +1.43$. Cependant Aloisia Fernandes et al.²⁰⁸ ont trouvé : $d_{15}^{20} = 0.8390$; $n_D^{16}=1.4329$; $\alpha_D^{17} = +1$; point de congélation = $+6^\circ\text{C}$; miscibilité à l'éthanol 70% à $15^\circ\text{C} = 1\text{V}/2.2\text{V}$.

Les caractéristiques physicochimiques avoisinent dans l'ensemble les normes de commercialisation des huiles essentielles. En ce qui concerne la composition chimique, l'analyse des huiles essentielles de la plante, nous a fourni des résultats globalement comparables à ceux donnés par la littérature. Nous avons identifié 20 constituants. La caractéristique principale de ces huiles est la grande richesse en cétones. On note également que le composé majoritaire de ces huiles est le 2-undécanone (79.06 - 82.74%).

Nous constatons une faible variation du rendement, des propriétés physicochimiques et de la composition chimique de l'huile essentielle avec l'état de la matière végétale. Cette légère variation est certainement due à l'évaporation de certains composés volatils pendant cette durée de séchage. Donc, nous pouvons considérer période optimum de séchage est de deux semaines.

Par contre, si nous comparons le rendement en huile essentielle de la plante récoltée en 2004 à celui de la plante récoltée en 2005, nous remarquons une importante diminution. Les propriétés physicochimiques et la composition varient aussi avec l'année de récolte. Cette variation est certainement due à la différence des conditions climatiques des deux années.

Donc une forte production en huile essentielle, nécessite un climat chaud.

b) Partie de la plante étudiée

Les tableaux 42 et 43 regroupent respectivement les rendements et les proportions relatives des constituants de la partie aérienne, des feuilles, des fleurs et des tiges de *Ruta chalepensis* qui est récoltée en Avril 2005 de la région de Beni Mester.

Tableau 42 : Rendements en huile essentielle en fonction de la partie de la plante étudiée.

Partie de la plante étudiée	Partie aérienne	Feuilles	Fleurs	Tiges
Rendement (%)	0.84	0.69	1.22	0.31

Tableau 43: Composition chimique de l'huile essentielle en fonction de la partie de la plante étudiée.

Composés ^a	IR ^b	Partie aérienne	Feuilles	Fleurs	Tiges
Limonène	1030	2.56	0.65	0.10	0.99
2-Nonanone	1086	22.89	12.45	2.01	18.16
2-Nonanol	1097	0.32	0.15	0.10	0.13
2-Decanone	1192	1.69	2.02	0.63	1.48
1-Decanol	1272	10.96	26.32	1.95	8.40
2-Undecanone	1297	43.71	40.61	68.95	38.38
2-Undecanol	1305	1.36	1.59	2.01	0.34
1,7Octadiene2, 7dimethyl 3,6 bis (methylene) ^c	1311	tr	0.00	0.00	1.95
1-Undecanol	1364	tr	0.29	0.10	0.30
2-Dodecanone ^d	1365	0.93	0.90	0.88	1.33
2-Dodecanone	1390	0.60	0.61	1.13	0.79
1-Dodecanol	1463	4.61	4.69	9.13	3.57
2-Tridecanone	1491	0.74	0.51	1.94	0.91
E-11, 13-diméthyl-12-tétradécène-1-ol acetate ^c	1525	0.05	0.14	0.15	0.34
Elemol	1553	0.36	0.22	0.21	0.90
Elemicin	1565	0.03	0.17	0.22	0.28
2-Butyl 4-(3',5'-benzo-dioxy)-acetate	1700	0.06	0.00	0.00	0.87
6-(3',5'-Benzo-dioxy)-3,3-diméthyl-1-hexène	1753	0.32	tr	Tr	0.12
Chalepensin	1890	0.05	0.02	Tr	0.11
Clausindin	1898	0.02	tr	0.02	0.11
Composés identifiés au total (%)		91.26	91.34	89.53	79.46

^a Les composés sont listés selon leur temps de rétention sur colonne DB5. Les composés identifiés ayant une valeur inférieure à 0.01% sont notés comme traces (tr). ^b Indices de rétention (IR), déterminés sur colonnes DB5 en utilisant la série de n - alcanes. ^c Tentative d'identification en utilisant uniquement les résultats de la spectrométrie de masse. ^d 2-dodecanone en forme ramifiée.

D'après les résultats du tableau 42, il est intéressant de remarquer que la concentration en huile essentielle est beaucoup plus importante dans les fleurs (1.22%) que dans les feuilles (0.69%) que dans les tiges (0.31%).

D'après les résultats du tableau 43, il apparaît clairement que les fleurs sont plus riches en 2-undécanone (68.95%) que les feuilles (40.61%) que les tiges (38.38%). Nous constatons néanmoins l'existence d'autres constituants majoritaires dans les feuilles et les tiges tels que le 2-nonanone et le 1-décanol.

c) période de récolte de la plante

Cette étude a été faite sur la partie aérienne de *Ruta chalepensis* récoltée en Février, Avril, Juin, Août et Octobre 2005 de la région de Beni Mester. Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux 44 et 45.

Tableau 44 : Rendements et les propriétés physicochimiques des huiles essentielles en fonction de la période de récolte.

La période de récolte	Février	Avril	Juin	Août	Octobre
Le rendement (%)	0.28	0.84	0.78	0.72	0.43
La densité d_4^{20}	0.8273	0.8378	0.8312	0.8223	0.8640
L'indice de réfraction n_D^{20}	1.4344	1.4310	1.4316	1.4334	1.4350
Le pouvoir rotatoire α_D^{25}	+9	+10	+10	+10	+8
Le point de congélation (°C)	-5	-5	-14	-7	-1
La miscibilité à l'éthanol 70% à 20°C	1V/2V	1V/2V	1V/2V	1V/2V	1V/2V
L'indice d'acide	7.32	4.27	4.52	5.75	4.2

Tableau 45: Composition chimique de l'huile essentielle en fonction de la période de récolte de la plante.

Composés ^a	Février	Avril	Juin	Août	Octobre
Limonene	0.36	2.56	0.27	0.56	0.41
2-Nonanone	4.40	22.89	8.78	5.32	3.05
2-Nonanol	0.07	0.32	0.10	0.34	0.23
2-Decanone	0.74	1.69	1.34	1.74	0.57
1-Decanol	4.98	10.96	12.13	14.51	11.65
2-Undecanone	32.29	43.71	46.22	50.59	22.76
2-Undecanol	15.71	1.36	6.32	4.50	7.14
1,7-Octadiène 2,7-diméthyl 3,6 bis (méthylène)^b	8.45	tr	3.60	tr	7.72
1-Undecanol	0.63	tr	0.11	0.22	0.68
2-Dodecanone^c	1.16	0.93	1.32	1.16	0.72
2-Dodecanone	1.23	0.60	0.87	0.94	0.52
1-Dodecanol	3.24	4.61	6.49	5.71	4.73
2-Tridecanone	1.30	0.74	1.11	0.94	0.91
E-11, 13-diméthyl-12-tétradécène-1-ol acétate^b	0.28	0.05	0.10	0.31	0.22
Elemol	0.20	0.36	0.63	0.29	0.17
Elemicin	0.24	0.03	0.01	0.49	0.40
2-Butyl 4-(3',5'-benzo-dioxy)-acétate	1.46	0.06	0.37	0.31	1.95
6-(3',5'-Benzo-dioxy)-3,3-diméthyl-1-hexène	3.93	0.32	2.47	1.07	4.53
Chalepensin	1.06	0.05	tr	0.09	15.62
Clausindin	0.38	0.02	0.01	0.02	0.30
Composés identifiés au total (%)	82.11	91.26	92.25	89.11	84.28

^a Les composés sont listés selon leur temps de rétention sur colonne DB5. Les composés identifiés ayant une valeur inférieure à 0.01% sont notés comme traces (tr). ^b Tentative d'identification en utilisant uniquement les résultats de la spectrométrie de masse. ^c 2-dodecanone en forme ramifiée.

D'après les résultats des tableaux 44 et 45, nous remarquons l'extrême diversité des valeurs enregistrées pour les différentes périodes de cueillette. Cette remarque s'applique particulièrement pour le rendement d'extraction de l'huile essentielle ou le minimum est de 0.28% pour la période de Février et le maximum est de 0.84% pour la période d'Avril (pleine floraison).

La variation de l'indice de réfraction est peu significative. On observe cependant une diminution, ensuite une augmentation. Le minimum est obtenu dans le cas de la période d'Avril (pleine floraison). Il est intéressant de remarquer que le point de congélation diminue ensuite augmente avec le vieillissement de la plante, le minimum est enregistré pendant la période de Juin (fructification). Nous constatons que la miscibilité à l'éthanol est constante : 1V/2V. A l'exception d'une légère augmentation ensuite diminution des valeurs du pouvoir rotatoire, il ne semble y avoir aucune autre relation pouvant être exploitée au vu des résultats obtenus. On peut souligner que les variations des propriétés physicochimiques enregistrées sont dues à la variation de la composition chimique.

La comparaison de la composition des huiles essentielles fait apparaître en premier lieu que le pourcentage relatif du constituant majoritaire le 2-undécanone augmente de façon appréciable de la première à la quatrième récolte (32.29% à 50.59% respectivement), pour diminuer enfin en Octobre (22.76%).

Le 2-nonanone augmente en proportion de la première à la deuxième récolte (4.40% à 22.76% respectivement), pour diminuer en Juin (8.78%), Août (5.32%) et Octobre (3.05%).

On note également que le 1-décanol affiche la plus grande proportion pendant la quatrième période (14.51%).

Enfin il est important de remarquer les fortes teneurs enregistrées pour le 2-undécanol et le 1,7 Octadiène 2,7 diméthyl 3,6 bis (methylene) (15.71%, 8.45% respectivement) durant la première récolte (Février).

L'huile essentielle de notre plante est à majorité le 2-undécanone, quelques soit la période de récolte, donc la plante peut être classé comme chemotype à 2-undécanone. Pour certaines récoltes, l'huile essentielle possède d'autres constituants majoritaires comme le 2-nonanone, le 1-décanol....etc. Alors, nous pouvons définir des chemotypes intermédiaires tels que le chemotype à 2-undécanone (43.71%) - 2-nonanone (22.89%) - 1-décanol (10.96%)

(Récolte Avril 2005), le chemotype à 2-undécanone (22.76%) - chalepensis (15.62%) - 1-décanol (11.65%) (Récolte Octobre 2005).

d) Lieu de récolte de la plante

L'étude a été menée sur la partie aérienne de *Ruta chalepensis* récoltée en Avril 2005 de différentes régions de la wilaya de Tlemcen. Les résultats sont représentés dans les tableaux 46 et 47.

Tableau 46: Rendements et les propriétés physicochimiques des huiles essentielles en fonction du lieu de récolte de la plante.

La période de récolte	Ghazaouet	Ouzidane	Beni Mester	Ain Fezza	Terni	Sebdou
Le rendement (%)	1.06	1.28	0.84	0.35	0.98	1.24
La densité d_4^{20}	0.8212	0.8193	0.8378	0.8357	0.8342	0.8285
L'indice de réfraction n_D^{20}	1.4307	1.4328	1.4310	1.4315	1.4311	1.4323
Le pouvoir rotatoire α_D^{25}	+5	+10	+10	+6	+9	+9
Le point de congélation (°C)	+7	+5	-5	-9	+7	+5
La miscibilité à l'éthanol 70% à 20°C	1V/2V	1V/2V	1V/2V	1V/2V	1V/2V	1V/2V
L'indice d'acide	3.42	3.78	4.27	5.61	2.93	4.88

Tableau 47: Composition chimique de l'huile essentielle en fonction du lieu de récolte de la plante.

Composés ^a	Ghazaouet	Ouzidane	Beni Mester	Ain Fezza	Terni	Sebdou
Limonene	0.08	0.06	2.56	2.30	0.10	0.05
2-Nonanone	0.53	0.26	22.89	17.73	3.39	0.36
2-Nonanol	0.61	0.16	0.32	0.38	0.31	0.13
2-Decanone	4.17	3.67	1.69	1.38	3.91	2.13
1-Decanol	0.12	0.05	10.96	10.97	4.05	0.04
2-Undecanone	79.11	82.74	43.71	20.40	72.90	54.19
2-Undecanol	1.42	0.31	1.36	3.53	0.22	3.32
1,7Octadiene2, 7 dimethyl 3,6 bis (methylene) ^b	2.07	0.93	tr	1.39	1.55	7.14
1-Undecanol	0.08	0.15	tr	0.30	0.27	0.54
2-Dodecanone ^c	0.33	0.54	0.93	0.71	0.62	0.73
2-Dodecanone	1.75	2.11	0.60	0.68	1.47	1.38
1-Dodecanol	0.08	0.12	4.61	2.78	1.04	0.17
2-Tridecanone	1.26	1.30	0.74	0.43	0.73	1.71
E-11, 13-dimethyl-12-tétradecen-1-ol acetate ^b	0.10	0.37	0.05	0.08	0.38	0.50
Elemol	0.03	0.33	0.36	0.23	0.53	0.19
Elemicin	tr	0.19	0.03	0.01	0.20	0.45
2-Butyl 4-(3',5'-benzo-dioxyl)-acetate	0.36	tr	0.06	0.34	tr	1.21
6-(3',5'-Benzo-dioxyl)-3,3-diméthyl-1-hexene	0.46	tr	0.32	0.80	1.64	3.73
Chalepensin	0.29	0.29	0.05	0.20	0.22	tr
Clausindin	0.42	0.41	0.02	0.02	0.16	3.22
Composés identifiés au total (%)	93.27	93.99	91.26	64.66	93.69	81.19

^a Les composés sont listés selon leur temps de rétention sur colonne DB5. Les composés identifiés ayant une valeur inférieure à 0.01% sont notés comme traces (tr). ^b Tentative d'identification en utilisant uniquement les résultats de la spectrométrie de masse. ^c 2-dodecanone en forme ramifiée.

Les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* de provenance l'Argentine, la Turquie, l'Iran, et l'Inde possèdent le 2-undécanone comme constituant majoritaire (38.1%, 66.5%, 52.5% et 41.3 - 67.8% respectivement). Les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* de la Turquie, l'Iran, l'Inde et l'Italie possèdent un autre constituant majoritaire : le 2-nonanone (16.2%, 24.1%, 5.2 - 33.6% et 49.9% respectivement). Par contre l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* de provenance l'Arabie Saoudite possède comme constituants majoritaires : le 2-undécanone, le 2-tridécanone, l'élémol et β -eudesmol. Alors que dans l'huile essentielle de provenance la Grèce, le 2-méthyl octyl acétate (44.0%) et le β -phellandrène (10.7%) sont les constituants majoritaires.⁷²⁻⁷⁹

Il apparaît au vu des résultats du tableau 46 que les meilleurs rendements en huile essentielle sont obtenus pour les régions de Ouzidane (1.28%), Sebdu (1.24%) et Ghazaouet (1.06%). Par contre le plus faible rendement est obtenu pour la région de Ain Fezza (0.35%). Les régions de Beni Mester et Terni présentent des teneurs en huile essentielle intermédiaires (0.84% et 0.98% respectivement).

On peut noter également que la densité d_4^{20} (0.8193 à 0.8378), l'indice de réfraction n_D^{20} (1.4307 à 1.4328), le pouvoir rotatoire α_D^{25} (+5 à +10), le point de congélation (-9 à +7) et l'indice d'acide IA (2.93 à 5.61) varient avec le lieu de récolte.

En ce qui concerne la composition chimique, l'analyse des huiles essentielles de la partie aérienne de *Ruta chalepensis* nous a montré l'extrême variabilité de la composition de l'huile avec le lieu de récolte (tableau 47).

Il est intéressant de remarquer que le 2-undécanone est un constituant majoritaire pour toutes les huiles essentielles de la plante récoltée des différentes régions, son pourcentage varie de 20.40% (Ain Fezza) à 82.74% (Ouzidane). Nous remarquons pour quelques régions, l'existence d'autres composés majoritaires tels que le 2-nonanone (Béni Mester (22.89%) et Ain Fezza (17.73%)) et le 1-décanol (Béni Mester (10.96%) et Ain Fezza (10.97%)).

Si on se réfère à la notion classique de chemotype, nous pourrions définir notre plante à majorité 2-undécanone pour toutes les régions considérées, à l'exception de Béni Mester et Ain Fezza, qui peuvent classer de façon classique comme chemotype intermédiaire en 2-undécanone - 2-nonanone - 1-décanol.

Les variations du rendement, des propriétés physicochimiques et de la composition chimique avec le lieu de récolte, sont dues à un certain nombre de facteurs tels que la situation

géographique, les conditions climatiques, la nature du sol, traumatismes et maladies provoquées par des agents exogènes.

e) Durée de conservation de la matière végétale

L'étude a été menée sur la partie aérienne de *Ruta chalepensis* récoltée en Avril 2005 de la région de Sebdoou. Les résultats sont représentés dans les **tableaux 4 8 et 4 9**.

Tableau 48: Rendement en huile essentielle en fonction de la durée de conservation de la plante.

Durée de conservation (mois)	1/2*	1	2	5	10
Rendement R (%)	1.24	1.18	0.93	0.09	0.06

* Cette période correspond à la durée de séchage.

Tableau 49: Composition chimique de l'huile essentielle en fonction de la durée de conservation de la plante.

Composés	½ mois	1 mois	2 mois	5 mois	10 mois
Limonene	0.05	tr	0.02	0.02	0.18
2-Nonanone	0.36	0.24	0.39	0.14	0.65
2-Nonanol	0.13	0.12	0.10	0.07	0.22
2-Decanone	2.13	3.33	2.11	2.08	2.76
1-Decanol	0.04	0.05	0.03	0.13	0.78
2-Undecanone	54.19	83.20	55.99	77.48	56.98
2-Undecanol	3.32	0.02	0.02	0.02	tr
1,7Octadiene2, 7dimethyl 3,6 bis (methylene)	7.14	2.58	1.92	4.61	5.23
1-Undecanol	0.54	0.04	tr	1.54	0.46
2-Dodecanone	0.73	0.82	0.57	1.28	1.34
2-Dodecanone	1.38	1.80	0.97	2.96	2.90
1-Dodecanol	0.17	0.05	0.05	0.11	0.51
2-Tridecanone	1.71	1.00	0.80	1.81	3.57
E-11, 13-dimethyl-12-tetradecen-1-ol acetate	0.50	0.09	0.02	0.31	1.92
Elemol	0.19	tr	tr	0.12	0.36
Elemicin	0.45	tr	0.05	0.02	0.73
2-Butyl 4-(3',5'-benzo-dioxy)-acetate	1.21	0.00	0.25	0.17	0.57
6-(3',5'-Benzo-dioxy)-3,3-diméthyl-1-hexene	3.73	0.97	1.82	0.62	0.63
Chalepensisin	tr	0.12	0.80	0.02	0.02
Clausindin	3.22	2.06	0.76	0.01	tr
Composés identifiés au total (%)	81.19	96.49	66.67	93.52	79.81

Il apparaît au vu des résultats des tableaux 48 et 49 que le rendement et la composition chimique varient avec la durée de conservation. Après dix mois de conservation, le rendement a subi une variation de 1.24% à 0.06%. Ceci signifie que la plus grande partie des composés volatils s'est évaporée. Nous constatons aussi que le pourcentage du composé majoritaire le 2-undécanone varie avec le temps de conservation (54.19 %– 83.2%). D'après ces résultats, il est donc déconseillé de stocker la matière végétale pour une période assez prolongée.

Conclusion

Cette étude a pour but de contribuer à la connaissance des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L., espèce spontanée, très abondante en Algérie et à l'ouest du pays en particulier et dont les principes volatils posent de sérieux problèmes de normalisation pour leur commercialisation à cause de l'hétérogénéité de leur composition.

S'agissant de l'étude comparative entre les différentes parties de la plante, nous avons montré que l'huile essentielle est concentrée dans les fleurs. Elle représente deux fois, quatre fois la teneur à poids égal par rapport aux feuilles et tiges respectivement. L'analyse par GC et GC/SM des constituants volatils des différentes parties de la plante montre que les fleurs possèdent un seul constituant majoritaire : le 2undécanone (68.95%) et que les feuilles et les tiges sont riches en 2-undécanone, 2-nonanone et le 1-décanol.

Dans un second temps, notre étude confirme l'extraordinaire polymorphisme chimique pour la plante. En effet, la recherche de chemotype spécifique à la région ouest algérien s'est avérée peu concluante et confirme l'extrême variabilité de la teneur, et la composition chimique de l'huile essentielle en fonction de la situation géographique, conditions climatiques, altitude et aussi la période de cueillette. Les caractéristiques physiques et chimiques semblent ne donner que très peu d'informations permettant de situer les huiles essentielles de la plante. La conservation de la matière végétale pour une longue période, a montré une importante diminution de la teneur en huile essentielle.

Enfin les résultats de ce travail, peuvent être exploités pour l'utilisation par l'industrie des plantes aromatiques. On peut en effet, diriger la production et l'exploitation des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* en fonction des besoins des utilisateurs en produits bien déterminés qui sont censés exister en grandes proportions.

III. ACTIVITE BIOLOGIQUE

III.1. Activité antidiabétique

Des études expérimentales réalisées in vivo ont confirmées la capacité de la plante à contrôler la glycémie des diabétiques. Le principal but de notre étude est de rechercher le(s) composé(s) responsable(s) de cette activité antidiabétique remarquable de l'extrait aqueux des feuilles de *Globularia alypum*. La globularine est considérée comme composé majoritaire, on sait également que dans certains cas l'activité biologique d'une plante pourrait être due à ces composés. Ceci, nous a fait pensé que l'activité antidiabétique de *G. alypum* pourrait être attribuée à son composé majoritaire, la globularine.

Selon nos connaissances aucune activité pharmacologique portant sur ce thème n'a été étudiée sur la globularine, notre expérience représente le premier travail qui tend à investiguer l'activité antidiabétique de la globularine.

III.1.1. La toxicité de la globularine chez les rats

Les différentes doses utilisées n'avaient aucun effet létal. Les signes de toxicité observés étaient exceptionnels. La dose de 300 mg/kg ne provoque aucune toxicité apparente.

Avec les doses supérieures 600, 800, 1000 mg/kg, des troubles dans le comportement général des rats ont été observés durant la première heure, notamment une sédation interrompue de temps en temps par des contractures abdominaux, au-delà de cette durée l'animal se comporte normalement. Au 14^{ème} jour après l'injection de la substance à tester les rats des différents lots ont montré une croissance pondérale comparable aux rats du lot témoin.

III.1.2. L'effet diabétogénique de la STZ

Les résultats représentatifs de l'effet diabétogénique sont donnés dans le tableau 50

L'effet diabétogénique de la STZ est clairement montré par une augmentation significative de la glycémie ($p < 0.001$) et une diminution significative du poids corporel ($p < 0.01$) chez les rats mâles et femelles, 72 h après l'injection de la STZ.

A noter que ces deux paramètres ont été accompagnés par une polyphagie, une polydipsie, une polyurie et symptômes caractéristiques du diabète sucré.

Tableau 50 : L'effet de la streptozotocine sur la glycémie et le poids corporel des rats mâles et femelles.

Rats	Rats traités par la STZ (60mg/kg)		Rats traités par le tampon citrate (5ml/kg)	
	Mâles (n=11)	Femelles (n=11)	Mâles (n=3)	Femelles (n=3)
Glycémie t=0 (g/l)	0.76±0.03	0.81±0.05	0.74±0.01	0.77±0.09
Glycémie t=72h (g/l)	3.59 ±0.10 *** ^a	3.06±0.16*** ^a	0.92±0.10	0.84±0.10
Poids t=0 (g)	318.25±7.79	187.28±2.95	301.17±10.13	177.37±8.42
Poids t=72h (g)	289.25±7.27*** ^a	174.62±2.72*** ^a	308.57±11.12	180.53±8.14

^a par rapport à t=0, *** p<0.001, ** p<0.01.

III.1.3. Evolution de la glycémie chez des rats normaux et diabétiques en 480 minutes

Les figures 4 et 5 montrent l'effet de la globularine sur la glycémie à jeun des rats normaux et diabétiques comparés aux témoins. L'évolution de la glycémie a été suivie pendant 480min (0, 60, 120, 180, 240,360 et 480min), après une injection unique de la molécule à tester.

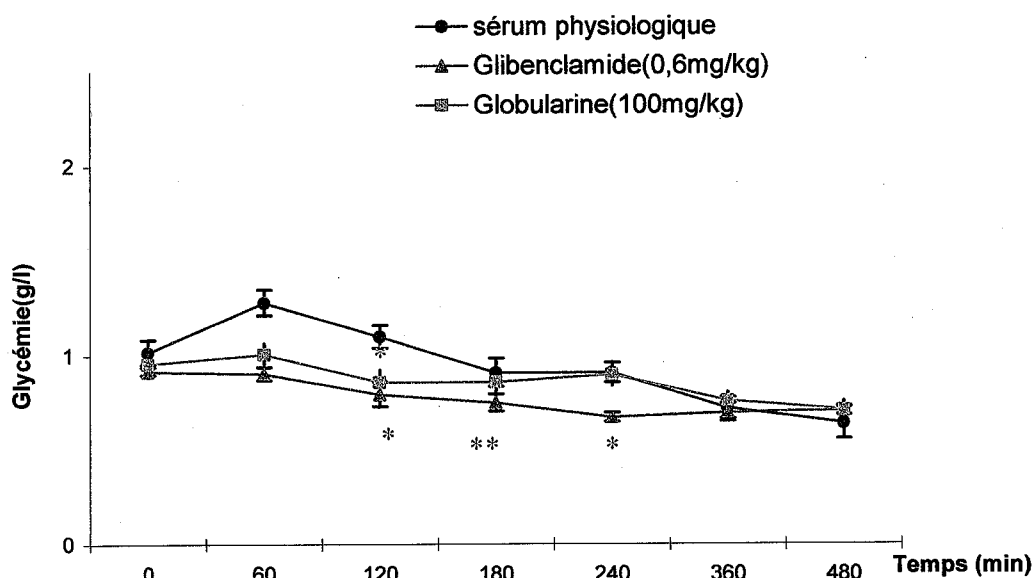


Figure 4 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie à jeun chez des rats normaux après injection intra- péritonéale à t=0min.

* (p<0. 05), ** (p<0. 01), par rapport à t=0. Chaque valeur représente une moyenne ±ES.

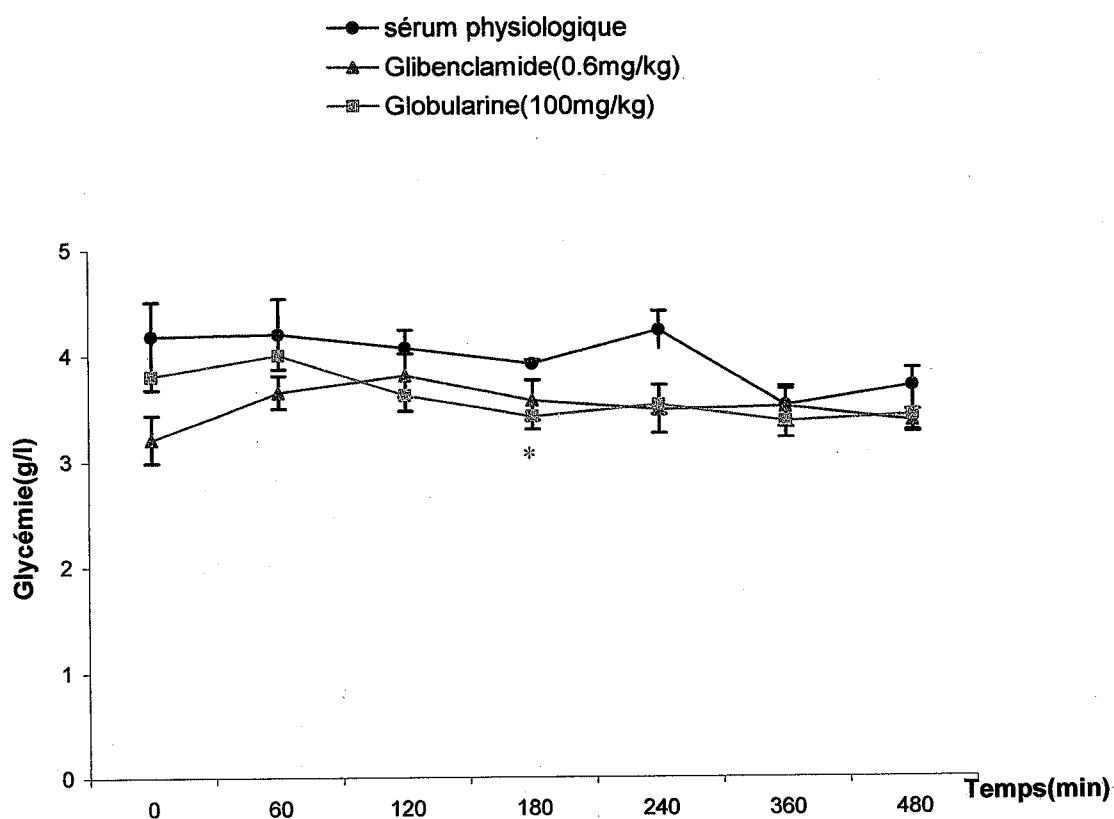


Figure 5 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie à jeun chez des rats diabétiques après injection intra- péritonéale à t=0min.

* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), par rapport à t=0. Chaque valeur représente une moyenne \pm ES.

La glycémie des rats normaux et diabétiques traités par le sérum physiologique n'a pas varié significativement ($p > 0.05$) durant les 8 heures de l'expérience.

Chez les rats normaux traités par la globularine, une diminution statistiquement significative de la glycémie a été observée à t=120min ($p < 0.05$), avec un pourcentage de diminution de 10.4 %, cet effet se maintient pendant 1h. Par ailleurs, les rats normaux traités par le glibenclamide, l'antidiabétique de référence, des diminutions de la glycémie sont observées à 120 min, à 180 min et à 240 min avec un pourcentage de diminutions de 14.13%, 18.47% et 27.17% respectivement.

L'administration de la globularine aux rats diabétiques, a diminué la glycémie de 10 % à t = 180min ($p < 0.05$), alors qu'aucun effet n'a été observé avec le glibenclamide.

III.1.4. Test de tolérance au glucose chez des rats normaux (TTG)

La figure 6 montre les résultats du test de tolérance au glucose effectué chez des rats normaux. Après une charge en glucose, la glycémie des rats normaux traités par le sérum physiologique, atteint un maximum d'augmentation à 30 min, ensuite la glycémie diminue progressivement pour revenir à son taux initial à partir de 120 min. La glycémie des rats normaux traités par la globularine suit le même profil d'évolution que la glycémie des rats traités par la solution saline. Par contre, le glibenclamide montre un effet positif, en prévenant l'augmentation de la glycémie observée chez les rats témoins entre 30 et 60 min, en effet la glycémie des rats traités par le glibenclamide varie très peu après gavage du glucose jusqu'à 120 min.

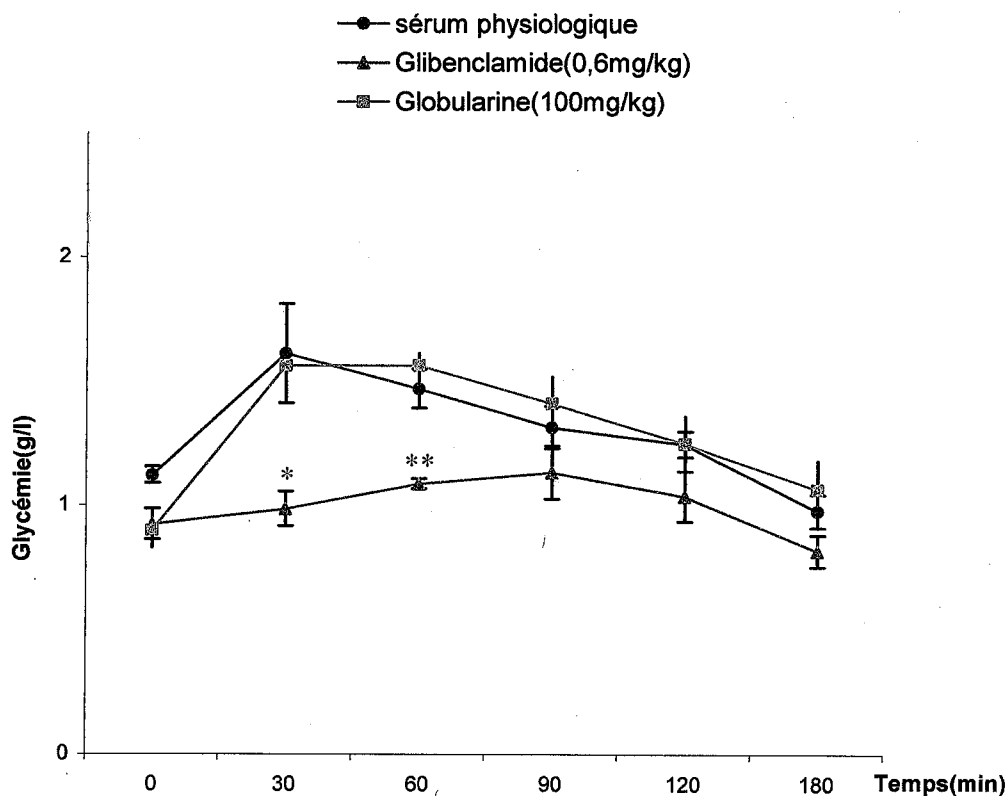


Figure 6 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie chez des rats normaux après une charge en glucose (2.5g/kg) à t=0min.

L'injection intra péritonéale de la globularine et du glibenclamide a été réalisée 90 min avant le gavage du glucose.

* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), par rapport aux rats traités par le sérum physiologique. Chaque valeur représente une moyenne \pm ES.

III.1.5. Evolution de la glycémie des rats diabétiques non à jeun (traitement sub-chronique)

La figure 7 représente les résultats de l'évolution de la glycémie non à jeun chez des rats effectuée sur une durée de 7 jours. Des rats diabétiques traités par le glibenclamide et par la globularine ont été comparés aux rats témoins non traités. Durant 7 jours, l'hyperglycémie a été maintenue chez les rats diabétiques traités par le sérum physiologique, comparés aux rats normo glycémiques. L'administration de la globularine aux rats diabétiques deux fois par jour, n'a pas montré de réduction de glycémie.

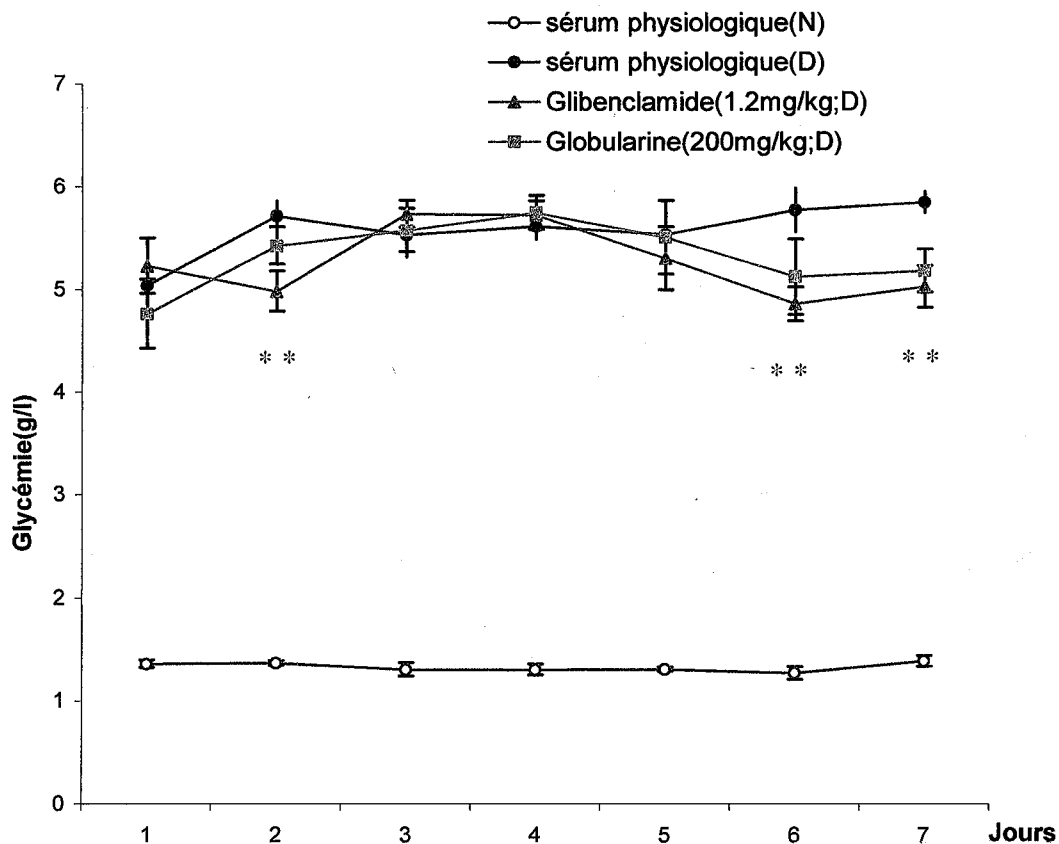


Figure 7 : Effet de la globularine et du glibenclamide sur la glycémie chez des rats diabétiques (D) traités pendant 7 jours.

L'injection intra péritonéale de la globularine et du glibenclamide a été réalisée 2 fois par jours, la glycémie a été mesurée après la première injection.

* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), par rapport aux rats traités par le sérum physiologique. Chaque valeur représente une moyenne \pm ES.

L'administration du glibenclamide aux rats diabétiques deux fois par jour, a été également inefficace sur l'hyperglycémie. Néanmoins, des faibles diminutions ont été notées aux 2^{ème}, 6^{ème} et 7^{ème} jours ($p < 0.01$), sans aucune amélioration de l'état diabétiques ; les symptômes du diabète persiste.

III.1.6. La glycémie à jeun et l'effet du traitement sur la triglycéridémie et la cholestérolémie

Après 7 jours de traitement, aucune amélioration de la glycémie à jeun n'a été observée ; tous les rats diabétiques des différents lots traités ont une hyperglycémie maintenue (tableau 51).

Le diabète sucré est associé à des troubles lipidiques caractéristiques : un taux des triglycérides élevé et un taux de cholestérol élevé. Ceux-ci sont clairement montrés dans le sérum de nos rats diabétiques comparés aux rats normaux (tableau 51).

Par ailleurs, les améliorations suivantes sont notées :

- ◆ Le taux des triglycérides des rats diabétiques traités par la globularine et par le glibenclamide a diminué d'une façon significative ; ($p < 0.01$) et ($p < 0.05$) respectivement.

- ◆ Le taux du cholestérol total, a diminué remarquablement chez les rats diabétiques traités par la globularine ($p < 0.05$).

Tableau 51: Glycémie et paramètres lipidiques dosés en fin de l'expérience (le 8^{ème} jour)
g/l.

Paramètres	Glycémie	Triglycérides	Cholestérol total
Rats normaux + NaCl (0.9%)	1.03±0.07	0.68±0.13	0.39±0.02
Rats diabétiques + NaCl (0.9%)	4.23±0.27	1.71±0.22 ^{**a}	0.53±0.04 ^{*a}
Rats diabétiques + le glibenclamide (0.12mg/kg/jour)	4.79±0.11	0.95±0.25 ^{*b}	0.51±0.03
Rats diabétiques + la globularine (200 mg/kg/jour)	4.22±0.36	0.79±0.07 ^{**b}	0.41±0.02 ^{*b}

^a par rapport aux rats normaux, ^b par rapport aux rats diabétiques NaCl . * < 0.05 , ** < 0.01 .

La toxicité aigüe de la globularine a été testée jusqu'à la dose de 1000 mg/kg chez des rats femelles. Même à cette dose élevée, la globularine n'a montré aucune toxicité notable. La globularine peut être considérée comme substance non toxique.

La streptozotocine est une glucosamine nitrosurée isolée pour la première fois à partir de *streptomyces achromogène*. C'est une molécule cytotoxique spécifique des cellules β -pancréatiques utilisée depuis longtemps pour l'induction du diabète expérimental chez l'animal. Les altérations métaboliques résultantes de l'action de la streptozotocine sont liées en premier lieu au déficit de l'insuline (destruction sélective des cellules β -pancréatiques), le degré et la sévérité du diabète dépend surtout de la dose injectée.

Le glibenclamide agit sur le pancréas et stimule la sécrétion de l'insuline, qui à son tour tend à diminuer l'hyperglycémie. L'administration du glibenclamide aux rats normaux à jeun et chargé par le glucose (TTG) stimule la sécrétion de l'insuline, hormone responsable de la diminution de la glycémie notée chez ces rats. Par contre la globularine n'a pas été efficace dans ces deux expériences, cela laisse à suggérer que la globularine n'a aucun effet sur le pancréas. L'inefficacité du glibenclamide chez nos rats diabétiques explique bien que dans notre cas, il s'agit bien d'un diabète sévère, résultant d'une destruction importante des cellules β -pancréatiques. Faire descendre l'hyperglycémie chez ces rats, ne peut être vraiment réalisé qu'en présence de l'insuline ou d'une substance à activité insulino-mimétique. L'absence de l'effet hypoglycémiant de la globularine chez les rats normaux, explique bien que cette irridoïde serait sans effet chez les rats diabétiques, même après administration quotidienne.

Un effet notable sur les paramètres lipidiques ; une diminution des taux des triglycérides et du cholestérol, a été notée chez les rats diabétiques traités par la globularine en dehors de toute diminution de l'hyperglycémie, ce résultat nous oriente à l'étude d'une autre activité biologique potentielle liée à la globularine; l'effet hypolipidémiant.

III.2. Pouvoirs antibactériens et antifongiques des extraits et des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L (méthode des disques)

III.2.1. Effet des ATB, des extraits et des huiles essentielles

Les résultats de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des ATB, des extraits (RCS1F, RCS1T, RCS1G, RCS1R, RCS2F, RCS2T, RCS2G, RCS2R, RCS3F, RCS3T, RCS3G et RCS3R) et des huiles (HE1(huile de la plante récoltée en Avril 2005 de Beni Mester), HE2 (huile de la plante récoltée en Avril 2005 de Ouzidane)) issus de *Ruta chalepensis* sont donnés respectivement dans le tableau 52 et représentés sous forme d'histogrammes (figures 8 – figure 11).

Tableau 52 : Antibiogramme : diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes souches dans le cas de *Ruta chalepensis* (la méthode de Vincent).

Extraits	Ec.	Pa.	Sa	Lm
RCS1F	20	i	i	i
RCS2F	13	i	13	12
RCS3F	i	24	12	i
RCS1T	23	i	14	20
RCS2T	17	i	15	17
RCS3T	i	i	11	i
RCS1R	25	i	15	20
RCS2R	21	i	14	23
RCS3R	i	i	12	i
RCS1G	22	i	i	16
RCS2G	17	i	13	20
RCS3G	i	i	16	i
HE1	10	i	i	i
HE2	i	i	i	i
GT	22	14	23	20
Pip	13	20	i	i

GT : Gentamicine ; Pip : Pipéracilline ; F : feuilles ; T : tiges ; R : racines ; G : fruits.

S1 : éther diéthylique, S2 : éthanol, S3 : eau.

i : inactif (diamètre $d \leq 6$ mm).

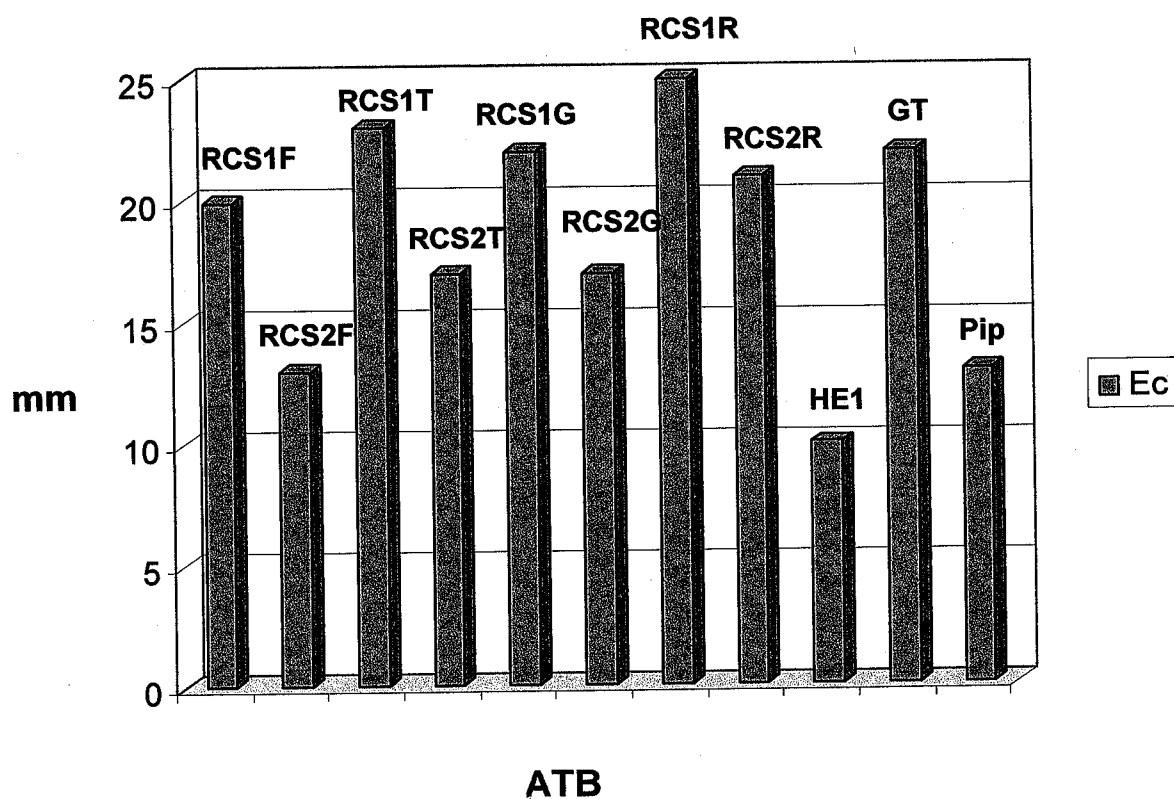


Figure 8 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition de la souche Ec.

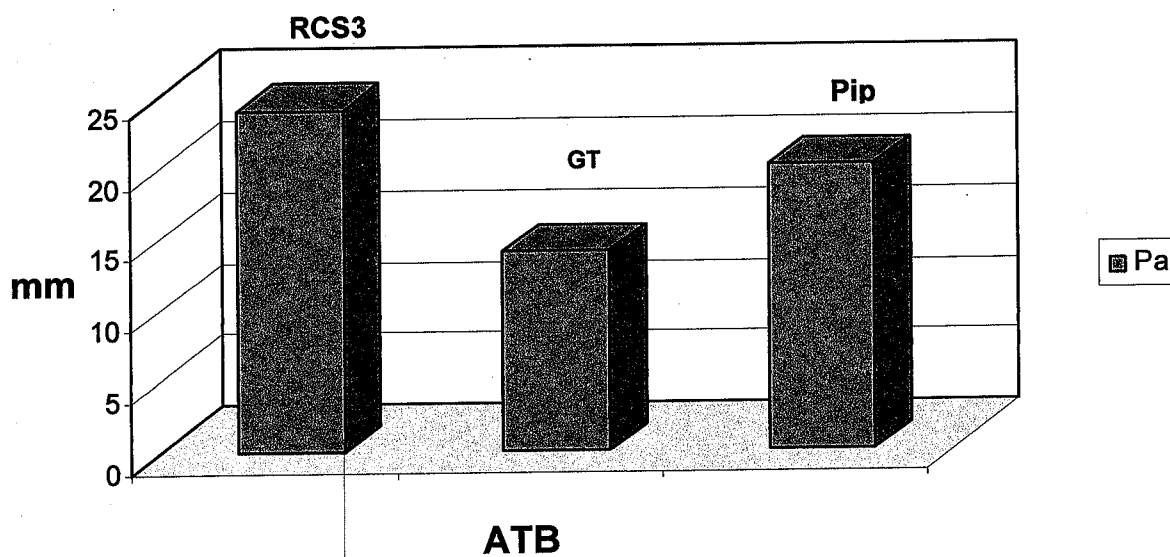


Figure 9 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition de la souche Pa.

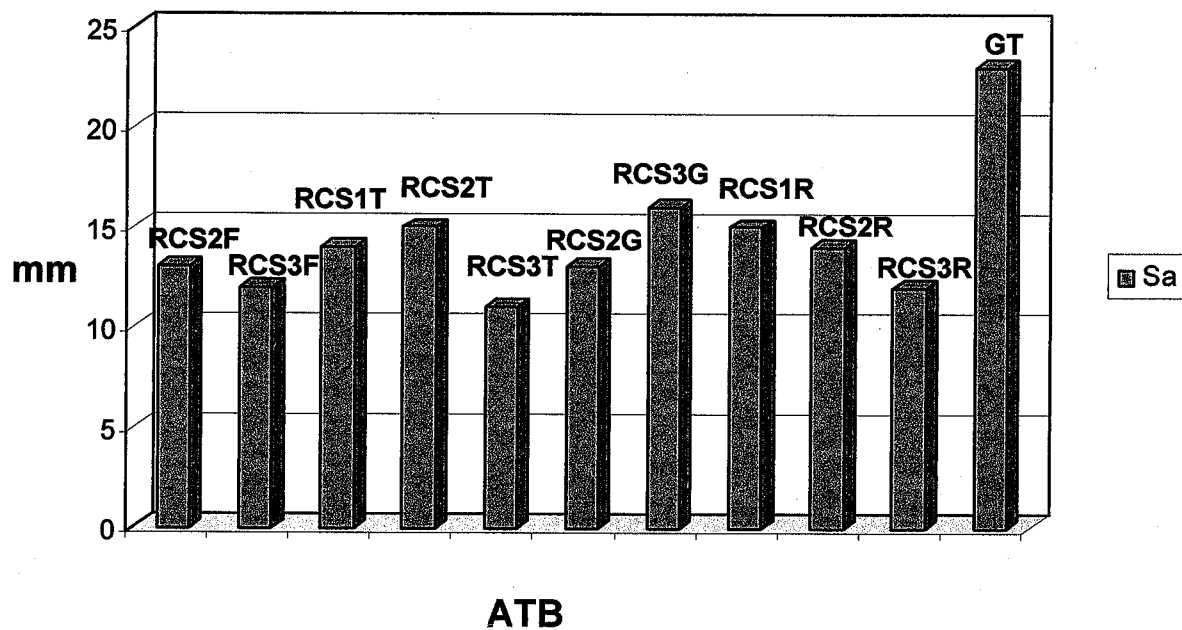


Figure 10 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition de la souche Sa.

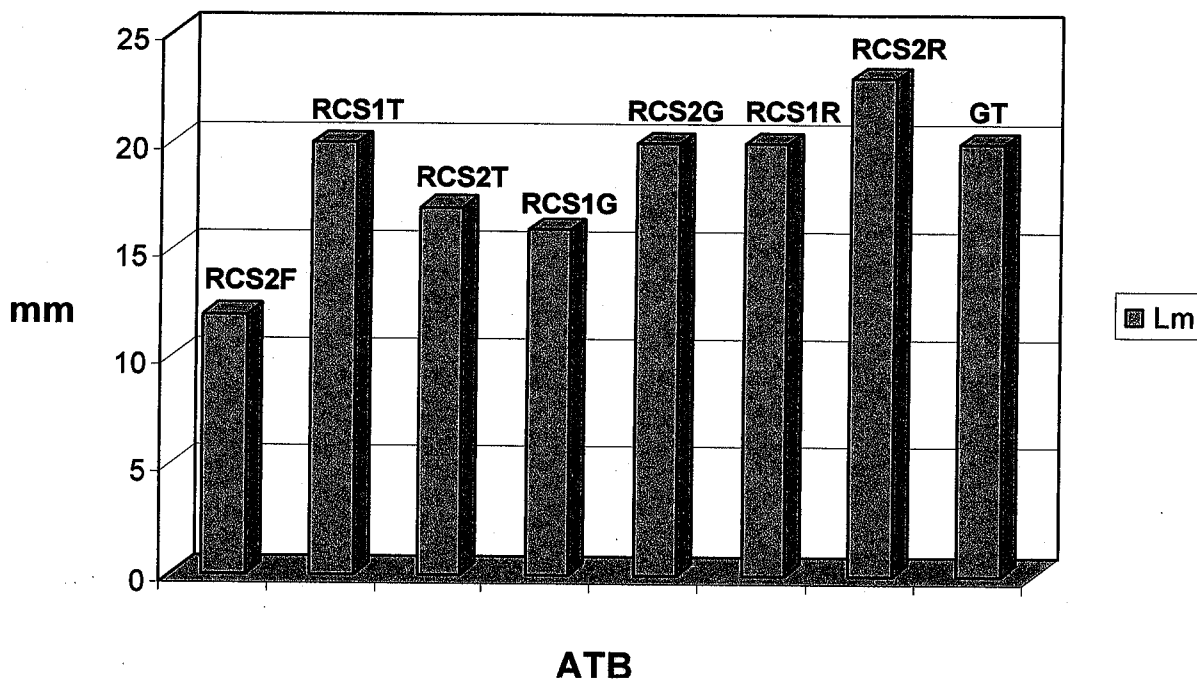


Figure 11 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition de la souche Lm.

Comme le montrent les résultats ci-dessus, *Escherichia coli* (Ec) est sensible aux extraits RCS2F, RCS2T et RCS2G, alors qu'elle est fortement inhibée par les extraits RCS1F, RCS1T, RCS1R, RCS2R et RCS1G avec respectivement des diamètres d'inhibition 20, 23, 25, 21 et 22 mm. Ainsi, il ressort que *Pseudomonas aeruginosa* se révèle très résistante à la plupart des ATB utilisés, alors qu'elle est fortement inhibée par l'extrait RCS3F avec un diamètre d'inhibition de 24 mm. *Staphylococcus aureus* (Sa) est moyennement inhibée par les extraits RCS2F, RCS3F, RCS1T, RCS2T, RCS3T, RCS1R, RCS2R, RCS3R, RCS2G et RCS3G. *Listeria monocytogens* (Lm) est fortement inhibée par RCS1T, RCS1R, RCS2R et RCS2G, alors qu'elle est très résistante aux extraits RCS1F, RCS3F, RCS3T, RCS3R et RCS3G. Cependant, les huiles essentielles ne possèdent pas une activité antibactérienne.

III.2.2. Effet des ATF, des extraits et des huiles essentielles

Les résultats de la sensibilité des moisissures et des levures vis-à-vis des ATF, des extraits et des deux huiles essentielles issus de *Ruta Chalepensis* L. par la méthode des diamètres des zones d'inhibition sont reportés respectivement dans le tableau 53 et représentés sous forme d'histogrammes (figures 12 – figure 16).

Tableau 53 : Antifongogramme : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition des différentes souches.

Extraits	Ca	An	Af	A	T
RCS1F	15	17	I	i	I
RCS2F	17	14	19	13	14
RCS3F	i	i	i	i	i
RCS1T	15	i	19	i	15
RCS2T	19	i	22	i	i
RCS3T	i	i	i	i	i
RCS1R	19	15	18	19	19
RCS2R	21	20	26	25	26
RCS3R	i	i	i	i	i
RCS1G	15	18	16	15	14
RCS2G	19	i	i	i	i
RCS3G	i	i	i	i	i
HE1	10	19	20	20	16
HE2	12	22	21	21	20
AmB	15	i	i	i	i
EC	14	35	20	39	42

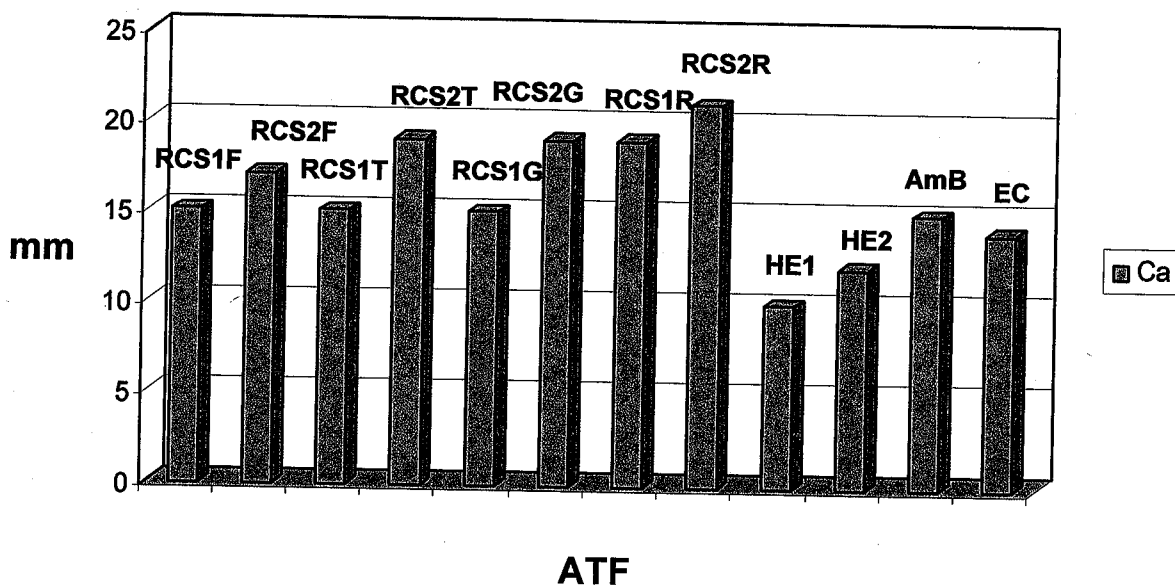


Figure 12 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Candida albicans* Ca.

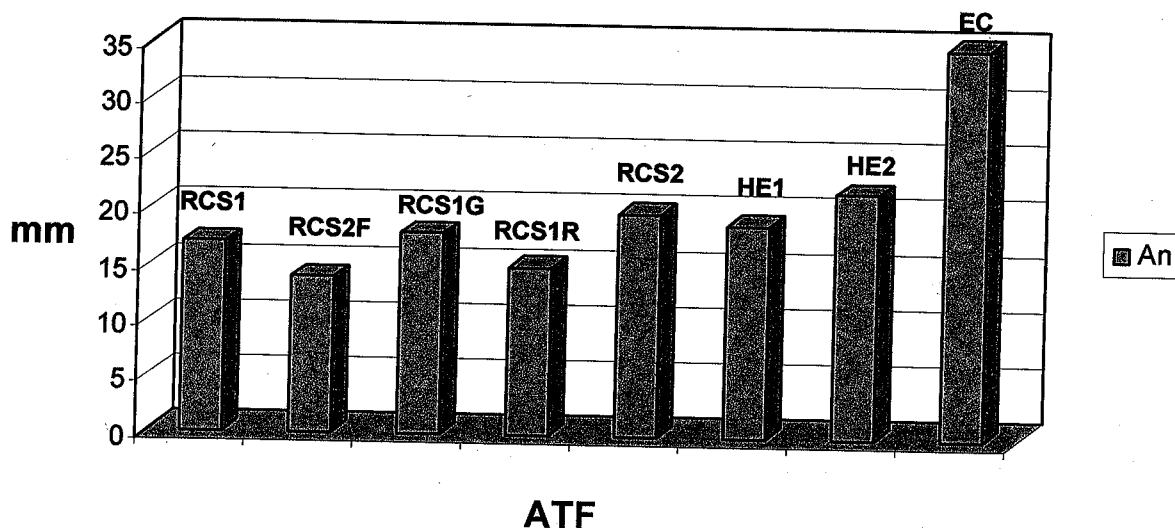


Figure 13 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'*Aspergillus niger*.

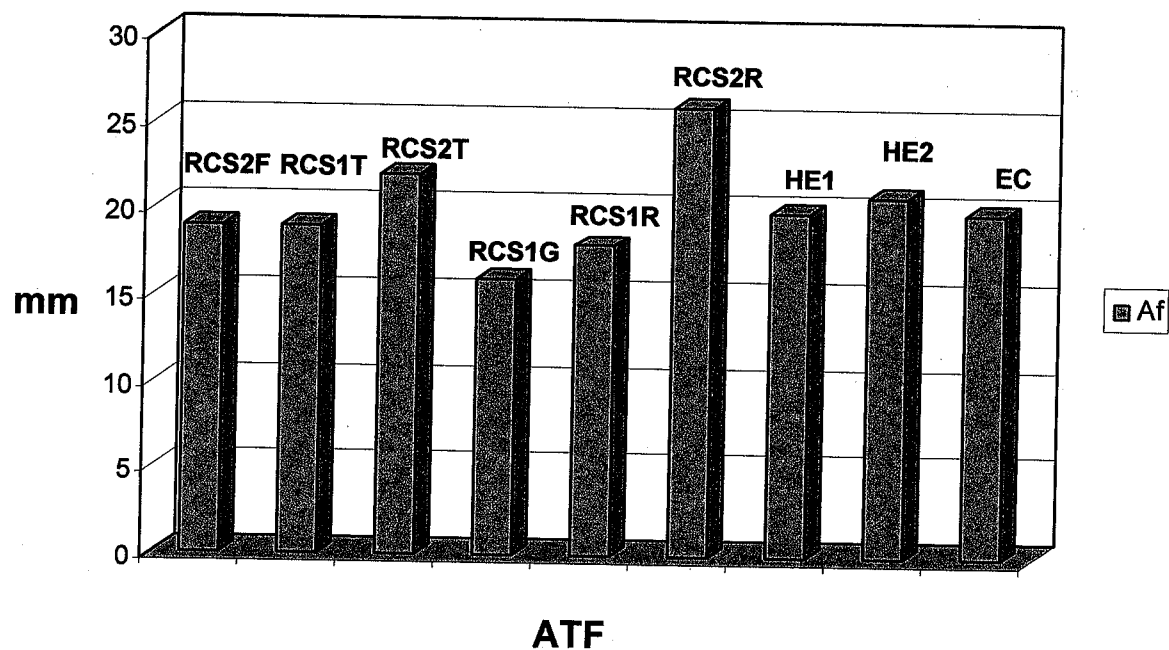


Figure 14 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'*Aspergillus flavus*.

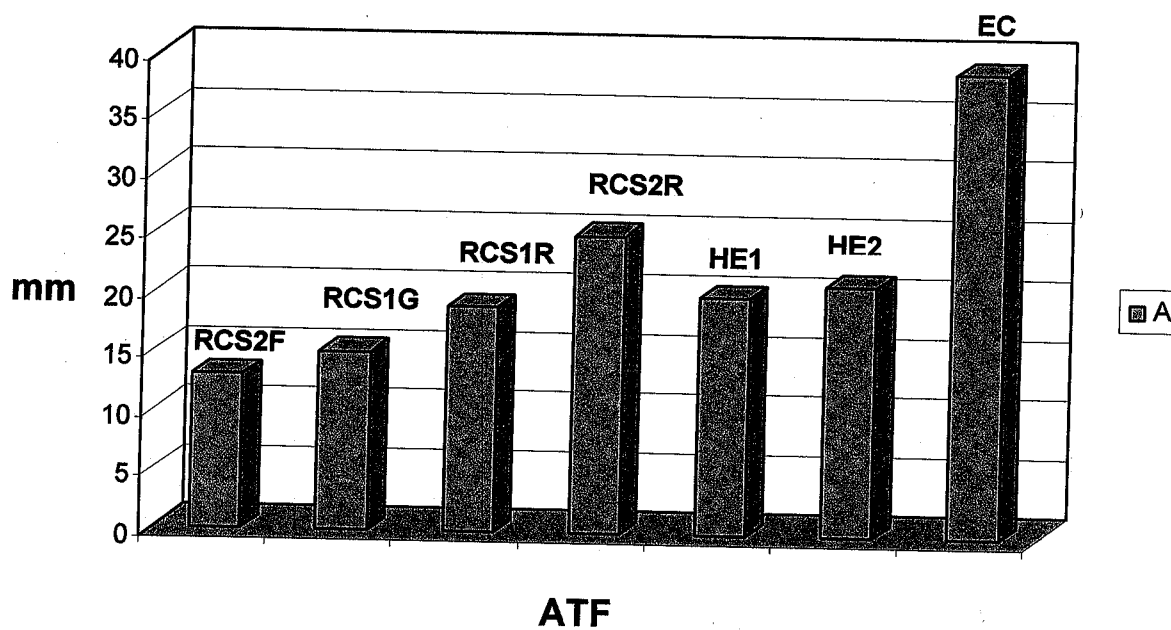


Figure 15 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'*Alternaria*.

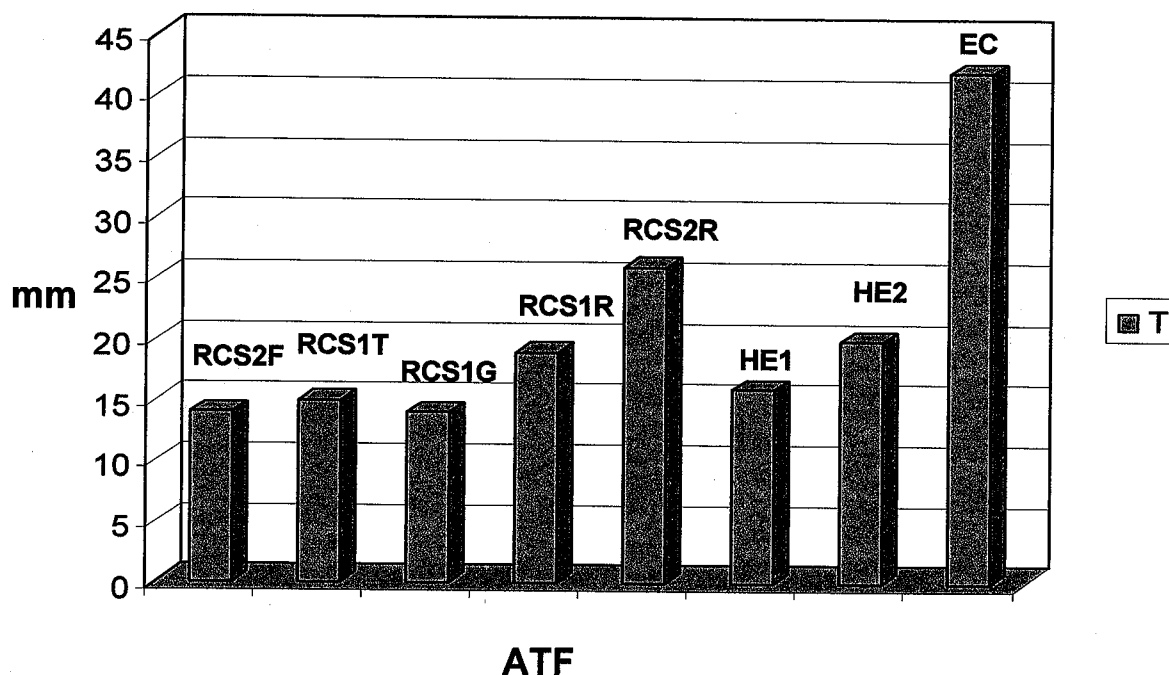


Figure 16 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Trichoderma*.

Si l'on considère l'ensemble des résultats, il ressort que certains extraits sont inactifs pratiquement sur certaines souches testées. Par contre d'autres extraits possèdent une activité antifongique intéressante : *Candida albicans* (Ca) est inhibée fortement par RCS2R (diamètre d'inhibition = 21 mm). Certains extraits inhibent considérablement la croissance des moisissures (diamètre d'inhibition de 20 à 26 mm)

De même, les huiles essentielles possèdent une activité antifongique intéressante (diamètre d'inhibition de 16 à 21 mm)

III.3. Pouvoirs antibactériens et antifongiques des extraits et des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* L : la détermination de la CMI par la méthode de contact directe

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) des différents extraits et des deux huiles essentielles de *Ruta Chalepensis* L. obtenus par la méthode de contact directe en milieu gélosé sur les bactéries, levure et les moisissures sont reportés dans le tableau 54 et 55. Dans tous les cas, les C.M.I. (concentrations minimales inhibitrices) sont exprimées en $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Tableau 54 : Résultats de l'effet des différents extraits sur les bactéries par la méthode de contact direct en ($\mu\text{g/ml}$).

Extraits	Ec.	Pa.	Sa	Lm
RCS1F	i	i	i	150
RCS2F	15	14	19	13
RCS3F	i	i	i	i
RCS1T	i	i	19	i
RCS2T	i	i	22	i
RCS3T	i	i	i	i
RCS1R	17	15	18	19
RCS2R	23	20	26	25
RCS3R	i	i	i	i
RCS1G	14	18	16	15
RCS2G	i	i	i	i
RCS3G	i	i	i	i
HE1	1%	i	i	1%
HE2	4%	i	1%	1%

i : inactif jusqu'à la concentration 600 ($\mu\text{g/ml}$).

Tableau 55 : Résultats des différents extraits sur le développement des spores par la méthode de contact direct en ($\mu\text{g/ml}$).

Extraits	Ca.	An	Af	A	T
RCS1F	600	150	+	150	+
RCS2F	+	150	150	150	150
RCS3F	+	+	+	+	+
RCS1T	600	150	300	150	150
RCS2T	+	150	150	150	150
RCS3T	+	+	+	+	+
RCS1R	+	150	300	150	150
RCS2R	+	150	150	150	150
RCS3R	+	600	600	+	600
RCS1G	+	150	150	150	150
RCS2G	+	+	+	+	+
RCS3G	+	+	+	+	+
HE1	4%	>100 $\mu\text{l/ml}$	100 $\mu\text{l/ml}$	20 $\mu\text{l/ml}$	100 $\mu\text{l/ml}$
HE2	4%	>100 $\mu\text{l/ml}$	>100 $\mu\text{l/ml}$	21 $\mu\text{l/ml}$	100 $\mu\text{l/ml}$

+ : croissance

Les résultats obtenus montrent que les microorganismes les plus sensibles sont les bactéries et plus particulièrement *Listeria monocytogens* (Lm) (C.M.I = 13 mg/ml).

En aromathérapie, nous avons :

CMI < 50 $\mu\text{l.ml}^{-1}$: excellent pouvoir inhibiteur

50 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ < CMI < 250 $\mu\text{l.ml}^{-1}$: pouvoir inhibiteur intéressant

250 $\mu\text{l.ml}^{-1}$ < CMI < 500 $\mu\text{l.ml}^{-1}$: faible pouvoir inhibiteur

CMI > 500 $\mu\text{l.ml}^{-1}$: pouvoir inhibiteur médiocre ou nulle

D'après ceci, nous remarquons que les bactéries et la levure résistent aux huiles essentielles, alors que ces dernières possèdent un pouvoir inhibiteur intéressant vis-à-vis *Asprgillus niger*(An), *Aspergillus flavus* (Af) et *Trichoderma sp* (T). *Alternaria sp* (A) est fortement inhibée par les échantillons des huiles essentielles.

Conclusion

D'une façon générale, certains extraits issus des différentes parties de *Ruta chalepensis* possèdent une bonne activité antimicrobienne : comparable ou certaine fois meilleure à celle donnée par les antibiotiques et les antifongiques utilisés.

Quant aux huiles essentielles, elles possèdent un pouvoir inhibiteur faible ou même nul vis-à-vis les bactéries et la levure. Par contre, la majorité des moisissures utilisées sont fortement inhibées par ces deux échantillons d'huiles essentielles.

IV. DOSAGE DES METAUX

IV.1. Pourcentage de la matière minérale

Nous avons déterminé la teneur des éléments minéraux (%) dans les différents organes de la plante étudiée, par la formule suivante :

$$\% = \frac{M_c}{M_s} \times 100$$

M_c : matière sèche après calcination.

M_s : matière sèche avant calcination.

Les résultats obtenus sont donnés dans les tableaux 56 et 57.

Tableau 56: Les rendements de la calcination des différents organes de *Globularia alypum* L.

Les Organes	Grains	Feuilles	Tiges	Racines
Rendement (%)	5.46	4.85	2.59	12.17

Tableau 57 : Les rendements de la calcination des différents organes de *Ruta Chalepensis* L.

Les Organes	Grains	Feuilles	Tiges	Racines
Rendement (%)	11,03	9,92	6,14	3,15

Selon ces résultats, on note que, la matière minérale est plus concentrée dans

- les racines, que dans les autres organes dans le cas de *Globularia alypum* L.
- les grains et les feuilles que dans les autres organes dans le cas de *Ruta chalepensis* L.

IV.2. Concentration des métaux lourds dans *Globularia alypum* L. et *Ruta chalepensis* L.

Pour obtenir une teneur véritablement « totale » du métal, on doit dissoudre toutes les formes de l'élément. Pour cela, plusieurs extractants exposés dans la littérature, sont considérés comme donnant des teneurs totales. Ce sont l'acide fluorhydrique, l'acide nitrique, l'acide chlorhydrique, ou une combinaison de plusieurs acides (eau régale, réactif triacide).

Les résultats de la spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA) des solutions préparées par attaque acide (HCl, HNO₃ et eau régale) sont indiqués respectivement dans les tableaux 58, 59, et 60 dans le cas de *Globularia alypum* L. et dans les tableaux 61, 62 et 63 dans le cas de *Ruta chalepensis* L. Les métaux dosés sont Co, Cd, Cu, Fe, Pb, Zn et Ni.

Tableau 58 : Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de *Globularia alypum* L. (extraction avec HCl)

Les Organes	Grains (G)	Feuilles (F)	Tiges (T)	Racines (R)
Co	7.217	7.440	4.133	11.135
Cd	0.000	0.000	0.000	0.000
Cu	48.455	15.954	14.810	2.313
Fe	485.585	272.813	273.121	1709.693
Pb	13.403	13.295	14.810	13.705
Zn	166.501	189.320	130.878	366.608
Ni	16.496	14.359	8.266	41.971

Tableau 59 : Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de *Globularia alypum* L. (extraction avec HNO₃)

Les Organes	Grains (G)	Feuilles (F)	Tiges (T)	Racines (R)
Co	8.323	3.388	1.882	40.535
Cd	0.000	0.177	1.434	0.000
Cu	11.524	13.698	12.716	10.372
Fe	510.915	148.322	148.491	1669.083
Pb	21.128	10.900	22.40	72.724
Zn	218.323	67.754	157.992	215.789
Ni	21.768	8.985	5.172	70.340

Tableau 60 : Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de *Globularia alypum* L. (extraction avec eau régale)

Les Organes	Grains (G)	Feuilles (F)	Tiges (T)	Racines (R)
Co	3.618	1.752	1.548	4.865
Cd	0.000	0.117	0.000	0.000
Cu	11.351	12.265	15.217	8.069
Fe	620.068	176.68	64.803	1801.293
Pb	9.932	13.433	10.757	30.852
Zn	421.142	201.207	43.552	360.733
Ni	23.412	22.778	11.806	52.211

Tableau 61 : Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de *Ruta Chalepensis* L. (extraction avec HCl)

Les Organes	Grains (G)	Feuilles (F)	Tiges (T)	Racines (R)
Co	1.45	458,73	0.76	340,37
Cd	0,61	0,82	0,88	0,62
Cu	40,80	243,44	48,10	178,06
Fe	335,02	3268,32	73.13	2469,63
Pb	12,99	14,82	12,24	12,68
Zn	6,29	6,64	2,30	1,62
Ni	13.284	17.658	17.323	12.442

Tableau 62 : Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de *Ruta Chalepensis* L. (extraction avec HNO₃).

Les Organes	Grains (G)	Feuilles (F)	Tiges (T)	Racines (R)
Co	0	0	0	0
Cd	0	0	0	0
Cu	0	0	0	0
Fe	133,38	183,53	31,73	63,30
Pb	13,07	17,92	13,01	17,61
Zn	0,46	0,60	0,98	0,46
Ni	12.488	13.931	9.866	8.691

Tableau 63 : Concentration des métaux lourds (ppm) dans les différents organes de *Ruta Chalepensis* L. (extraction avec l'eau régale).

Les Organes	Grains (G)	Feuilles (F)	Tiges (T)	Racines (R)
Co	0	13,50	0	374,57
Cd	0	0	0	0,01
Cu	0	0	0	204,20
Fe	44,38	86,63	78,50	2538,37
Pb	10,29	18,65	9,14	12,19
Zn	5,42	2,23	0,36	4,78
Ni	12.648	20.716	7.114	29.384

Vu la différence entre les résultats obtenus par les trois extractants, il semble bien que ces derniers ne soient pas capables d'extraire de l'échantillon la totalité du métal et on ne peut donc pas estimer rigoureusement la teneur des métaux. Ainsi, pour pouvoir obtenir une teneur véritablement « totale », on doit dissoudre toutes les formes assimilables de l'élément.

En effet, les plantes prélèvent majoritairement les éléments traces par les racines via la solution du sol. Ce prélèvement racinaire se fait sous formes ionique pour certains métaux (Cd, Zn), sous forme de complexes anioniques (Cd) et sous forme de complexes organiques pour d'autres (Pb, Fe).

La quantification de ces formes assimilables nécessite des études de spéciation en solution. La notion de spéciation est définie comme la répartition et la quantification des différentes formes de l'élément dans le sol qui réunie, donnent sa concentration totale. La spécification contribue à définir la mobilité des éléments traces et permet donc d'établir des perspectives de comportements et d'évolution des éléments traces en fonction des conditions du milieu et de leur modification.²¹⁰⁻²¹²

Malgré ces incertitudes, il est possible d'évaluer dans notre cas le pouvoir d'extraction de chaque solution acide utilisée pour chaque métal dosé. Les résultats d'extraction de chaque métal par les trois solutions acides sont représentés sous forme d'histogrammes par les figures 17-23 dans le cas de *Globularia alypum* et les figures 24 – 30 dans le cas de *Ruta chalepensis*.

a) *Globularia alypum* L.

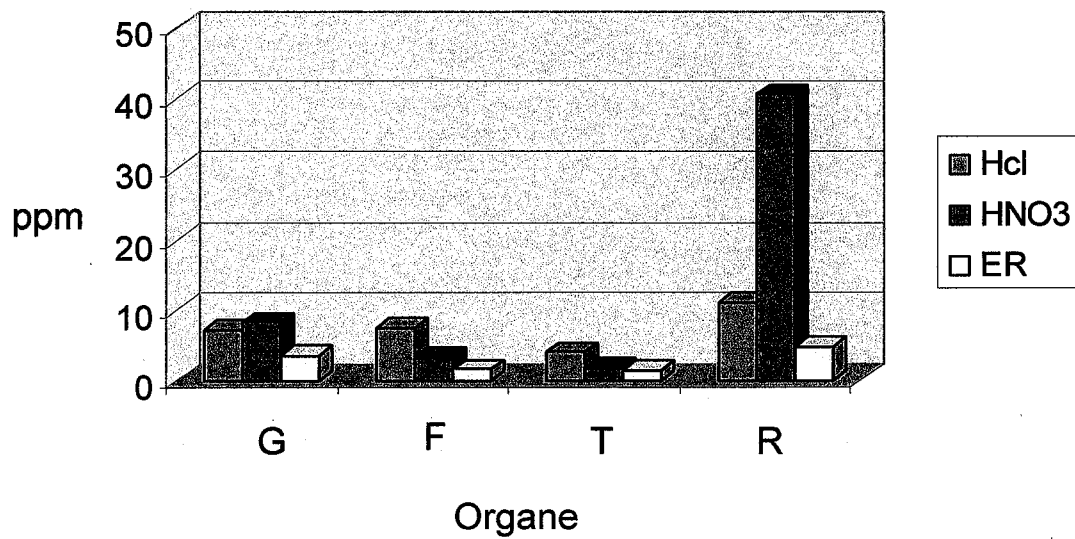


Figure 17 : Concentration de Co (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

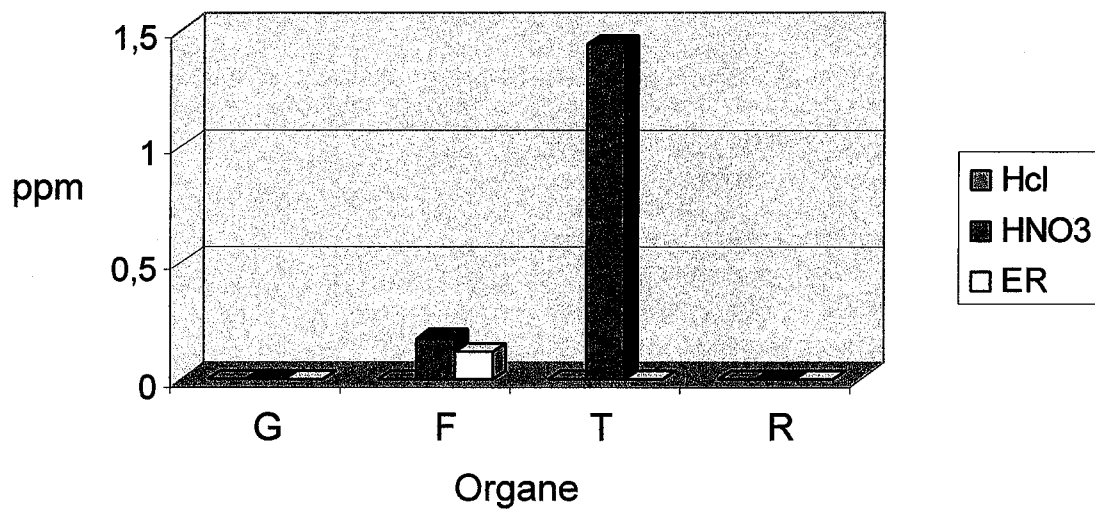


Figure 18: Concentration de Cd (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

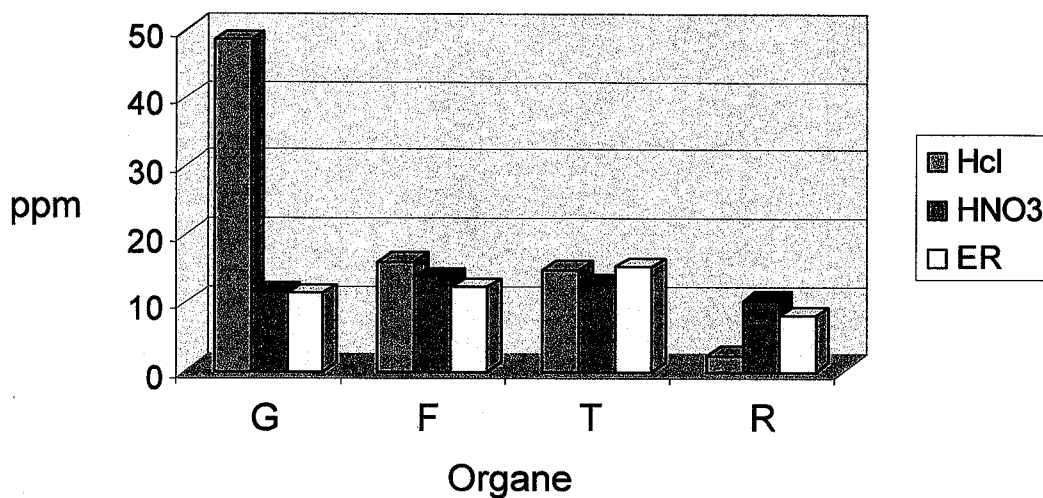


Figure 19: Concentration de Cu (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

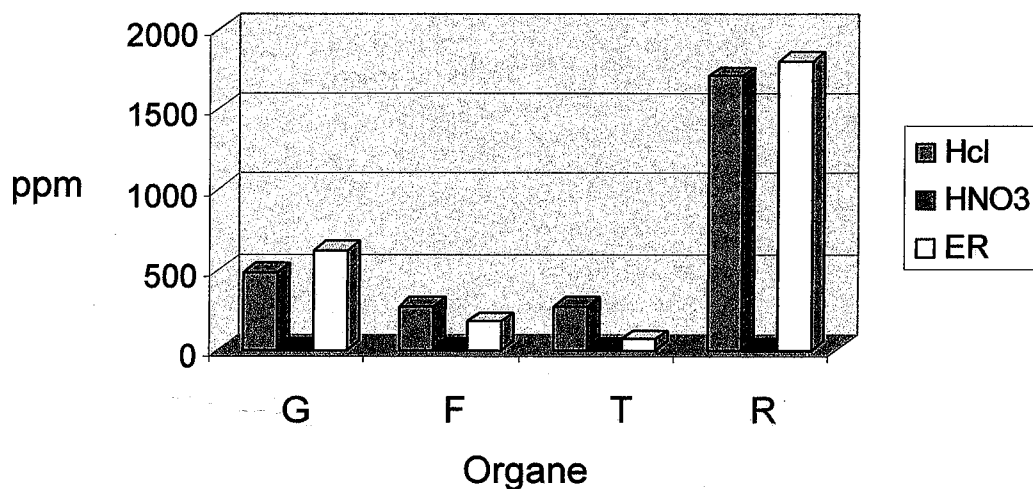


Figure 20: Concentration de Fe (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

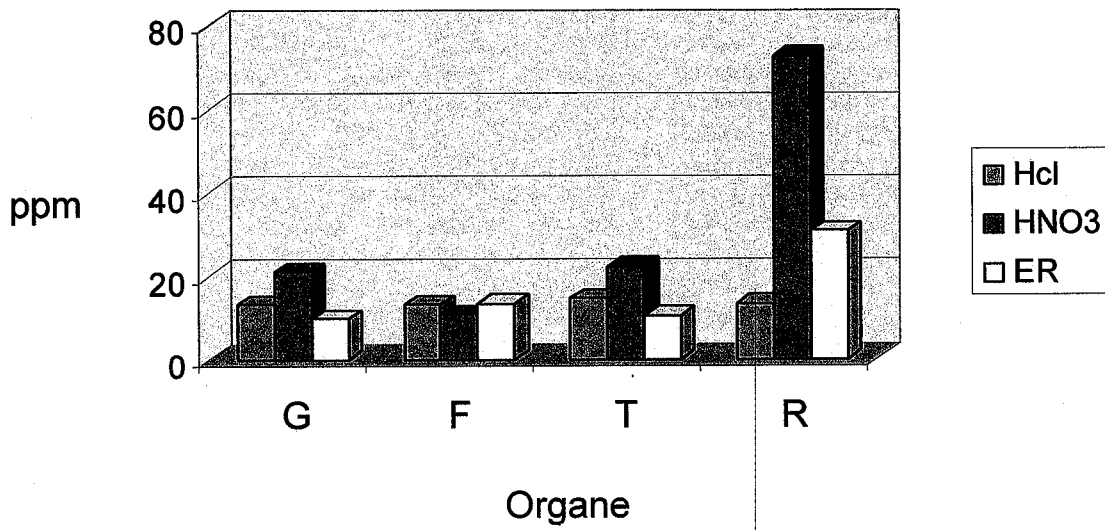


Figure 21: Concentration de Pb (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

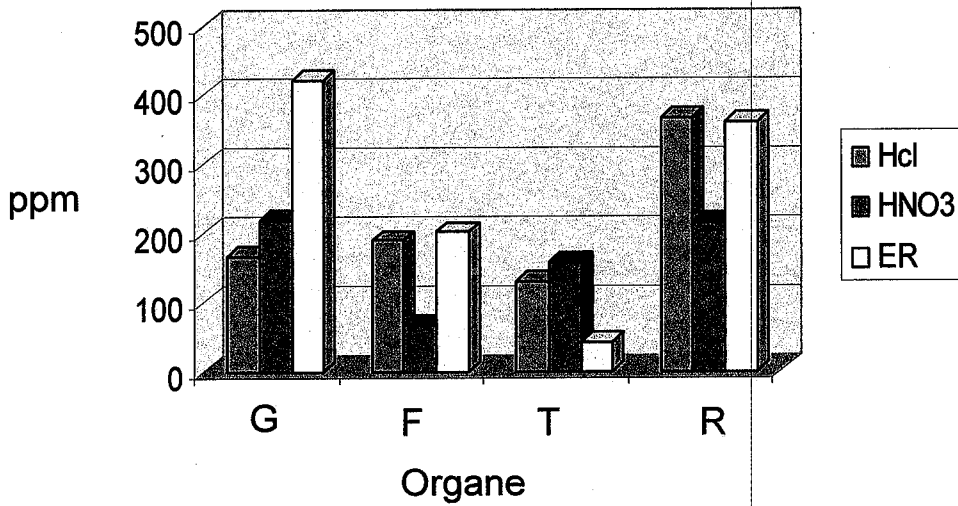


Figure 22: Concentration de Zn (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

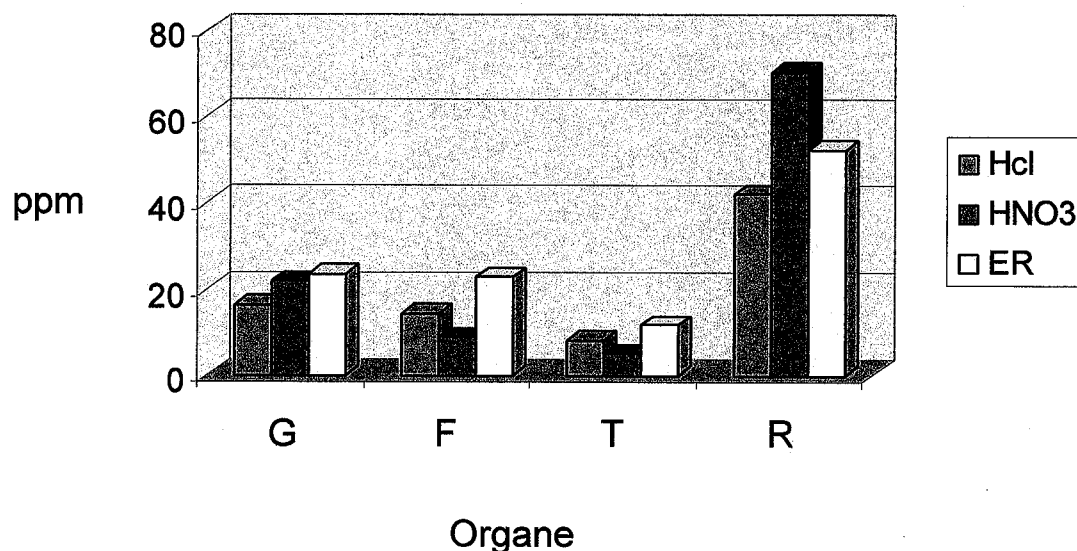


Figure 23: Concentration de Ni (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

Après traitement et extraction des différents organes de la plante étudiée respectivement avec HCl, HNO₃, et l'eau régale, les teneurs en métaux lourds obtenues montrent que la nature de l'acide employé et le type d'organe soumis à notre investigation jouent un rôle important dans la facilité d'extraction d'un métal donné.

Il ressort des ces histogrammes d'une part que :

- HCl extrait mieux le Cu ;
- HNO₃ extrait mieux le Co, le Pb, le Cd et le Ni ;
- L'eau régale extrait mieux le Fe, le Zn.

D'autres part, on remarque que la concentration des métaux lourds varie d'un organe à l'autre dans la plante. En effet, le Pb, Fe, Co, Ni et Zn se fixent préférentiellement dans les racines et les fruits. Le Cd se concentre dans les tiges. Le Cu se fixe dans les fruits. En effet, les teneurs en Cu, Pb et Fe dépassent très largement le seuil de phytotoxicité.

b) *Ruta chalepensis* L.

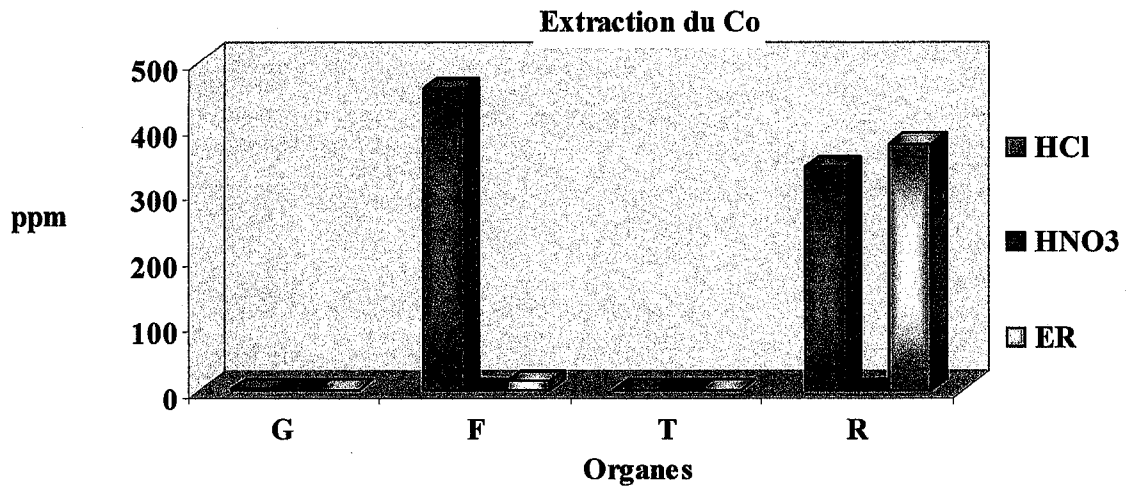


Figure 24: Concentration de Co (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

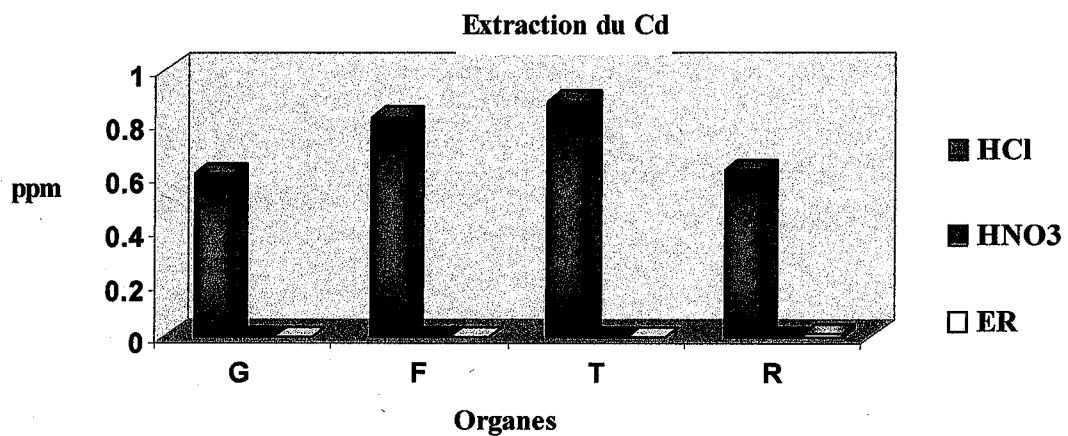


Figure 25: Concentration de Cd (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

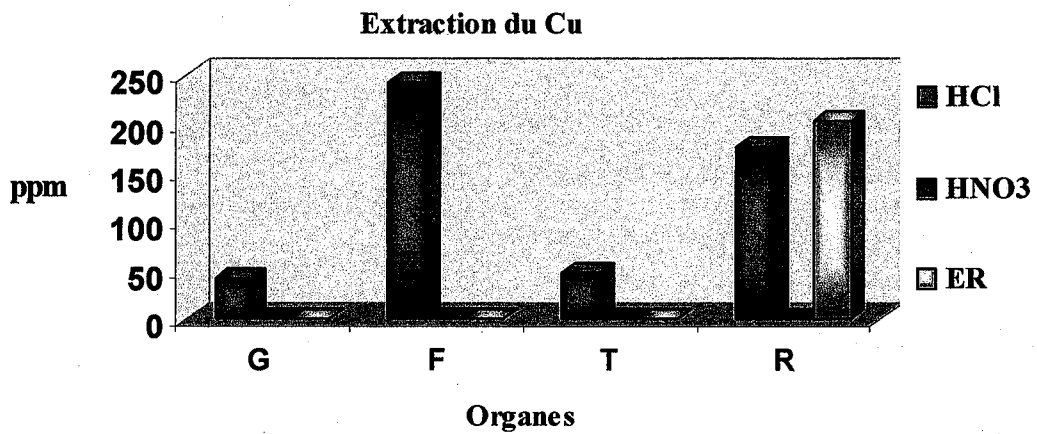


Figure 26: Concentration de Cu (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

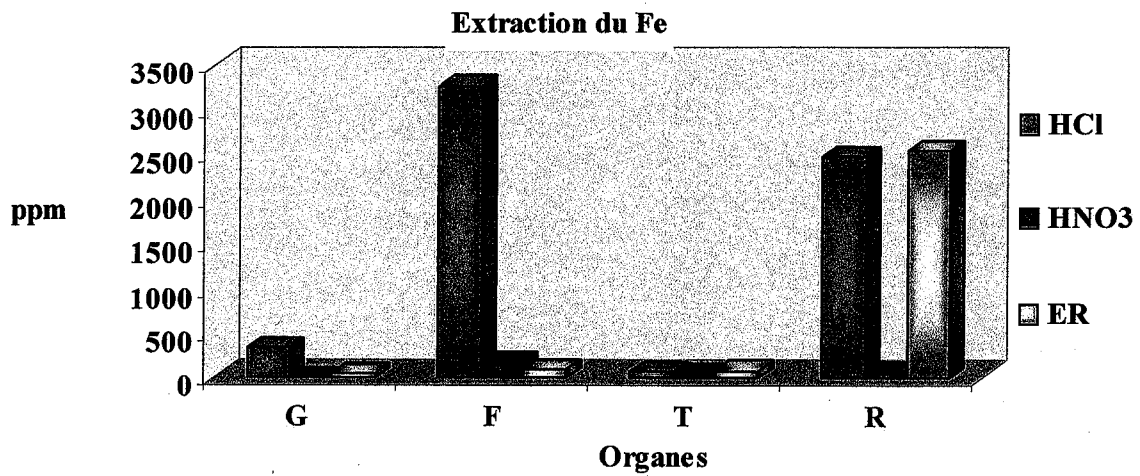


Figure 27: Concentration de Fe (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

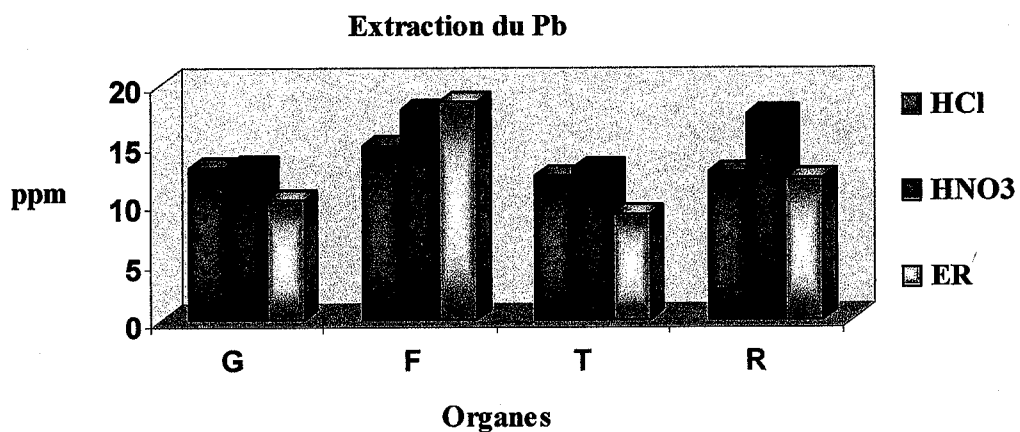


Figure 28: Concentration de Pb (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

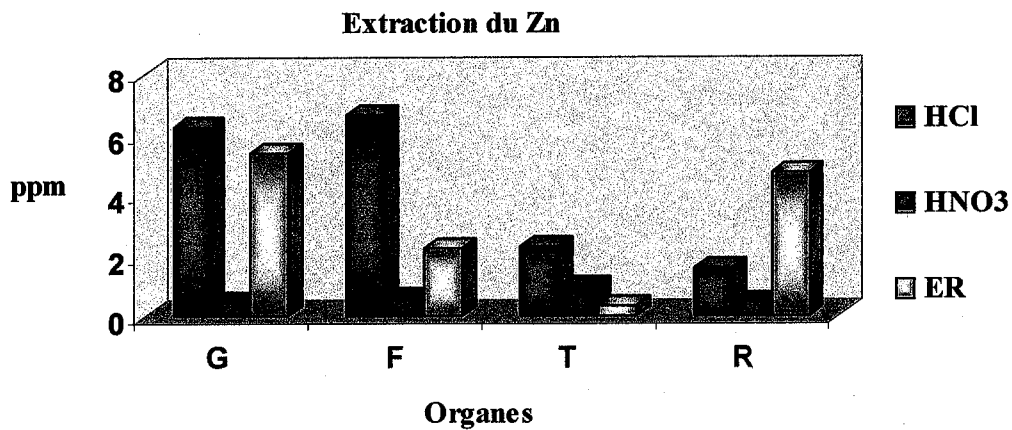


Figure 29: Concentration de Zn (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER)

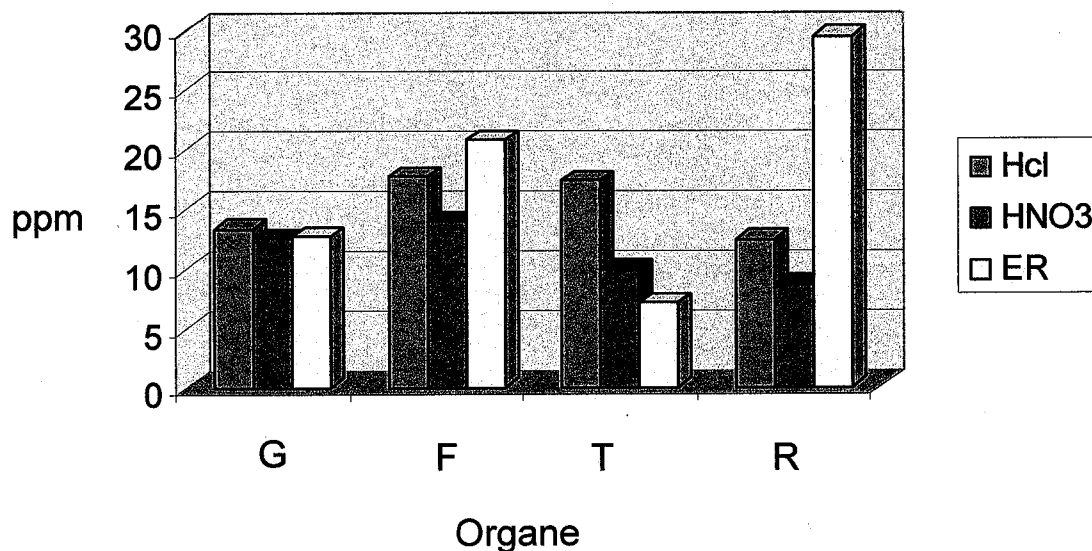


Figure 30: Concentration de Ni (extraction par HCl, HNO₃ et eau régale ER).

Après traitement et extraction des différents organes de la plante étudiée respectivement avec HCl, HNO₃, et l'eau régale, les teneurs en métaux lourds obtenues montrent que la nature de l'acide employé et le type d'organe soumis à notre investigation jouent un rôle important dans la facilité d'extraction d'un métal donné. En effet, les métaux Co, Cd et Cu sont mieux extraits par l'acide chlorhydrique concentré dans respectivement les feuilles, les tiges et les feuilles. De plus le fer et le plomb sont extraits par tous les acides. Les feuilles et les racines sont très riches en fer et en plomb. D'autre part, HCl extrait mieux le zinc à partir des feuilles, des fruits, des tiges et les racines.

Ces résultats ne permettent pas d'évaluer la teneur totale d'un élément. Ceci est du au fait que les extractants utilisés ne sont pas probablement capables d'extraire de l'organe étudié la totalité du métal ce qui rend difficile l'estimation de la phytodisponibilité des métaux lourds dans notre plante. Pour pouvoir obtenir une teneur véritablement totale, il est impératif de dissoudre toutes les formes assimilables de l'élément.

Toutefois, d'après ces résultats, on peut remarquer que la concentration des métaux lourds varie d'un organe à un autre de la plante. Les métaux lourds Co, Cu, Fe et Pb se répartissent dans toute la plante mais se concentrent plus dans les feuilles et les racines. De plus, le Cd se retrouve dans toute la plante alors que le Zn se concentre plus principalement dans les feuilles et les fruits. En effet, les teneurs en Co, Pb et Fe dépassent très largement le

seuil de phytotoxicité. En même temps, les teneurs en Cu dépassent très largement la valeur minimale de la phytotoxicité.

Conclusion

Les adaptations morphologiques et les régulations physiologiques des plantes sont indispensables pour tolérer les modifications en milieu extérieur. Ces adaptations tendent à amplifier l'absorption racinaire des ces plantes en sol, et permettent ainsi de tolérer et d'accumuler des métaux jusqu'à des taux éventuellement toxiques

Généralement la concentration du métal dans les plantes n'est pas proportionnelle à la concentration du métal dans le sol. Elle lui est même supérieure. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs hypothèses sont considérées parmi les quelles la tolérance en métaux, la résistance à la sécheresse, la compétition avec les plantes voisines et le mécanisme de défense contre les herbivores et les pathogènes.

Vu les concentrations supposées faibles dans un sol, aussi bien sous forme totale que sous forme disponible, et les teneurs des métaux obtenues très élevées, il est clair que *Globularia alypum* et *Ruta chalepensis L* sont deux plantes accumulatrices des métaux lourds, surtout Fe, Cu, Ni, Co et Pb pour *Globularia alypum* et Fe, Co, Pb et Cu pour *Ruta chalepensis*.

Conclusion Générale

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail complètent et confortent une démarche scientifique de plus en plus fréquente : l'établissement de relations entre l'utilisation empirique de plantes par les populations, et la connaissance scientifique, et plus particulièrement chimique, de ces plantes.

Ce travail se place également dans une problématique de recherche pluridisciplinaire, associant des techniques caractéristiques de la chimie organique, de la chimie analytique mais aussi de la biologie. Nous avons pu aborder ces dernières de manière générale, en privilégiant toutefois la composante chimique qui constitue l'ossature de l'étude.

En réponse aux objectifs fixés, nous nous prononcerons en termes de résultats obtenus, de limites et de prospectives.

Comme nous l'avons cité au premier chapitre de cette thèse, ces deux espèces sont très utilisées en médecine traditionnelle. L'analyse de leur contenu chimique nous a permis de caractériser la présence des différentes familles de composés (huiles volatiles, stérols, acides gras, stéroïdes, alcaloïdes, flavonoides, coumarines, anthocyanosides, anthracénosides, émодols, tanins, composés réducteurs et saponosides) en quantité variable dans les différentes parties de nos plantes.

Par ailleurs, nous avons isolé et identifié deux composés majoritaires des différentes parties (fruit, feuilles, tiges et racines) de *Globularia alypum* : un irridoïde glucosidique « la Globularine » et un sucre polyol : « D-mannitol ». Ce dernier est isolé et identifié pour la première fois de cette plante. Cette analyse a également permis de mettre en évidence la présence de l'acide crotonique dans les feuilles de *Globularia alypum*. Ce composé a été aussi isolé et identifié pour la première fois de cette plante.

Nous avons aussi procédé à l'extraction par hydrodistillation, des huiles essentielles de différents organes de la partie aérienne de *Ruta chalepensis* et, à l'étude de plusieurs facteurs influençant le rendement, les indices physicochimiques et la composition chimique de l'huile essentielle. Les facteurs considérés sont : l'état de la matière végétale, la partie de la plante

étudiée, la durée de conservation de la matière végétale, la période, le lieu et l'année de récolte. L'analyse des huiles essentielles de la plante a été réalisée par application de plusieurs techniques chromatographiques GC et GC-SM. Elle a permis l'identification de 20 composés représentant 64.66%-97.62% de l'huile essentielle.

Ruta chalepensis s'est révélée d'une grande richesse chimique. Il s'agit d'une plante aromatique riche en huile essentielle dont le composé majoritaire est une cétone : le « 2-undécanone ». Un temps d'extraction de 2h 15min, un maximum de séchage de deux semaines et la période de pleine floraison sont propices pour une extraction quantitative.

La conservation de la matière végétale pour une longue période, a montré une importante diminution de la teneur en huile essentielle.

Nous avons aussi pu observé une extrême variabilité de la teneur, les indices physicochimiques et la composition chimique de ces huiles essentielles en fonction de l'année, la période et le site de récolte. Cette observation pose le problème de variabilité écologique, géographique et les conditions climatiques. Quelque soit la période ou le site de récolte, l'huile essentielle de notre plante est à majorité le 2-undécanone, donc notre plante peut être classée comme chemotype à 2-undécanone. Pour certains cas l'huile essentielle possède d'autres composés majoritaires. Alors dans ce cas là, nous pouvons définir des chemotypes intermédiaires tel que : le chemotype intermédiaire à 2-undécanone (43.71%) – 2-nonanone (22.89%) – 1-décanol (10.96%).....

Les résultats qui nous semblent les plus significatifs, on retiendra l'existence d'une bonne corrélation entre l'usage traditionnel de *Ruta chalepensis* et l'activité antimicrobienne et entre le caractère xérophytisme et l'accumulation ou l'hyperaccumulation des métaux lourds.

Par ailleurs, l'activité hypoglycémiant de « la globularine » a été faite sur des rats Wistar normaux ou diabétiques. Ces derniers sont rendus diabétiques par la streptozotocine. Les résultats ont montré que la globularine possède une activité hypoglycémiant peu significative. Par contre, elle possède un effet sur la diminution du taux des triglycérides et du cholestérol.

Alors l'activité hypoglycémiant de l'extrait aqueux des feuilles de *Globularia alypum*, déjà signalée est due à un autre composé qui pourrait être le D-mannitol qui est déjà connu comme étant un antidiabétique.

Quand à l'étude de l'activité antimicrobienne sur différents souches pathogènes a permis de montrer que :

- Les huiles essentielles de *Ruta chalepensis* testées possèdent une bonne activité antifongique ;
- Certains extraits des différents organes de *Ruta chalepensis* possèdent une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis quelques germes pathogènes. Cette activité est comparable ou même meilleure que celle de l'antibiotique ou l'antifongique utilisé.

Dans ce travail, un autre axe de recherche plus récent a été abordé c'est celui de la phytoremediation. Cette étude a montré que les deux plantes se sont révélées d'une grande capacité d'accumuler les métaux lourds. Nous avons trouvé des teneurs élevées, notamment le Cu, Co, Ni, Pb et Fe pour *Globularia alypum* et Co, Pb, Cu et Fe pour *Ruta chalepensis*. Ces teneurs s'échelonnent dans le seuil de concentrations toxiques des plantes fourragères. Cette observation pose le problème de contamination dans la chaîne alimentaire.

En termes de limites, nous retiendrons principalement les points suivants :

- L'identification chimique de certaines molécules qui n'a pu être menée à terme du fait de la faible quantité des produits des fractions;
- Les composés dans les fractions récupérées après chromatographie sur colonne, sur gel de silice ont des comportements chimiques voisins et sont difficiles à séparer

Ces limites étant souligner, il convient de placer ce travail dans un contexte plus prospectif, car sur nombreux points, il ouvre la voie à des pistes nouvelles.

Il s'agit premièrement de compléter le travail par l'identification des molécules responsables de l'activité hypoglycémiant pour *Globularia alypum* et de l'activité

Conclusion Générale

antimicrobienne pour *Ruta chalepensis* et deuxièmement l'aspect de la valorisation de la matière végétale. De plus il révèle l'autre aspect de la recherche sur les plantes tolérantes et accumulatrices de métaux lourds. C'est en fait leur utilisation pour dépolluer les sols et les eaux contaminés par les métaux lourds.

Concernant *Ruta chalepensis*, les résultats trouvés peuvent être exploités pour l'utilisation par l'industrie des plantes aromatiques. On peut en effet, diriger la production et l'exploitation des huiles essentielles de *Ruta chalepensis* en fonctions des besoins des utilisateurs en produits bien déterminés et qui sont censés exister en grandes proportions.

En définitif, ce travail s'il fixe des résultats certains, ouvre des perspectives et des pistes de recherches, tant au niveau de la connaissance scientifique, qu'à celui d'une possibilité de valorisation de la matière végétale de notre région.

Littérature Citée

- [1] **H. Gaussen, J. F. Leroy et P. Ozenda.**
Précis de botanique. 2^{ème} Edition Masson. Paris. 1982 ; 412.
- [2] **L. Watson and M. J. Dallwitz.**
The families of flowering plants. Onwards. 1992.
- [3] **H. Vernon Heywood.**
Les plantes à fleurs : 306 familles de la flore mondiale. Edition Nathan. Paris 1996.
- [4] **R. Roques.**
Précis de botanique pharmaceutique – phanérogamie. Tome II. Librairie Maloine.
- [5] **P. Quezel et S. Santa.**
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Edition du centre national de la recherche scientifique. Paris. 1963.
- [6] **G. Garnier, L. Bezanger – Beauquesne et G. Debraux.**
Ressources médicinales de la flore française. Tome I. Edition Vigot frères. Paris VI. 1961.
- [7] **F. Baba Aissa.**
Encyclopédie des plantes utiles. Edition Librairie moderne. Rouiba. 1999.
- [8] **NT. WS. Beniston.**
Fleurs d'Algérie. Edition Entreprise nationale du livre. Alger. 1984.
- [9] **A. Ziyat, A. Legssyer, H. Mekhfi, M. Serhouchni and W. Benjelloun.**
Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*. 1997; **58**; 45-54.
- [10] **H. Benmehdi.**
Valorisation de certaines plantes médicinales a activité hypoglycémiantes comme la Coloquinte, Mémoire de Magister en Chimie Organique Appliquée, dirigé par B. Tabti. Université de Tlemcen. 2000.
- [11] **J. F. Macbride.**
Rutaceae, en: Flora of Peru. *Field Mus. Nat. Hist. Bot. Ser.* 1949; **13** (3, 2); 655-689.
- [12] **G. Garnier, L. Bezanger – Beauquesne et G. Debraux.**
Ressources médicinales de la flore française. Tome II. Edition Vigot frères. Paris VI. 1961.
- [13] **P. Monterde.**
Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. Tome II. Edition Bayreuth. 1986.

- [14] **H. Mossner and F. Czygan.**
Tissue cultures in medicinal plant breeding and cultivation. *Acta. Horticulturae*. 1978; **73**; 45-47.
- [15] **T. Johnson.**
Ethnobotany desk reference. CRC Press Boca Raton. London, New York, Washington, D.C., USA. 1999; 730.
- [16] **L. Bremness.**
Plantes aromatiques et médicinales : 700 espèces. Larousse Edition Française. Paris. 2004.
- [17] **J. G. Fouché, A. Marquet et A. Hambuckers.**
Les plantes médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du monde des plantes. Sart-Tilman. 2000 ; 77.
- [18] **P. Shawenberg et F. Paris.**
Guide des plantes médicinales. Edition Delachaux. Paris. 1977.
- [19] **J. Vazquez Sanchez.**
Contribucion al estudio quimico de la *Globularia alypum*. *Anales de la Sociedad Espanola de Fisica y Quimica*. 1933 ; Vol. **XXXI** ; 361-363.
- [20] **G. Jacini.**
Acidi et alcooli superiori in *Globularia alypum*. *Helvetica. Chim. Acta*. 1936; **19** (1095) ; 247-251.
- [21] **G. Di Maio and L. Panizzi.**
Structura della globularina. *La Ricerca Scientifica Anno*. 1966 ; **36** (9) ; 845-850
- [22] **P. Bernard, M. Lallemand et G Balansard.**
A propos des hétérosides chromogéniques, type iridoïde dans les feuilles de *Globularia alypum* L. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*. Tome VIII. 1974 ; **3** ; 180-187.
- [23] **R. K. Chaudhuri and O. Sicher.**
Structure of globularidine: an unusual iridoïd glucoside from *Globularia alypum* L. *Helvetica a Chimica Acta*. 1979; Vol. 62; **2** (67); 644-646.
- [24] **R. K. Chaudhuri and O. Sicher.**
Structure of two highly oxygenated iridoïd glucosides from *Globularia alypum* L. *Tetrahedron Letters*. 1979; **34**; 3149-3152.

- [25] **R. K. Chaudhuri and O. Sicher.**
New iridoïd glucosides and a lignan diglucoside from *Globularia alypum* L. *Helvetica Chimica Acta*. 1981; Vol. 64; 1 (1); 3-15.
- [26] **B. Ben Hassine, A. M. Bui et Z. Mighri.**
Contribution à l'étude des plantes médicinales tunisiennes. Identification des acides Phénols de *Globularia alypum* L. par CCM bidimensionnelle et HPLC. *Journal de la Société Chimique de Tunisie*. 1982 ; 7 ; 3-10.
- [27] **B. Ben Hassine, A. M. Bui, Z. Mighri et A. Cavé.**
Flavonoïdes et anthocyanes de *Globularia alypum* L. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*. Tome XVI. 1982 ; 3 ; 197-205.
- [28] **S. Louis, F. D. Kasraoui, B. Babhdikian, R. Elias, K. Boukef and G. Balansard.**
High performance liquid chromatographic determination of globularin in *Globularia alypum* L. *Pharmazie*. 1999; 54 (4); 309-310.
- [29] **N. E. Es Safi, S. Khlifi, L. Kerhoas, A. Kollmann, A. El Abbouyi and P. H. Ducrot.** Antioxidant constituents of the aerial parts of *Globularia alypum* L. growing in Morocco. *J. Nat. Prod.* 2005; 68; 1293-1296.
- [30] **N. E. Es Safi, S. Khlifi, L. Kerhoas, A. Kollmann, A. El Abbouyi and P. H. Ducrot.** Iridoïd glucosides from the aerial parts of *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 2006 ; 54 (1) ; 85-88.
- [31] **N. E. Es Safi, A. Kollmann, S. Khlifi and P. H. Ducrot.**
Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. Structure – activity relationship. *LWT-Food Science and Technology*. 2007; 40 (7); 1246-1252.
- [32] **G. Caldes, B. Prescott and J. R. King.**
A potential antileukemic substance present in *Globularia alypum*. *Planta Medica*. 1975; 27; 72-76.
- [33] **B. Fehri, I. R. Tebbett, B. Freiburger and J. Karli.**
The immunosuppressive Effect of *Globularia alypum* extracts. *Phytotherapy Research*. 1996; 10; 539-540.
- [34] **F. Skim, H. B. Lazrek, A. Kaaya, H. El Amri and M. Jana.**
Pharmacological studies of two antidiabetic plants: *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum*. *Thérapie*. 1999; 54; 711-715.

- [35] **H. Jouad, M. Maghrani and M. Eddouks.**
Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and Streptotocin induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; **81**; 351-356.
- [36] **S. Chevolleau, J.F. Mallet, E. Ucciani, J. Gamisans and M. Gruber.**
Antioxidant activity in leaves of some mediterranean plants. *JAOCS*, 1992; **69** (12); 1269-1271.
- [37] **S. Chevolleau, J.F. Mallet, A. Debal and E. Ucciani.**
Antioxidant activity of mediterranean plants leaves: Occurrence and Antioxidative importance of α -tocophérol. *JAOCS*, 1993; **70** (8); 807-809.
- [38] **S. Khlifi, Y. El Hachimi, A. Khalil, N. Es Safi and A. El Abbouyi.**
In vitro antioxidant effect of *Globularia alypum* L. hydromethnolic extract. *Indian Journal of Pharmacology*. 2005; **37** (4); 227-231.
- [39] **J. T. Jaouhari, H. B. Lazrek et M. Jana.**
Etude de la toxicité aigue de dix plantes marocaines réputées hypoglycémiantes. *Thérapie*. 1999 ; **54** ; 701-706.
- [40] **A. Elbetieha, S. A. Oran, A. Alkofahi, H. Darmani and A. M. Raies.**
Fetotoxic potential of *Globularia Arabica* and *Globularia alypum* (Globulariaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; **72**; 215-219.
- [41] **T. J. Cabo and V. M. Panadero.**
The rutin content of a wild Spanish rue (*Ruta chalepensis*). *Farmacognosia*. 1951; **11**; 305-307.
- [42] **M. B. Robert, N. E. John and A. S. Nicolas.**
Chalepensin, chalepin and Chalepin acetate, three novel furocoumarins from *Ruta chalepensis*. *Dow. Chem. Co., Zionville, IN, USA. Lloydia*. 1967; **30** (1); 73-77.
- [43] **T. Mekin, B. Turhan and E. Fak.**
Rutin in *Ruta chalepensis*. *Journal of Faculty of Pharmacy of Istanbul University*. 1967; **3** (3); 204-209.
- [44] **T. N. Vasudevan.**
Alkaloids from *Ruta angustifolia*, *Ruta chalepensis*, *Ruta graveolens* and *Ruta Montana*. *Pharmazie*. 1968; **23** (9); 520-521.
- [45] **A. G. Gonzalez, E. D. Chico, H. L. Dorta, J. R. Luis and F. R. Luis.**
New sources of natural coumarins. Chemical components of *Ruta Chalepensis* and *Dictamnus hispanicus* Webb. *Anales deQuimica*. 1977; **73** (3); 1968-1979.

- [46] **B. A. H. El Tawil, A. O. Baghlaf and S. O. Barbood.**
Constituents of local plants. Part 10: Isoimperatorin, a further constituent of *Ruta chalepensis* L. *Pharmazie*. 1980; **35** (8); 503.
- [47] **S. T. Ezmirly and S. R. Wilson.**
Saudi Arabian medicinal plant. I. *Ruta chalepensis*. *Journal of the Chemical of Pakistan*. 1980; **2** (2); 55-56.
- [48] **B. A. H. El Tawil, F. K. A. El Beih, H. Budzikiewicz and N. Mohr.**
Constituents of local plants. Taifine, a new alkaloid from *Ruta chalepensis* L. *Organische Chemie*. 1981; **36** (9); 1169-1170.
- [49] **N. Mohr, H. Budzikiewicz, B. A. H. El Tawil and F. K. A. El Beih.**
Constituents of local plants. Furoquinoline alkaloids from *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*. 1982; **21** (7); 1838-1839.
- [50] **S. Bilge and M. Alev.**
HPLC separation and structural elucidation of furocoumarins from *Ruta* species. *Gazi Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*. 1985; **2** (2); 109-114.
- [51] **A. Ulubelen, B. Terem, E. Tuzlaci, K. F. Cheng and Y. Kong.**
Alkaloids and coumarins from *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*. 1986; **25** (11), 2692-2693.
- [52] **A. Ulubelen and T. Bulent.**
Alkaloids and coumarins from roots of *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*. 1988; **27** (2); 650-651.
- [53] **A. Ulubelen and N. Tan.**
A moskachan from roots of *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry*. 1990; **29** (12); 3991-3992.
- [54] **K. El Sayed, M. S. Al Said, F. S. El Feraly and S. A. Ross.**
New quinoline alkaloids from *Ruta chalepensis*. *J. Nat. Prod.* 2000; **63**, 995-997.
- [55] **S. Milesi, B. Massot, E. Gontier, F. Bourgaud and A. Guckert.**
Ruta graveolens a promissing species from the production of furanocoumarins. *Plant. Sciences*. 2001; **161**; 189-199.
- [56] **T. S; Wu, L. Shianshi, J. J Wang, S. Chou Iou, S. C. Iou, H. C. Chang, Y. P. Chen, Y. H. Kuo, Y. L. Chang and C. M. Teng.**
Cytotoxic and antiplatelet aggregation principals of *Ruta graveolens*. *Journal of Chinese Chemical Society*. 2003; **50**; 171-178.

- [57] **J. Bruneton.**
Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 1987.
- [58] **M. Wichil et R. Anton.**
Plantes thérapeutiques : Tradition, pratique officinale, Science et thérapeutique. 3^{ème} Edition, Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 1999.
- [59] **R. R. Paris et H. Moyse.**
Précis de matière médicale. Tome I. Masson et Cie Editeur. Paris. 1967.
- [60] **S. Arctander.**
Perfume and flavor chemicals. Vol. II. Aroma Chemical. USA. 1969.
- [61] **D. Economou and A. Nahrstedt.**
Planta Med. 1991; 57; 347.
- [62] **C. N. Demetzos, J. B. Chinon, G. E. Charvala and V. I. Homatidou.**
Fitoterapia. LXI. 1990; 5; 439-442.
- [63] **M. Hmamouchi, A. Tantaoui-Elaraki, N. Es-Safi et A. Agoumi.**
Plantes médicinales et phytothérapie. XXIV. 1990 ; 4; 278-289.
- [64] **R. P. Adams and T. A. Zaroni.**
J. Ess. Oil Res. 1990; 2; 163-165.
- [65] **P. Claris.**
Les médecines douces. WWW.Aci-multimedia.net/feminin : Médecine douce. 2001.
- [66] **F. Padrini et M. T. Lucheroni.**
La nature des huiles essentielles. Edition Dexecchi. 1997.
- [67] **H. Viaud.**
Les huiles essentielles et leur distillation. Thérapeutiques naturelles. Edition Gnoma. 1993.
- [68] **J. Garnero.**
Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Edition Technique. Encycl. Med. Nat. (Paris - France). Phytothérapie, aromathérapie, C. 1991; 9-200.
- [69] **M. Paris et M. Hurabienne.**
Abrégé de matière médicale (Pharmacognosie). Tome I. Généralités – morphologies. Edition Masson. Paris ISBN. 1981; 182-216.

- [70] **Y. R. Naves, H. Igoleng et L. Benezet.**
Les menthes basiliques renferment du menthofurane. *Parfumerie moderne*. 1954; **38**; 15-16.
- [71] **J. Bruneton.**
Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Edition Technique et Documentation Lavoisier. Paris. 1999; 783.
- [72] **R. P. A. Inigo, M. E. L. Be Viana, C. A. N. Catalan and D. I. A. De Iglesias.**
Essential oil of *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae). *Essenze Deriv. Agrum.* 1981; **51**; 349-351.
- [73] **A. O. Baghlaf, S. K. A. El – Beih and B. A. H. El – Tawil, .**
Constituents of local plants. Part 15. Study of volatile oil of Saudi *Ruta chalepensis* L., *Juniperus procera* Hochst. ex Endie. and *Euphorbia heliopsis* L. *Herba Hung.* 1983; **22**; 39-42.
- [74] **A. H. C. Baser, T. Özek and S. H. Beis.**
Constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Turkey. *J. Essent. Oil Res.* 1996; **8**; 413-414.
- [75] **A. Verzera, L. Mondello, S. Ragusa and G. Dugo.**
Essential oils from leaves of typical Mediterranean plants. Note II. *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae). *Essenze Derivati agrumari.* 2000; **70**; 207-210.
- [76] **O. Tzakou, and M. Couladis.**
Essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Greece. *J. Essent. Oil Res.* 2001; **13**; 258-259.
- [77] **A. Rustaiyan, M. Khossravi, F. Sultani – Lotfabadi, M. Yari, S. Masoudi and A. Monfared.** Constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 2002; **14**; 378-379.
- [78] **G. D. Bagchi, P. D. Dwivedi, S. Mandal, A. A. Naqvi and S. Kumar.**
Essential oil constituents of *Ruta chalepensis* plants grown in India. *Indian Perfumer.* 2003; **47** (1); 39-41.
- [79] **G. D. Bagchi, P. D. Dwivedi, A. Singh, F. Haider and A. A. Naqvi.**
Variations in essential oil constituents at different growth stages of *Ruta chalepensis* on cultivation at north Indian plains. *J. Essent. Oil Res.* 2003; **15**; 263-264.

- [80] M. S. Al-Said, M. Tariq, M. A. Al-Yahya, S. Rafatullah, O. T. Ginnawiaud and A. M. Ageel. Studies on *Ruta chalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 1990; **28** (3); 305-312.
- [81] A.m; Ageel, J. S. Mossa, M. A. Al-Yahya, M. S. Al-Said and M. Tariq. Experimental studies on antirheumatic crude drugs used in Saudi traditional medicine. *Drugs Under Experimental and Clinical research*. 1989; **15** (8); 369-372.
- [82] L. Lank, K. Mangano, A. Rapisarda, S. Ragusa, L. Maiolino, R. Musumeci and A. Speciole. Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta chalepensis* L., a plant with anti-inflammatory properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004; **90**; 267-272.
- [83] M. Hmamouchi, M. Lahlou and A. Agoumi. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. *Fitoterapia*. 2000; **71**; 308-314.
- [84] N. S. Alzoreky and K. Nakahara. Antibacterial activity of extract from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; **80**; 223-230.
- [85] A. G. Al-Bakri and F. U. Afifi. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extract by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods*. 2007; **68** (1); 19-25.
- [86] A. D. Alanis, F. Calzada, J. A. Cervantes and G. M. Ceballos. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; **100** (1-2); 153-157.
- [87] B. Chebli, M. Achouri, I. H. Mina and M. Hmamouchi. Antifungal activity of essential oils from several medicinal plants against four postharvest citrus pathogens. *Phytopathol. Mediterr.* 2003; **42**; 251-256.
- [88] R. Z. Desa, A. Rey, E. Arganaraz and E. Bindstein. Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; **69**; 93-98.
- [89] Diabète : Glucose dans le sang – Hyperglycémie. Santé et Corps Humain. Soft Collection Micro Application. Encarta Encyclopedia Microsoft 2003.

- [90] **A. Paola, C. Jean-Pierre et R. Christiane.**
Le diabète insulino-dépendant de l'enfant. Enseignement théorique pour l'aide à l'éducation des enfants diabétiques. Service de Pédiatrie – Centre Hospitalier Général de Hyères. **2001**; 1-21.
- [91] Plantes médicinales et diabète. WWW.Phytomania.com. Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huile essentielle. **2007**; 1-9.
- [92] **R. J. Marles and N. R. Farnsworth.**
Plants as sources of antidiabetic agents. Program for collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences. College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, USA. **1988**; 150-187.
- [93] **P. Courvalin, H. Drugeon, J.P. Flandrois et F. Goldstein.**
Bactéricide. Aspects théoriques et thérapeutiques. Maloine Paris. **1990**; 110.
- [94] **W. C. Bowman.**
Pharmacology and therapeutics. Pergamon press. Elmsford. Vol. 2; **1981**.
- [95] **S. G. Deans.**
Evaluation of Antimicrobial Activity of Essential (volatile) Oils. In : Linsken HF, Jackson JF, editors. Modern Methods of Plant Analysis. Essential Oils and Waxes. Heidelberg. Heidelberg: Spring-Verlag. **1991**; **12**; 209-221.
- [96] **I. S. Chen, H. F. Chen, Y. L. Cheng, C. M. Teng, and I. Tsutomu.**
Quinoline alkaloids and other constituents of *Melicope semecarpifolia* with antiplatelet aggregation activity. *J. Nat. Prod.* **2001**; **64**; 1143-1147.
- [97] **C.S. Vairappan, M. Suzuki, T. Abe and M. Masuda.**
Halogenated metabolites with antibacterial activity from the *Okinawan Laurencia* species. *Phytochem.* **2001**; **58**; 517-523.
- [98] **J. Clavin Kouokam, T. Jahns, H. Becker.**
Antimicrobial activity of essential oil and some isolated sulfur-rich compounds from scorodophloeus. *Planta Med.* **2002**; **68**; 1082-1087.
- [99] **R. Wild.**
The complete book of natural and medicinal cures. Rodale Press, Inc., Emmaus, Pa. **1994**; 13-97
- [100] **A. Brantner, Z. Males, S. Pepeljnjak and A. Antolic.**
Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill. *J. Ethnopharmacol.* **1996**; **52**; 119-122.

- [101] **W. A. Thomson.**
Medicines from the Earth. McGraw-Hill Book Co., Maidenhead, United Kingdom.
1978; 11-19.
- [102] **M. Derrueu .**
Précis de géomorphologie. 1967 ; 186-188.
- [103] **M.T.L.P. Peres, F. D.Monache, A.B. Cruz, M.G. Pizzolatti and R.D.Yunes.**
Chemical composition and antimicrobial activity of *Crotonurucurana* Baillon
(Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 1997 ; **56**; 223-226.
- [104] **T. A. Geissman.**
Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In M. Florkin and
E. H. Stotz (ed.), Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant
constituents. Elsevier, New York, N.Y. 1963; **9**; 265-268.
- [105] **N. V. R. R. Urs and J. M. Dunleavy.**
Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic
compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans). *Phytopathology.* 1975;
65; 686-690.
- [106] **M. A. Fernandez, M. D. Garcia and M. T. Saenz.**
Antibacterial activity of the phenolic acids fraction of *Scrophularia frutescens* and
Scrophularia sambucifolia. *J. Ethnopharmacol.* 1996; **53**; 11-14.
- [107] **J. L. Stern, A. E. Hagerman, P. D. Steinberg and P.K. Mason.**
Phlorotannin-protein interactions. *J. Chem. Ecol.* 1996; **22**; 1887-1899.
- [108] **M. H. Kazmi, A. Malik, S. Hameed, N. Akhtar and S. Noor Ali.**
An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry.* 1994; **36**; 761-763.
- [109] **S. R. King and S. M. Tempesta.**
From shaman to human clinical trials: the role of industry in ethnobotany,
conservation and community reciprocity. *Ciba Found. Symp.* 1994; **185**; 197-206.
- [110] **R. A. Dixon, P. M. Dey and C. J. Lamb.**
Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Adv. Enzymol.* 1983; **55**; 1-69.
- [111] **H. Tsuchiya, M. Sato, T. Miyazaki, S. Fujiwara, S. Tanigaki, M. Ohyama, T.
Tanaka and M. Iinuma.** Comparative study on the antibacterial activity of
phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
J. Ethnopharmacol. 1996; **50**; 27-34.

- [112] **M. Toda, S. Okubo, R. Ohnishi and T. Shimamura.**
Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea. *Jpn. J. Bacteriol.* **1989**; 5; 561–566.
- [113] **R. P. Borris.**
Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.* **1996**; 51; 29–38.
- [114] **O. Batista, A. Duarte, J. Nascimento and M. F. Simones.**
Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *J. Nat. Prod.* **1994**; 57; 858–861.
- [115] **H. Tsuchiya, M. Sato, M. Inuma, J. Yokoyama, M. Ohyama, M. Tanaka, I. Takase and I. Namikawa.** Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. *Experientia.* **1994**; 50; 846–849.
- [116] **K. Vijaya, R. Ananthan and R. Nalini.**
Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella*. sppa cell culture study. *J. Ethnopharmacol.* **1995**; 49; 115–118.
- [117] **J. C. Schultz.**
Tannin-insect interactions. In R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press, New York, N.Y. **1988**; 554–559.
- [118] **L. G. Butler.**
Effects of condensed tannin on animal nutrition. In R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press, New York, N.Y. **1988**; 553–561.
- [119] **A. Scalbert.**
Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry.* **1991**; 30; 3875–3883.
- [120] **G. A. Jones, T. A. McAllister, A. D. Muir and K. J. Cheng.**
Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**; 60; 1374–1378.
- [121] **R. S. Taylor, F. Edel, N. P. Manandhar and G.H.N. Towers.**
Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **1996**; 50; 97–102.
- [122] **T. N. Kaul, E. Jr. Middletown and P. L. Ogra.**
Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* **1985**; 15; 71–79.

- [123] **G.L. Nonaka, I. Nishioka, M. Nishizawa, T. Yamagishi, Y. Kashiwada, G. E. Dutschman, A. J. Bodner, R. E. Kilkuskie, Y. C. Cheng and K.H. Lee.**
Anti-AIDS agents. 2. Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J.Nat.Prod.* **1990**; 53; 587–595.
- [124] **J. R. S. Hoult and M. Paya.**
Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.* **1996**; 27 ; 713–722.
- [125] **O. Thastrup, J. B. Knudsen, J. Lemmich and K. Winther.**
Inhibitions of human platelet aggregation by dihydropyrano- and dihydrofuranocoumarins, a new class of CAMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem.Pharmacol.* **1985**; 34; 2137–2140.
- [126] **N. B. Piller.**
A comparison of the effectiveness of some anti-inflammatory drugs on thermal oedema. *Br. J. Exp. Pathol.* **1975**; 56; 554–559.
- [127] **G. J. Keating and R. O’Kennedy.**
The chemistry and occurrence of coumarins. *In* R. O’Kennedy and R. D. Thornes (ed.), *Coumarins: biology, applications and mode of action.* John Wiley . Sons, Inc., NewYork, N.Y. **1997**; 348-351.
- [128] **B. Berkada.**
Preliminary report on warfarin for the treatment of herpes simplex. *J. Irish Coll. Phys.Surg.* **1978**; 22; 56-59.
- [129] **R.D. Thornes.**
Clinical and biological observations associated with coumarins. *In* R. O’Kennedy and R. D. Thornes (ed.), *Coumarins: biology, applications and mode of action.* John Wiley Sons, Inc., NewYork, N.Y. **1997**; 256-259.
- [130] **J. T. Barre, B. F. Bowden, J. C. Coll, J. Jesus, V. E. Fuente, G. C. Janairo and C. Y. Ragasa.** A bioactive triterpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry.* **1997**; 45; 321–324.
- [131] **L. Mendoza, M. Wilkens and J. Urzua.**
Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **1997**; 58; 85–88.

- [132] **C. C. Tassou, E. H. Drosinos and G. J. E. Nychas.**
Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4° and 10°C. *J. Appl. Bacteriol.* **1995**; 78; 593–600.
- [133] **B. K. Rana, U. Singh and P. V. Taneja.**
Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *J. Ethnopharmacol.* **1997**; 57; 29–34.
- [134] **B. Suresh, S. Sriram, S A. Dhanaraj, K. Elango and K. Chinnaswamy.**
Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *J. Ethnopharmacol.* **1997**; 55; 151–159.
- [135] **T. Pengsuparp, L. Cai, H. H. S. Fong, A. D. Kinghorn, J. M. Pezzuto, J. C. Wani, and M. E. Wall.** Pentacyclic triterpenes derived from *Maprounea africana* are potent inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *J. Nat. Prod.* **1994**; 57; 415–418.
- [136] **H. D. Sun, S. X. Qiu, L. Z. Lin, Z. Y. Wang, W. Y. Lin, T. Pengsuparp, J. M. Pezzuto, H. H. Fong, G. A. Cordell and N. R. Farnsworth.** Nigranoic acid, a triterpenoid from *Schisandra sphaerandra* that inhibits HIV-1 reverse transcriptase. *J. Nat. Prod.* **1996**; 59; 525–527.
- [137] **H. X. Xu, F. Q. Zeng, M. Wan and K. Y. Sim.**
Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *J. Nat. Prod.* **1996**; 59; 643–645.
- [138] **S. Ghoshal, B. N. Krishna Prasad and V. Lakshmi.**
Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. *J. Ethnopharmacol.* **1996**; 50; 167–170.
- [139] **R. A. Vishwakarma.**
Stereoselective synthesis of a-artether from artemisinin. *J. Nat. Prod.* **1990**; 53; 216–217.
- [140] **S. C. Chaurasia and K. K. Vyas.**
In vitro effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. *J. Res. Indian Med. Yoga Homeopath.* **1977**; 24–26.
- [141] **R. H. Cichewicz and J. A. Thorpe.**
The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *J. Ethnopharmacol.* **1996**; 52; 61–70

- [142] **C. D. Hufford, Y. Jia, E. M. Croom, I. Jr., Muhammed, A. L. Okunade, A. M. Clark, and R. D. Rogers.** Antimicrobial compounds from *Petalostemum purpureum*. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56; 1878–1889.
- [143] **R. J. Fessenden and J. S. Fessenden.**
Organic chemistry, 2nd ed. Willard Grant Press, Boston, Mass. 1982.
- [144] **S. B. Jones and A. E. Jr., Luchsinger.**
Plant systematics. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y. **1986**.
- [145] **Atta-ur-Rahman., and M. I. Choudhary.**
Diterpenoid and steroidal alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **1995**; 12; 361–379.
- [146] **E. Omulokoli, B. Khan and S. C. Chhabra.**
Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **1997**; 56; 133–137.
- [147] **J. B. McMahon, J. M. Currens, R. J. Gulakowski, R. W. J. Buckheit, C. Lackman-Smith, Y. F. Hallock and M. R. Boyd.** Michellamine B, a novel plant alkaloid, inhibits human immunodeficiency virus-induced cellkilling by at least two distinct mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**; 39; 484–488.
- [148] **M. L. Sethi.**
Inhibition of reverse transcriptase activity by benzophenanthridine alkaloids. *J. Nat. Prod.* **1979**; 42; 187–196.
- [149] **J.T. McDevitt, D. M. Schneider, S. M. Katiyar and T. D. Edlind.**
Berberine: a candidate for the treatment of diarrhea in AIDS patients, abstr. 175. In Program and Abstracts of the 36th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D.C. **1996**.
- [150] Agence Nationale pour le Développement de l'Évaluation Médicale (ANDEM). Le bon usage des antibiotiques à l'hôpital. Août 1996. pour 1000 patients par jours.
- [151] Association des Pays de la Loire pour l'éviction des infections nosocomiales. Étude Épidémiologique multicentrique sur les infections à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline dans les hôpitaux de la région des Pays de la Loire. *BEH.* **1995**; 23; 105–106.
- [152] **J. M. Boyce.**
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities : microbiology, epidemiology, and preventive measures. *Infect Control Hosp. Epidemiol.* **1992** ; 13 ; 725-737.

- [153] **A. Le Coustumier, P. Gueudet, E. Lecaillon, S. Bland, B. Hanesse et le Collège de Bactériologie.** Virologie et Hygiène des Hôpitaux de France. Incidence de *Staphylococcus aureus* méthicilline résistant dans 95 hôpitaux non universitaires en France. *Med Mal Infect.* **1996**; **26**; 634-643.
- [154] **J. H. T. Wagenvoort et M. Kopers-Rietrae.**
Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (MRSA) dans la population générale. *Eurosurveillance.* **1997** ; **2** ; 96.
- [155] Working party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, the Hospital Infection Society and the Infection Control Nurses Association. Revised guidelines for the control of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* infection in hospitals. *J Hosp Inf.* **1998** ; **39** ; 253-290.
- [156] Onerba., 1998. Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques. Rapport d'activité du conseil scientifique pour l'année **1997**.
- [157] **L. Fierobe, J. C. Lucet, C. Mueller, D. Decré, M.L. Joly-Guillou, J. Mantz and J. M. Desmots.** Risk factors for acquisition for imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in a surgical intensive care unit. 37th Interscience Conference on Antimicrobial. Agents and Chemotherapy. **1997**; 28 sept-oct . Toronto, Canada. Abs J26.
- [158] **C. A. Hunter and P. R. Ensign.**
An epidemic of diarrhea in a newborn nursery caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Public Health.* **1947**; **37**; 1166-1169.
- [159] **A. L. Florman and N. Schifrin.**
Observations on a small outbreak of infantile diarrhea associated with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Pediatrics.* **1950**; **36**; 758-766.
- [160] **A. Henderson, J. MacLaurin and J. M. Scott.**
Pseudomonas in a Glasgow baby unit. *Lancet.* **1969**; **1**; 316-317.
- [161] **R. R. Brooks.**
Serpentine and its vegetation. Dioscorides Press, Portland, OR. **1987**.
- [162] **J. Alper.**
Effort to combat microbial resistance lags. *ASM News.* **1998**; **64**; 440-441.
- [163] **A. Soulier, F. Barbut, J. M. Ollivier, J. C. Petit and A. Lienhart.**
Decreased transmission of enterobacteriaceae with extended spectrum betalactamase in intensive care unit by nursing organization. *J Hosp Infect.* **1995**; **31**; 89-97.

- [164] **R. E. Eichhorn.**
Biologie végétale, 6ème Editions de Boeck Université Paris. 2000 ; 726 -749.
- [165] **J. Ducaroir et L. Lamy.**
Evidence of trace metal association with soil organic matter using particle size fractionation after physical dispersion treatment. *Analyst*. 1995; 741-745.
- [166] **K. E. Giller, E. Witter et S. P. Mc Grath.**
toxicity of heavy metals to micro-organisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *soil Biol. Biochem.* 1998; 1389-1414.
- [167] **C. Juste et L. Feix.**
Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduairees des stations d'épuration urbaines. Ademe. 1995 ; 209-211.
- [168] **M. P. Ireland.**
Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworms. In: J.E. Satchell (Ed), *Earthworm ecology from Darwin to vermiculture.* 1983; 247-265.
- [169] **S. Shallari.**
Disponibilité du nickel du sol pour l'hyperaccumulateur *Alyssum murale*. Institut national, polytechnique de Lorraine(INPL). 1997.
- [170] **H. Marschner.**
Mineral nutrition of higher plants. Academic press, London. 1995.
- [171] **R. L. Chaney.**
Potential effects of waste constituents on the food chain, in J.F. Parr, P.B., Marsch and J.M. Kla (eds) *Land Treatment of Hazardous wastes.* Noyes Data corp., Park Ridge, NJ. 1983; 152-240.
- [172] **J. D. Cunningham, D.R. Keeney and J.A. Ryan.**
Phytotoxicity in and metal uptake from soil treated with metal-amended sewage sludge. *J. Environ. Qual.* 1975; 4; 455-460.
- [173] **J. L. Morel, G. Bitton, C. Schwartz et M. Schiavon.**
Rapport pour l'OCDE. *Ecotoxicology : responses, biomarkers and risk assesment.* 1997.
- [174] **T. Jaffré, R. R. Brooks, J. Lee and R. D. Reeves.**
Sebertia accuminata: a hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science.* 1976; 193; 579-580.

- [175] **R.R Brooks, J. Lee, R. D. Reeves and T. Jaffré.**
Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of indicator plants. *J. Geochem Explor.* 1977; 7; 49-57.
- [176] **A. G. L. Assuncao, P. DA Costa-Martins, S. DE Folter, S. Vooijs, H.Schat, , and M. G. M. Aarts.** Elevated expression of metal transporter genes in three accession of the metal hyperaccumulator *Thalaspia caerulescens*. *Plant. Cell end environment.* 2001; 24; 27-226.
- [177] **R. S. Boy and S.N. Martens.**
The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. In The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils: Proceedings of the First International Conference on Serpentine Ecology (eds A.J.M. Baker, J., Proctor, R.D. Reeves), Intercept. Andover. 1992; 2-289.
- [178] **R. S. Boy and S. N. Martens.**
Nickel hyperaccumulated by *Thalaspia montanum* var. *montanum* is actually toxic to an insect herbivore. *Oikos.* 1994; 70; 21-25.
- [179] **Pollar., and A. J. M. Baker.**
Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thalaspia caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytologist.* 1997; 135; 655-658.
- [180] **David., and R. S. Boyd.**
Dynamic of Ni-based defence and organic defence in the Ni hyperaccumulator, *Streptanthus polygaloides* (Brassicaceae). *New Phytologist.* 2000; 146; 211-217.
- [181] **Y. S. M. Ghaderian and A. J. M. Lyon.**
Seedling mortality of metal hyperaccumulator plants resulting from damping off by *Phytophthora*. *Phytologist.* 2000; 146; 219-224.
- [182] **R. D. Reeves and A. J. M. Baker.**
In I Raskin, BD Ensley, eds, Phytoremediation of toxic Metals. John Wiley, Sons, New York. 2000; 193-229.
- [183] **R.R Brooks.**
Geobotany and hyperaccumulators. In : Brooks RR (ed) Plants that hyperaccumulate heavy metals. CAB International, Wallingford, UK. 1998; 55-94.

- [184] **A. J. M. Baker, S. P. McGrath, R. D. Reeves and J. A. C. Smith, JAC.**
Metalhyperaccumulator plants: a review of ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N., Banuelos, G., (eds) Phytoremediation of contaminated soil and water. Lewis, Boca Raton, Fla. **2000**; 85-107.
- [185] **W. Jiang., D. Liu and H. wenqiang.**
Hyperaccumulation of cadmium by roots, bulbs and shoots of garlic (*Allium sativum* L.). *Bioresource Technology*. **2001**; 76; 9-13.
- [186] **P. Karen, S. Christophe, G. Emilie and M. Louis.**
Availability of cadmium and zinc accumulated in the leaves of *Thlaspi caerulescens* incorporated into soil. *Plant and soil*. **2000**; 227 ; 257-263
- [187] **G. S. Banuelos, H. A. Ajwa, M. Mackey, L. Wu and C. Coook.**
Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium. *Journal of environmental quality*. **1997**; 26; 639-646.
- [188] **L. Dabouineau, Y. Lamy et P. Collas.**
Phytoremédiation et phytorestauration ou l'utilisation des plantes pour la dépollution et l'épuration des eaux usées. *Le Rôle d'Eau*. **2005** ; 124 ; 8-15.
- [189] **AFNOR (Association Française de Normalisation), Paris 1992.** « Recueil des normes françaises su les huiles essentielles ». 2^{ème} Edition. **1992**.
- [190] **P. Arpino, A. Prévôt, J. Serpinet, J Tranchant, A. Vergnol et P Witier.**
Mannuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Edition Masson. Paris. **1995**.
- [191] **K. D. Bartle and P. Myers.**
History of gas chromatography. *Trends Anal. Chem.* **2002**; 21 (9-10); 547-557.
- [192] **P. Judeinstein, P. Berdague, J. P. Bayle, E. Rogalska, M. Rogalski, D. Petit Jean and M. H. Guermouche.** Thermodynamic parameters, stationary phases, GC, liquid crystals. *J. of Chromatography* **1999**; 859; 59 -67.
- [193] **W. Jennigs and T. Shibamoto.**
In qualitative analysis of flavour and fragrance volatils by Glass capillary gas chromatography. *Academic Press. New York*. **1980**.
- [194] **R. Congiu, D. Falconieri, B. Marongiu, A. Piras and S. Porcedda,**
Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO₂. *Flavour Fragr. J.* **2002**; 17; 239 – 244.

- [195] **R.P.Adams.**
Identification of essential oil components by Gas chromatography Mass spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL, USA . **2001.**
- [196] **X. Xu, L.L.P. Van Stee, J. Williams, J. Beens, M. Adahchour, R.J.J. Vreuls, U.A. Th. Brinkman and J. Lelieveld.** Comprehensive two – dimensional gas chromatography (GC × GC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere. *Atoms Chem. Phys. Discuss.* **2003; 3**; 1139 - 1181.
- [197] **R. P. Limberger, C.A. Simoes-Pires, M. Sobral, C. Menu, J.M. Bessiere and A.T. Henriques.** Essential oils from some *Myrceugenia* species (*Myrtaceae*). *Flavour Fragr. J.* **2002; 17**; 341 - 344.
- [198] **S. Wu, H. Zorn, U. Krings and R. G. Berger.**
Volatiles from submerged and surface – cultured beefsteak fungus, *Fistulina hepatica*. *Flavour Fragr. J.* **2007; 22**; 53 - 60.
- [199] **E. R. Stashenko, R. Acosta, J.R. Martinez.**
High-resolution gas – chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical – fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2000; 43**; 379 – 390.
- [200] **T. S. Wu, L.S. Shi, J. J. Wang, S.C.Iou, H.C.Chang, Y.P. Chen, Y.H. Kuo, Y.L. Chang and C.M. Teng.** Cytotoxic and Antiplatelet Agregation principles of *Ruta graveolens*. *Journal of Chinese Chemical society.* **2003; 50**; 171 - 178.
- [201] **Tentaoui – Elaraki, A. A. Errifi, B. Bendjillali and N. Lallaoui.**
Antimicrobial activity of four chemically different essential oils. *Rivista Italiana EPPOS.* **1992; 6**; 20 - 24.
- [202] **L. S. Selwyn and C. G. Costain.**
Evaluation of silver – cleaning product. *Journal of the international institute for conservation - Canadian group.* **1991; 16**; 3 -16.
- [203] **A. M. Pollard and H. Hatcher.**
The chemical anlysis of the oriental ceramic body composition. Part 1 : wares from north china. *Archaeometry.* **1994; 36** (1); 41- 62.
- [204] **R. Faure, A. Babadjamian, G. Balansard, R. Elias and C. Maillard.**
Concerted use of two-dimensional NMR spectroscopy in the complete assignment of the ¹³C and ¹H NMR spectra of Globularin. *Magnetic Resonance in Chemistry.* **1987; 25**; 327- 330.

- [205] SDBS NMR, N° 2590. <http://www.aist.go.jp>. 2003.
- [206] Revue "Aromes, ingrédients, additives", 1998; 15.
- [207] SDBS NMR, N° 1067. <http://www.aist.go.jp>. 2003.
- [208] **A. F. COSTA and J. C. DO VALE.**
Subsidios para o estado das plantas aromáticas portuguesas. *Congr. Luso – Espano. Farm.* 1952; 3; 163 - 171.
- [209] **H. BOUABDELLAH.**
Laboratoire d'Ecologie et Gestions des Ecosystèmes Naturels, Equipe : Eco – Pédologie/Cartographie, Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen. 2006.
- [210] **R. T. Checkai, R. B. Corey and P. A. Helme.**
Effects of ionic and complexed metal concentration on plant uptake of cadmium and micronutrient metals from solution. *Plant and Soil.* 1987; 99; 335-345.
- [211] **A. I. Epstein, C. D. Gussman, M. J. Blaylock, U. Yermiyahu, J. W. Huang, Y. Kapulnik and C.G. Orser.** EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant and Soil.* 1999; 208; 87-94.
- [212] **M. J. Mc Laughlin, L. T. Palmer, K. G. Tiller, T. A. Beech; and M. K. Smart.**
Increased Soil Salinity Causes Elevated Cadmium Concentrations in Field-Grown Potato Tubers. *Journal of Environmental Quality.* 1994; 23; 1013-1018.

Annexe A

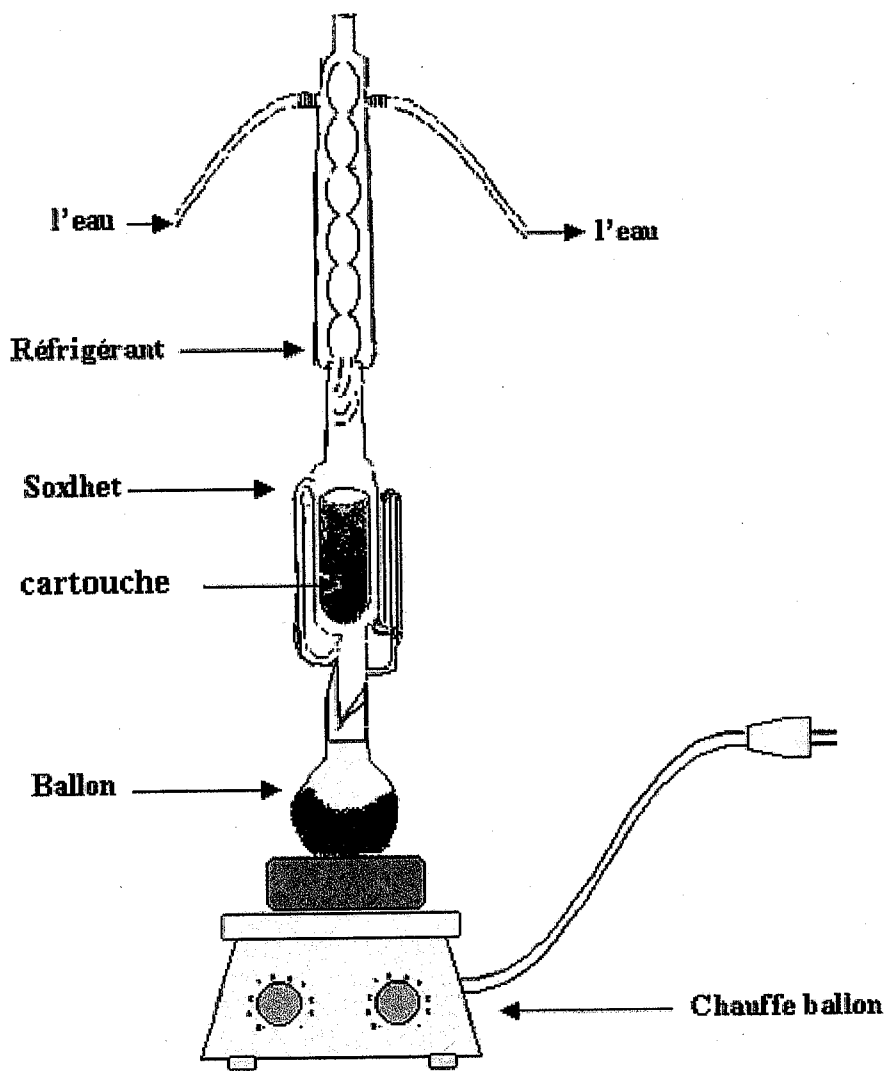


Figure 31 : Extracteur de soxhlet

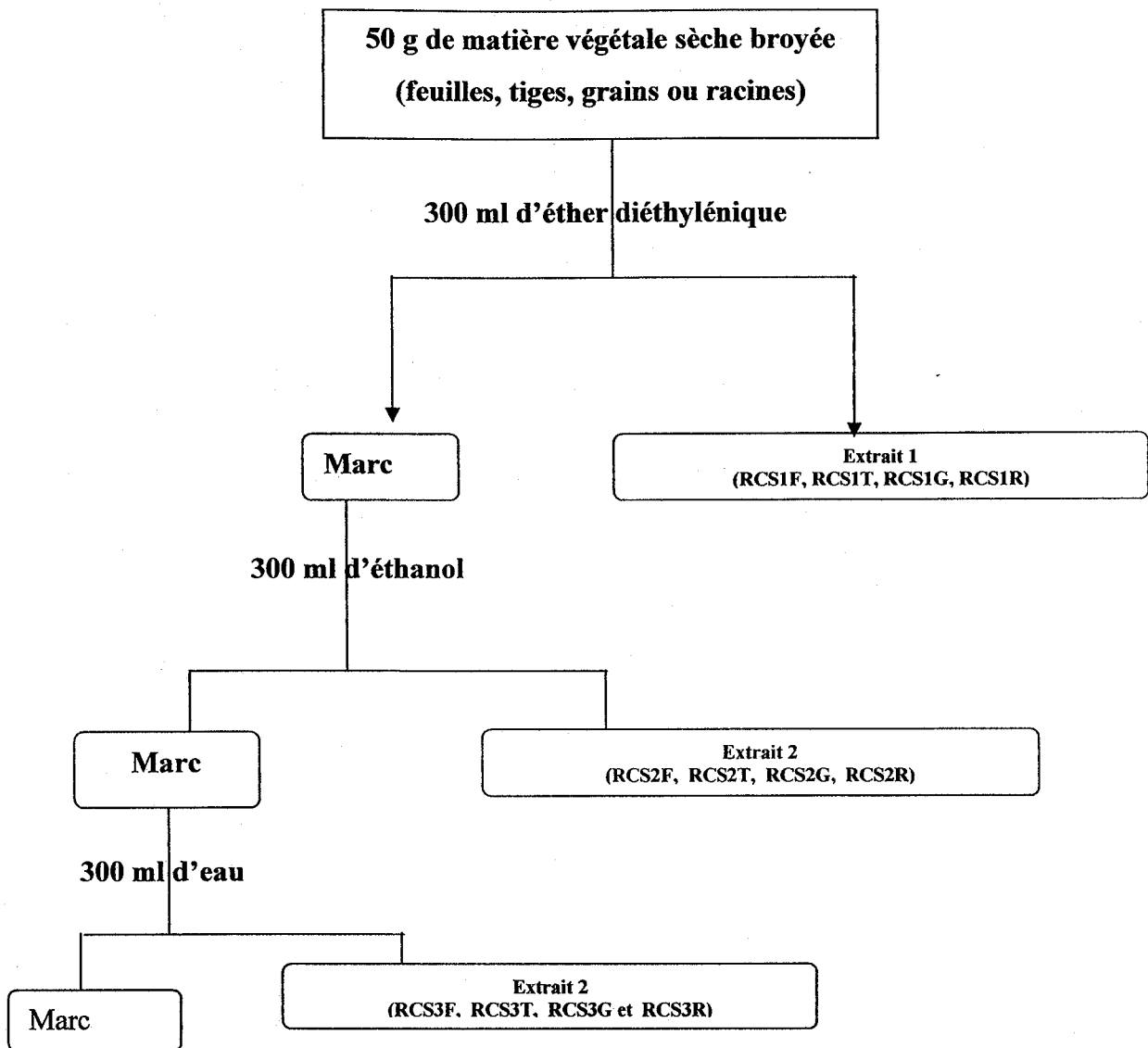


Figure 32 : Schéma décrivant les différentes étapes des extractions sélectives sur appareil de soxhlet.

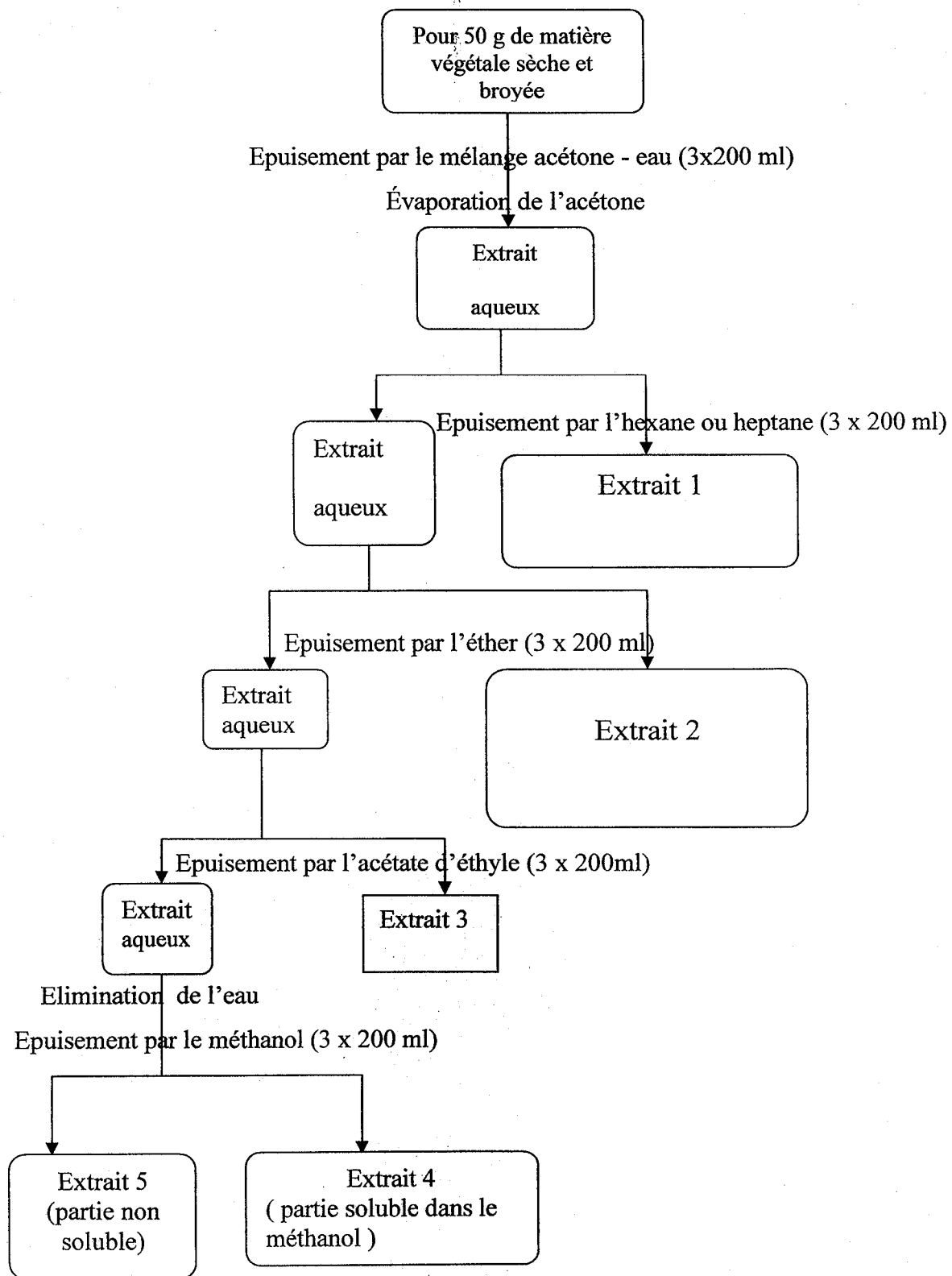


Figure 33 : schéma décrivant les différentes étapes de l'extraction à reflux et des extractions liquide – liquide.

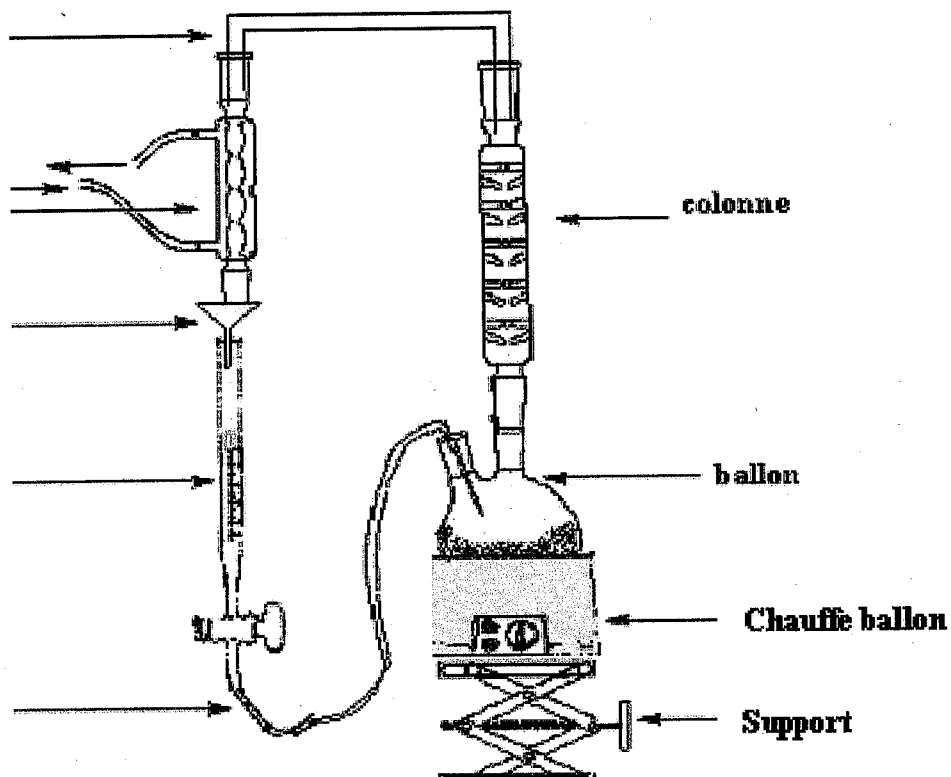
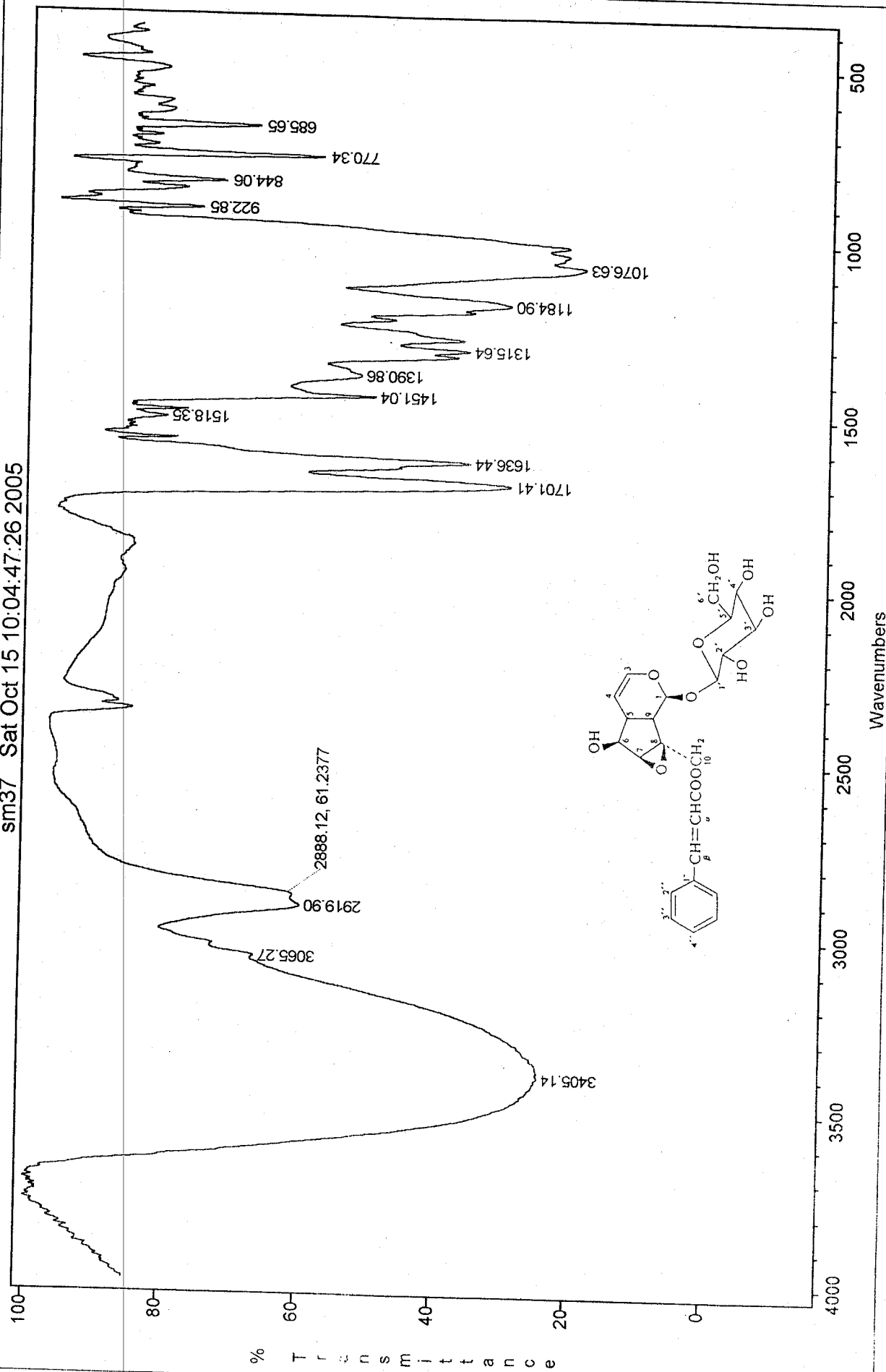


Figure 34 : Montage utilisé pour l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.

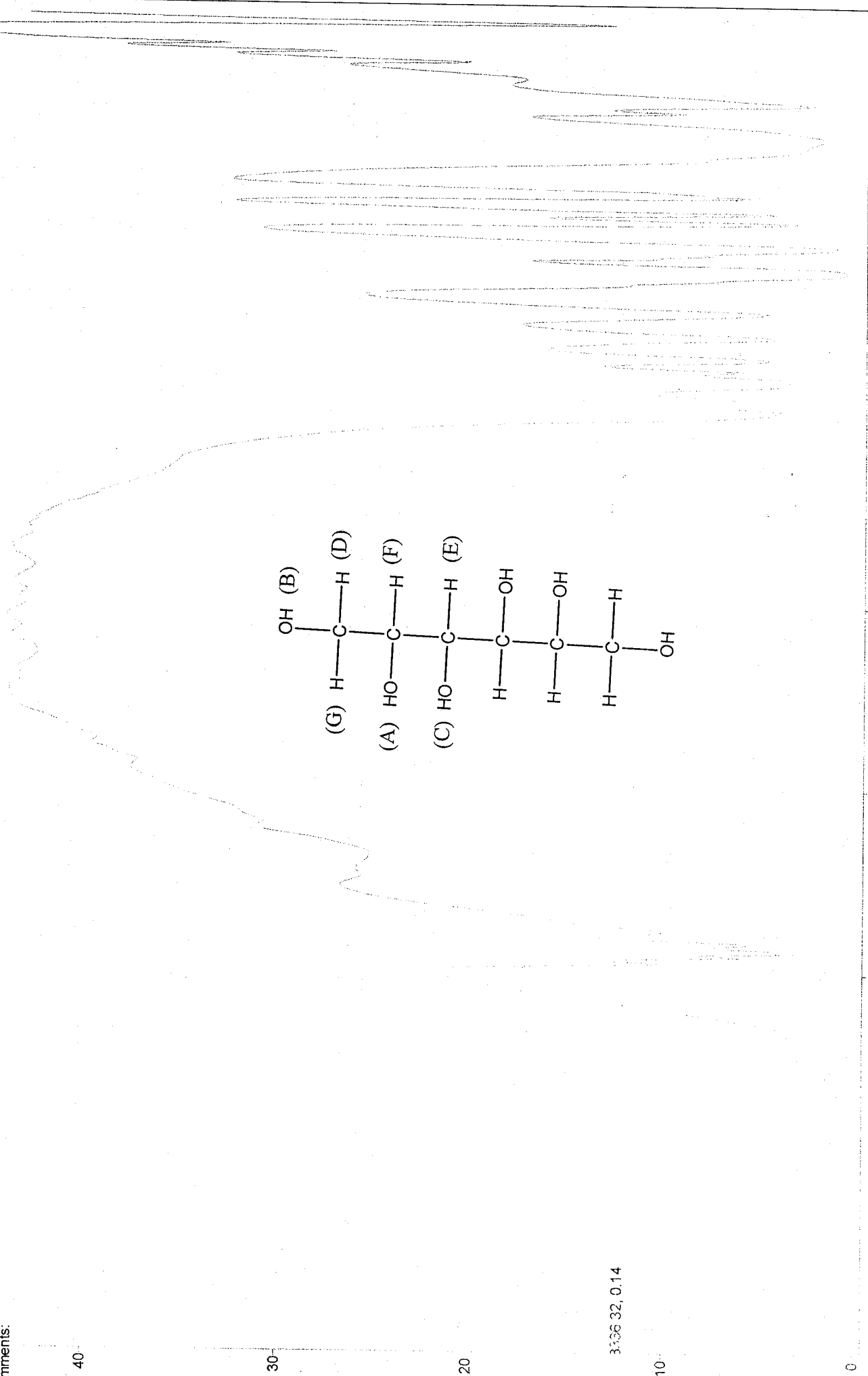
Annexe B
Spectres I.R

sm37 Sat Oct 15 10:04:47:26 2005



WinFIRST Report

Name:
Date:
Sample:
Comments:



3.366 32.014

10

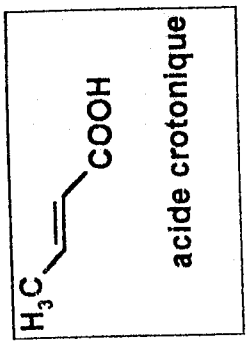
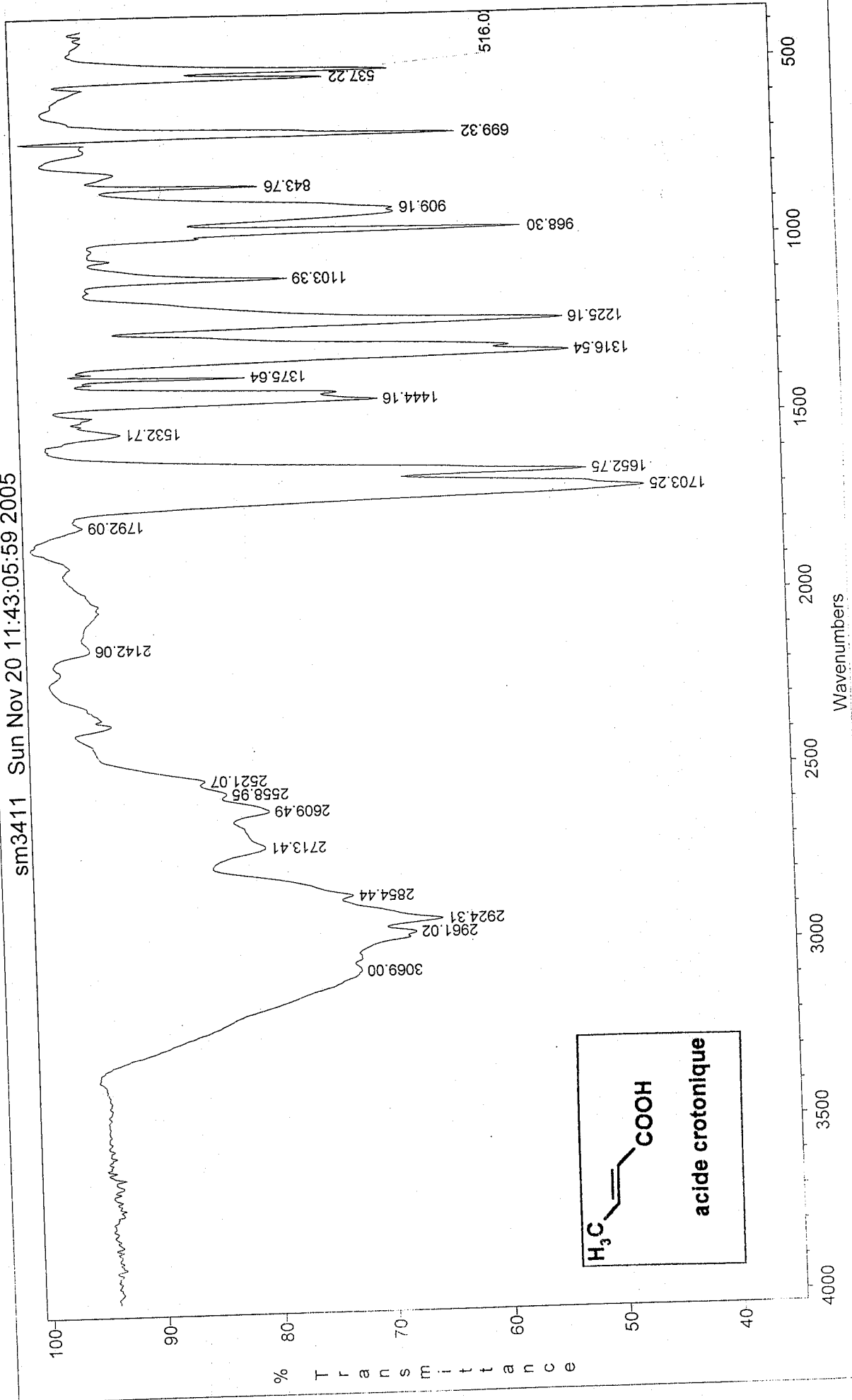
40

30

20

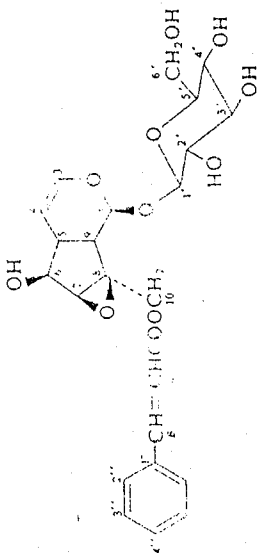
0

sm3411 Sun Nov 20 11:43:05:59 2005



Annexe C
Spectres RMN

1H/MS 3-5/CD3OD



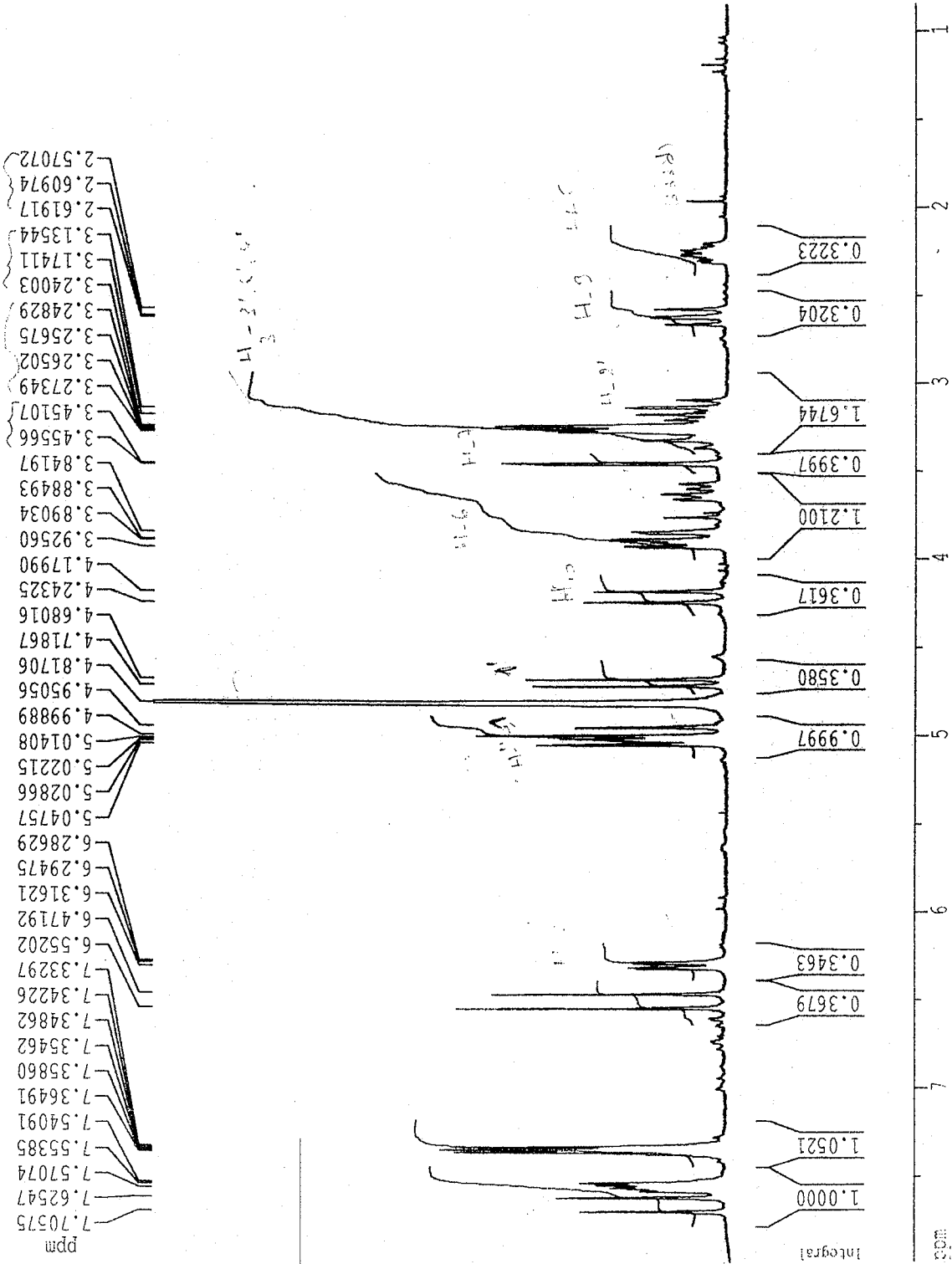
Current Data Parameters
 NAME SE06-GRIGNON
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20000906
 Time 14.34
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG zg
 TD 32768
 SOLVENT MeOH
 NS 10
 DS 0
 SWH 1436.782 Hz
 FIDRES 0.043847 Hz
 AQ 11.4033136 sec
 RG 104
 DW 348.000 usec
 DE 4.50 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec

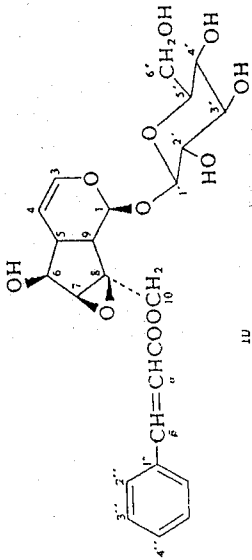
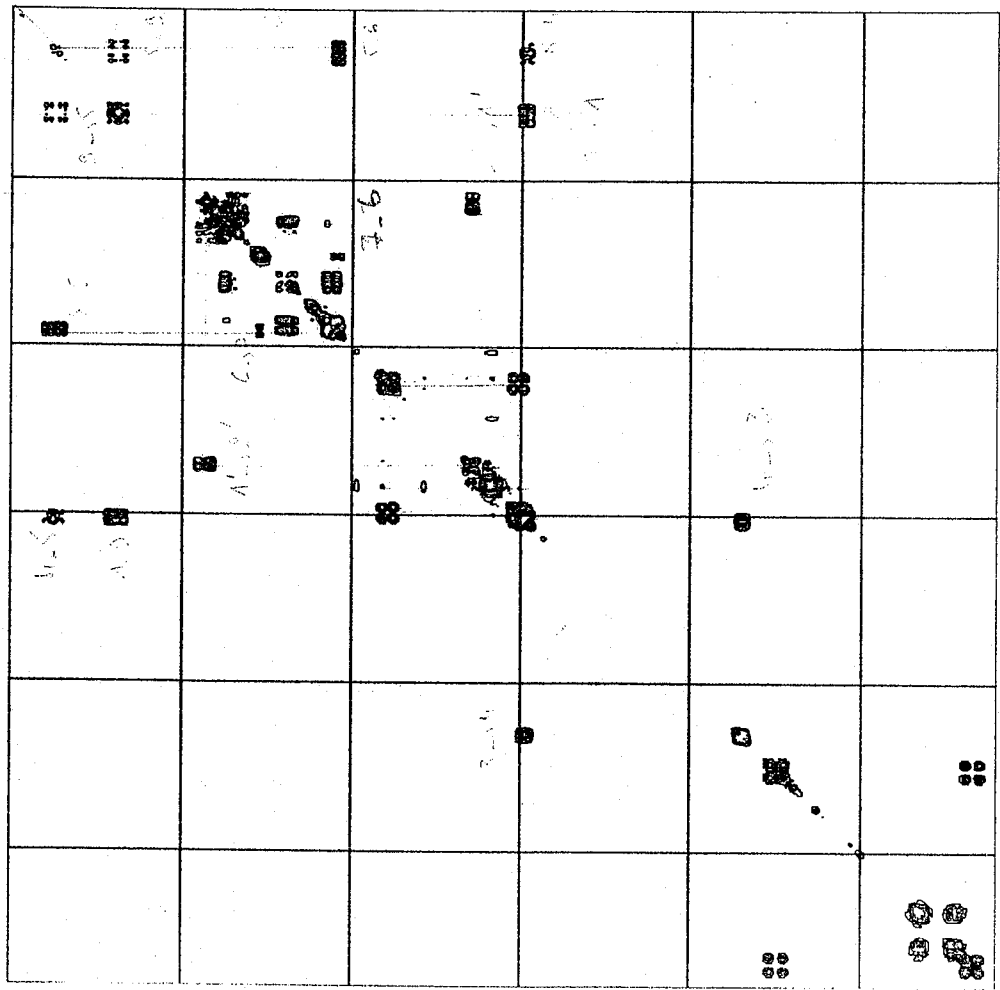
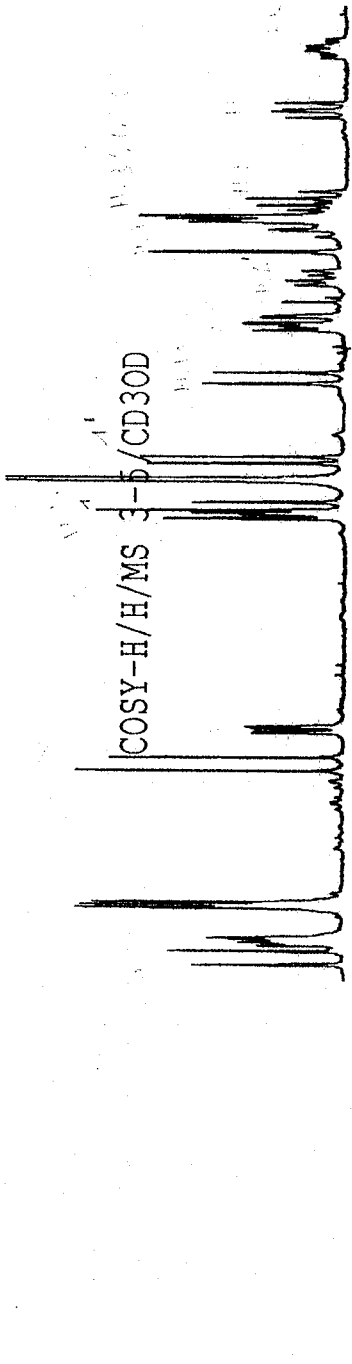
==== CHANNEL F1 =====
 NUC1 1H
 P1 7.70 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 200.1609021 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 200.1600171 MHz
 WDW no
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 0.50

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 FIP 8.000 ppm
 F1 1601.28 Hz
 F2P 0.843 ppm
 F2 168.81 Hz
 FPMCM 0.35783 ppm/cm
 HCM 71.62326 Hz/cm



COSY-H/H/MS 3-5/CD3OD



LU MeOH
 NS 8
 DS 16
 SWH 1436.782 Hz
 FIDRES 1.403107 Hz
 AQ 0.3564020 sec
 RG 512
 DM 348.000 usec
 DE 4.50 usec
 TE 300.0 K
 DO 0.00000300 sec
 D1 1.50000000 sec
 INO 0.00069600 sec

CHANNEL f1

NUCL1 1H
 P1 7.70 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 200.1609021 MHz

F1 - Acquisition parameters

MD0 1
 TD 171
 SFO1 200.1609 MHz
 FIDRES 8.402231 Hz
 SW 7.178 ppm

F2 - Processing parameters

SI 1024
 SF 200.1600171 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0
 GB 0
 PC 0.50

F1 - Processing parameters

SI 1024
 AC2 QF
 SF 200.1600171 MHz
 WDW SINE
 SSB 0
 LB 0
 GB 0

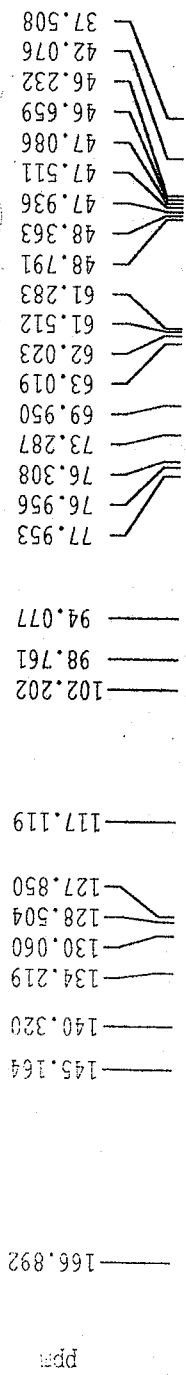
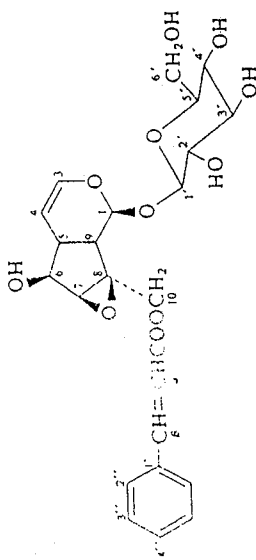
2D NMR plot parameters

CXZ 13.00 cm
 CX1 13.00 cm
 F2P1O 7.807 ppm
 F2LO 1562.73 Hz
 F2PHI 1.996 ppm
 F2HI 399.56 Hz
 F1P1O 7.807 ppm
 F1LO 1562.73 Hz
 F1PHI 1.996 ppm
 F1HI 399.56 Hz
 F2PPMCM 0.44702 ppm/cm
 F2HZCM 89.47506 Hz/cm
 F1PPMCM 0.44702 ppm/cm
 F1HZCM 89.47506 Hz/cm

ppm

ppm

13C/MS 3-5/CD3OD



Current Data Parameters
 NAME SE06-GRIGNON
 EXPNO 2
 PROCNO 1

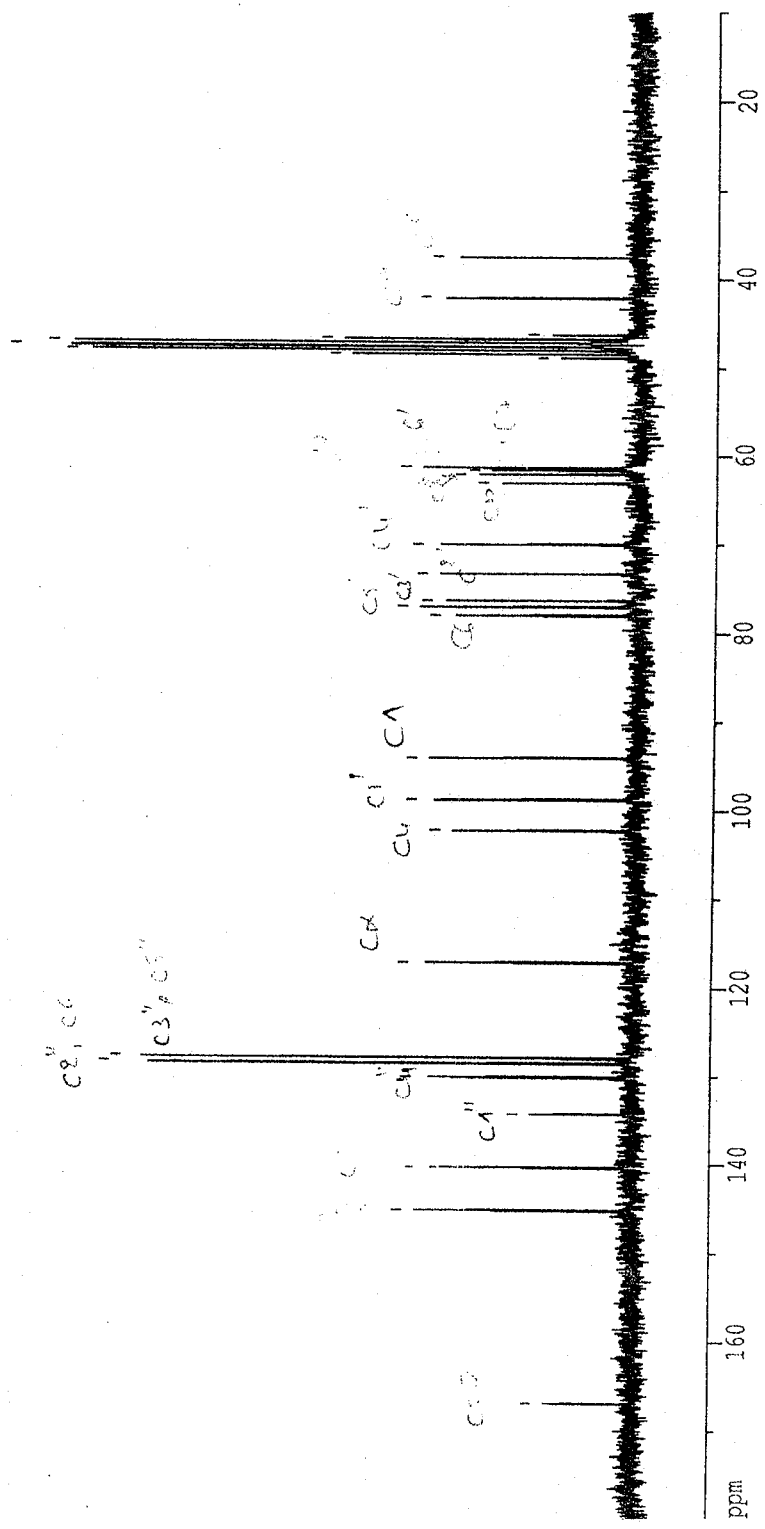
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20000906
 Time 14.45
 INSTRUM spect
 PROBD 5 mm Multinu
 PULPROG zgpg
 TD 32768
 SOLVENT MeOH
 NS 747
 DS 0
 SWH 11074.197 Hz
 FIDRES 0.337958 Hz
 AQ 1.4795252 sec
 RG 20432
 DW 45.150 usec
 DE 64.50 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 D12 0.00002000 sec

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 4.10 usec
 PL1 -6.00 dB
 SF01 50.3355367 MHz

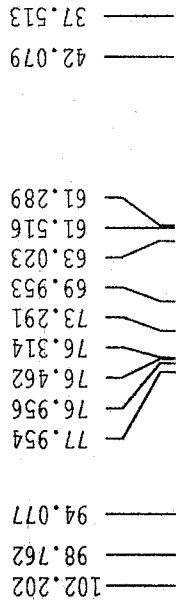
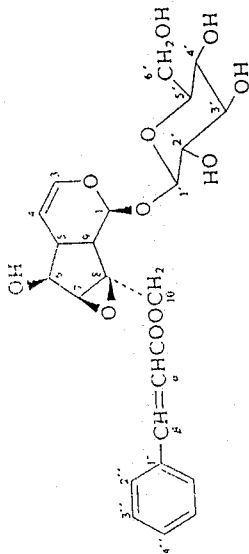
==== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waitz16
 NUC2 1H
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 -6.00 dB
 PLI2 18.00 dB
 PLI3 18.00 dB
 SFO2 200.1609007 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 50.3302792 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 0.20

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 FIP 180.000 ppm
 F1 9059.45 Hz
 F2F 10.000 ppm
 F2 503.30 Hz
 PPMCM 8.50000 ppm/cm
 HZCM 427.80737 Hz/cm



DEPT135/MS 3-5/CD3OD



Current Data Parameters
 NAME SE06-GRIGNON
 EXPNO 3
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

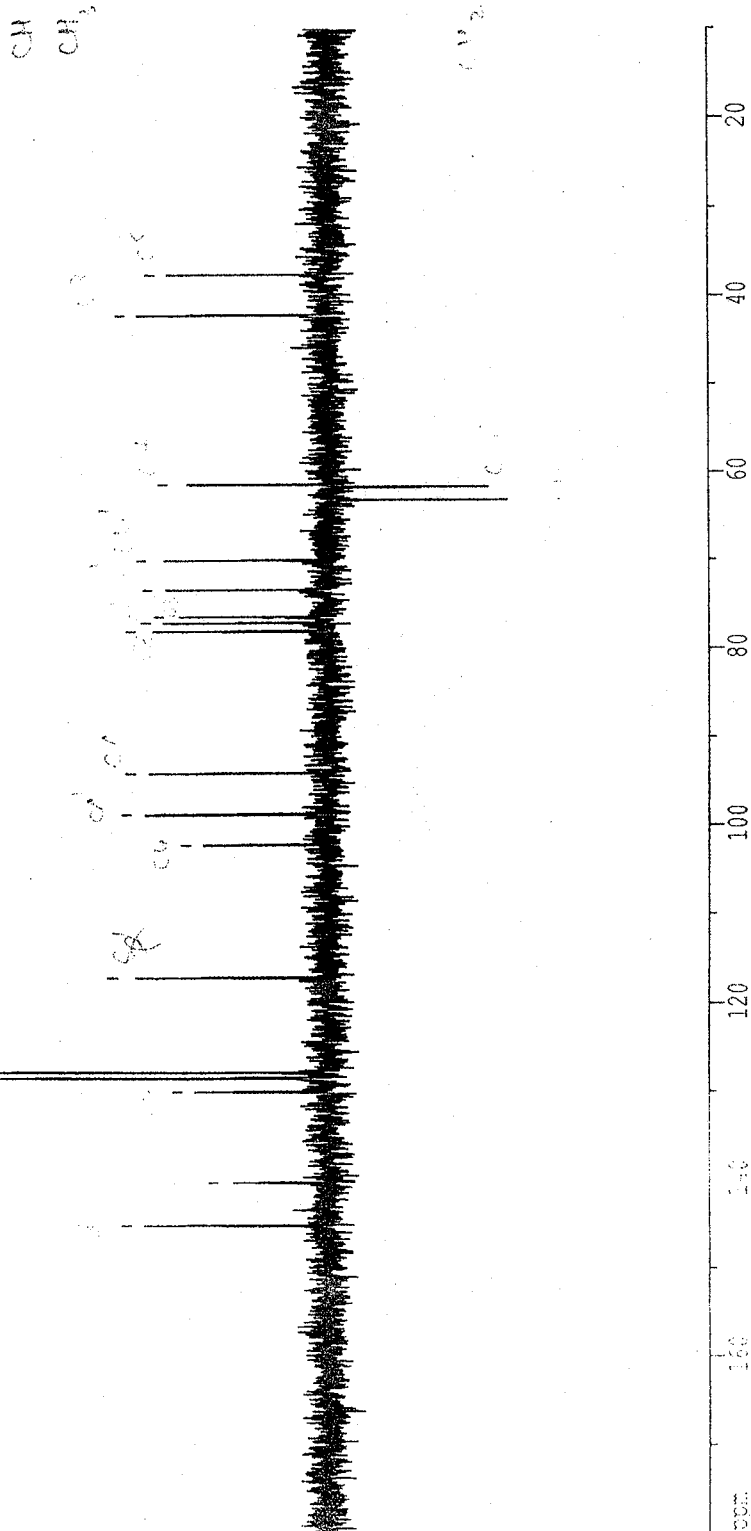
Date_ 20000906
 Time 15.17
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multinu
 PULPROG dept135
 TD 32768
 SOLVENT MeOH
 NS 482
 DS 8
 SWH 11074.197 Hz
 FIDRES 0.337958 Hz
 AQ 1.4795252 sec
 RG 20642.5
 DW 45.150 usec
 DE 64.50 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec
 D2 0.00357000 sec
 D12 0.00002000 sec
 DELTA 6366.18261719 sec

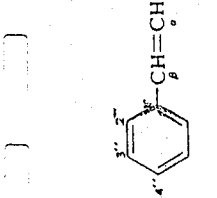
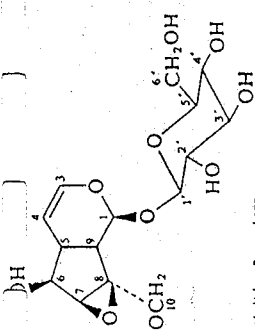
==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 4.10 usec
 P2 8.20 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 50.3355367 MHz

==== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 P3 9.00 usec
 P4 18.00 usec
 PCPD2 100.00 usec
 PL2 -6.00 dB
 PL12 18.00 dB
 SFO2 200.1609007 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 50.3302792 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 0.20

1D NMR plot parameters
 CX 20.00 cm
 FIP 180.000 ppm
 F1 9059.45 Hz
 F2P 10.000 ppm
 F2 503.30 Hz
 PPMCM 8.50000 ppm/cm
 HZCM 427.80737 Hz/cm





F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20000907
Time 17.33

INSTRUM spect
PROBHD 5 mm Maltinu
PULPROG invprind
TD 2048
SOLVENT MeOH
NS 128
DS 16
SWH 1436.82 Hz
FIDRES 0.70154 Hz
AQ 0.7127540 sec
RG 129
DM 348.000 usec
DE 497.14 usec
TE 300.0 K
D0 0.0000000 sec
D1 1.3000000 sec
D2 0.0034500 sec
D6 0.0620000 sec
IN0 0.00004513 sec

CHANNEL F1
NUC1 1H
P1 7.30 usec
P2 15.60 usec
PL1 -6.00 dB
SFO1 200.1095021 MHz

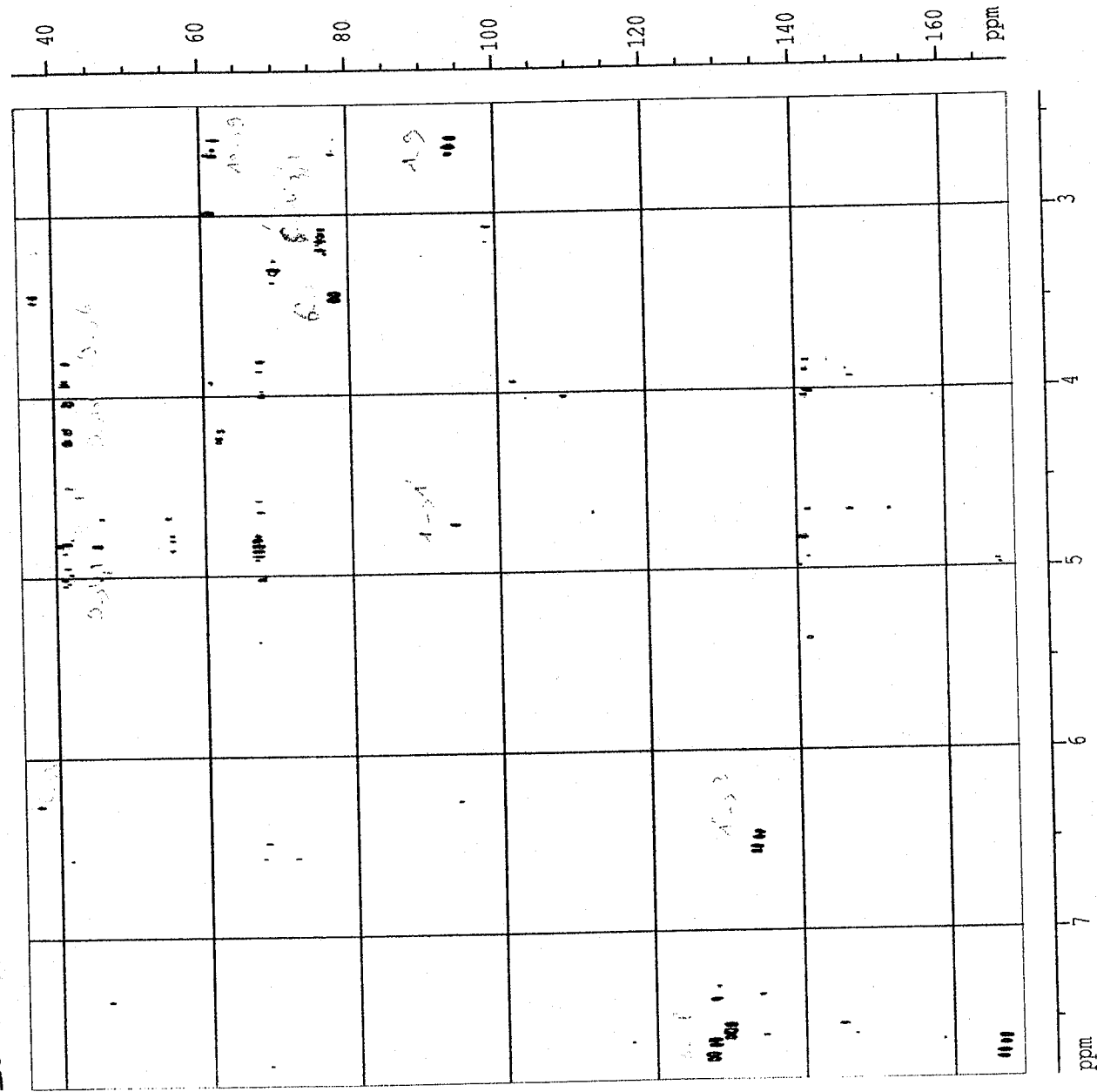
CHANNEL F2
NUC2 13C
P3 5.30 usec
PL2 -6.00 dB
SFO2 50.335367 MHz

F1 - Acquisition Parameters
NU0 252
TD 4
SFO1 50.31654 MHz
FIDRES 43.256483 Hz
SW 220.008 EPM

F2 - Processing Parameters
SI 1024
SF 200.1600171 MHz
WDW QSINE
SSB 4
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 0.30

F1 - Processing Parameters
SI 1024
SF 50.3302752 MHz
WDW QSINE
SSB 4
LB 0.00 Hz
GB 0

2D NMR plot parameters
CX2 15.00 cm
CX1 15.00 cm
F2P10 7.828 EPM
F2L0 1566.94 Hz
F2P11 2.396 EPM
F2P12 479.33 Hz
F1P10 169.566 EPM
F1L0 8534.30 Hz
F1P11 35.270 EPM
F1P12 1775.14 Hz
F2P10CH 0.36218 EPM/cm
F2P11CH 72.49387 Hz/cm
F1P10CH 8.95306 EPM/cm
F1P11CH 430.61026 Hz/cm



Current Data Parameters
 EXPNO 7
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20000907
 Time 11.05

INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm Multi1H
 PULPROG zgpg30
 TD 2688
 SOLVENT MeOH
 NS 16
 DS 16
 SWH 11074.131 Hz
 FIDRES 0.092172 Hz
 RG 29183
 DW 45.150 usec
 DE 64.50 usec
 TE 300.0 K
 D0 0.0000000 sec
 D1 1.0000000 sec
 D2 0.0300000 sec
 D11 0.0300000 sec
 D12 0.0002000 sec
 IT0 0.0001400 sec

===== CHANNEL F1 =====
 NUCL1 13C
 P1 4.10 usec
 F2 8.20 usec
 PL1 -6.00 dB
 SFO1 50.325367 MHz

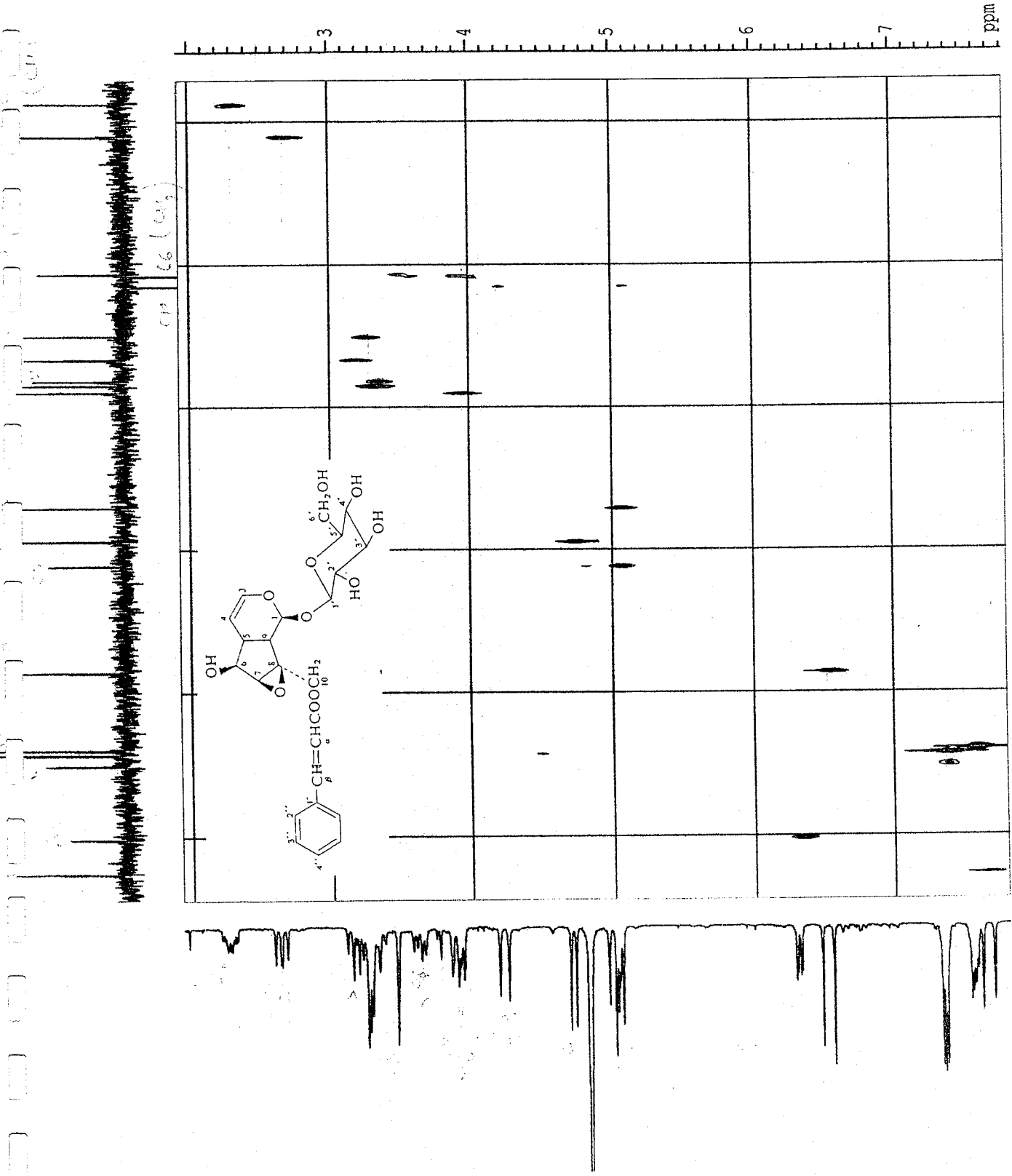
===== CHANNEL F2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUCL2 1H
 P2 13.50 usec
 F3 9.00 usec
 F4 18.00 usec
 PCPD2 15.00 usec
 PL2 0.00 dB
 PL12 18.00 dB
 SFO2 200.1609021 MHz

F1 - Acquisition Parameters
 MD0 4
 TD 201
 SFO1 200.1609 MHz
 FIDRES 7.148167 Hz
 SM 7.178 ppm

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 60.325367 MHz
 SSB 2
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 0.50

F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 TPI
 SF 200.1609754 MHz
 WDW GEM
 SSB 0
 LB 0.00 Hz
 GB 0

2D NMR plot parameters
 CX2 15.00 cm
 CX1 15.00 cm
 FZPL0 148.938 ppm
 FZL0 7496.09 Hz
 FZPH 34.195 ppm
 FZPL 172.07 Hz
 FZPL0 1564.52 ppm
 FZL0 1.921 ppm
 FZPH 304.60 Hz
 FZPL0 7.64950 ppm/cm
 FZL0 385.00137 Hz/cm
 FZPH0 0.39302 ppm/cm
 FZL0 78.66754 Hz/cm



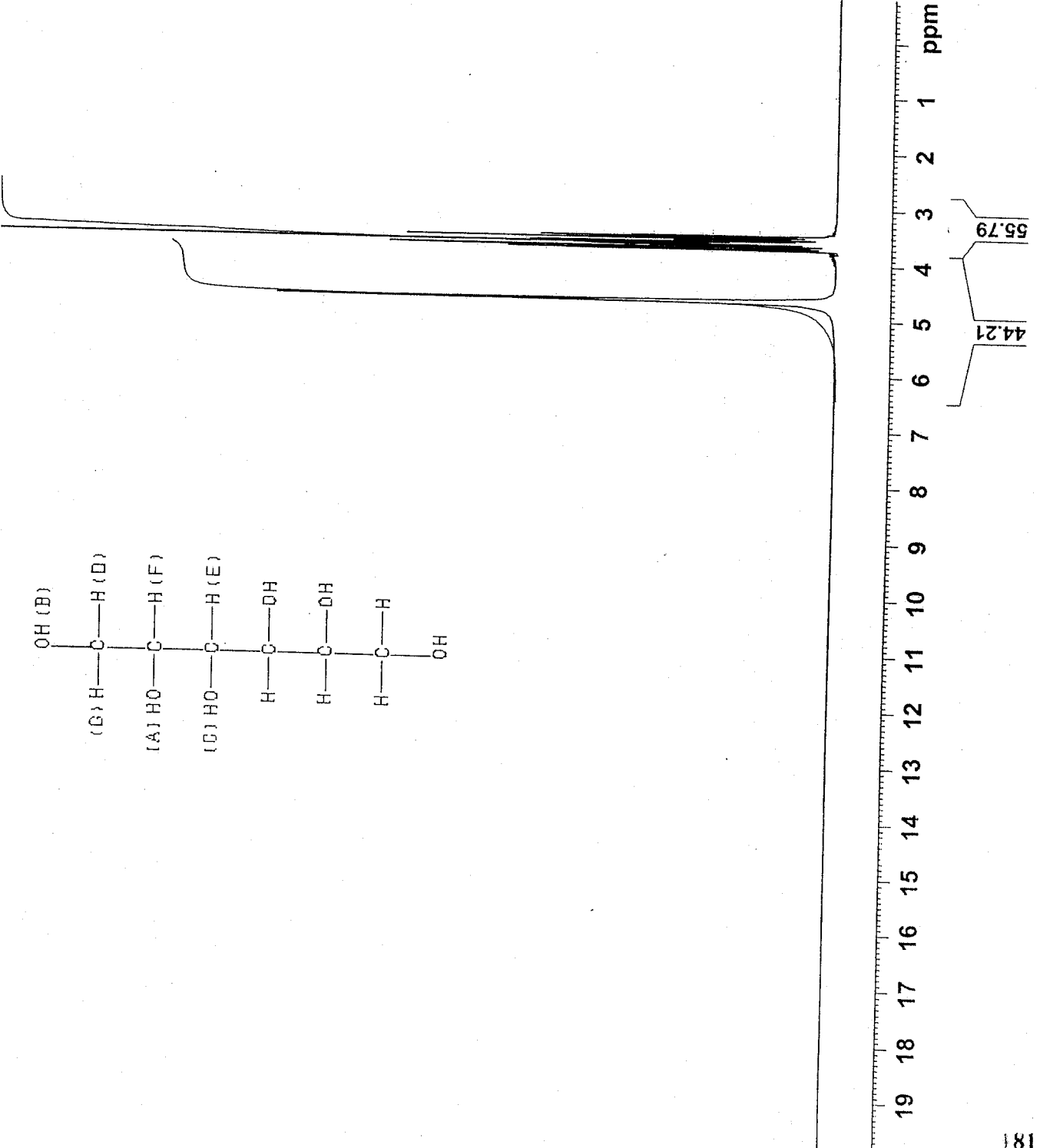
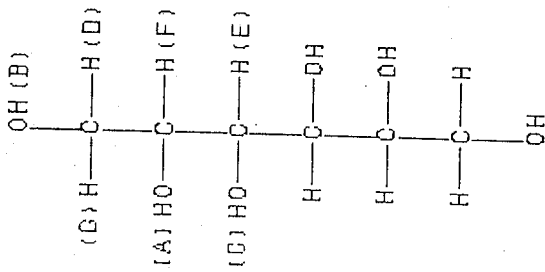


Current Data Parameters
 NAME 21020313
 EXPNO 1
 PROCNO 1

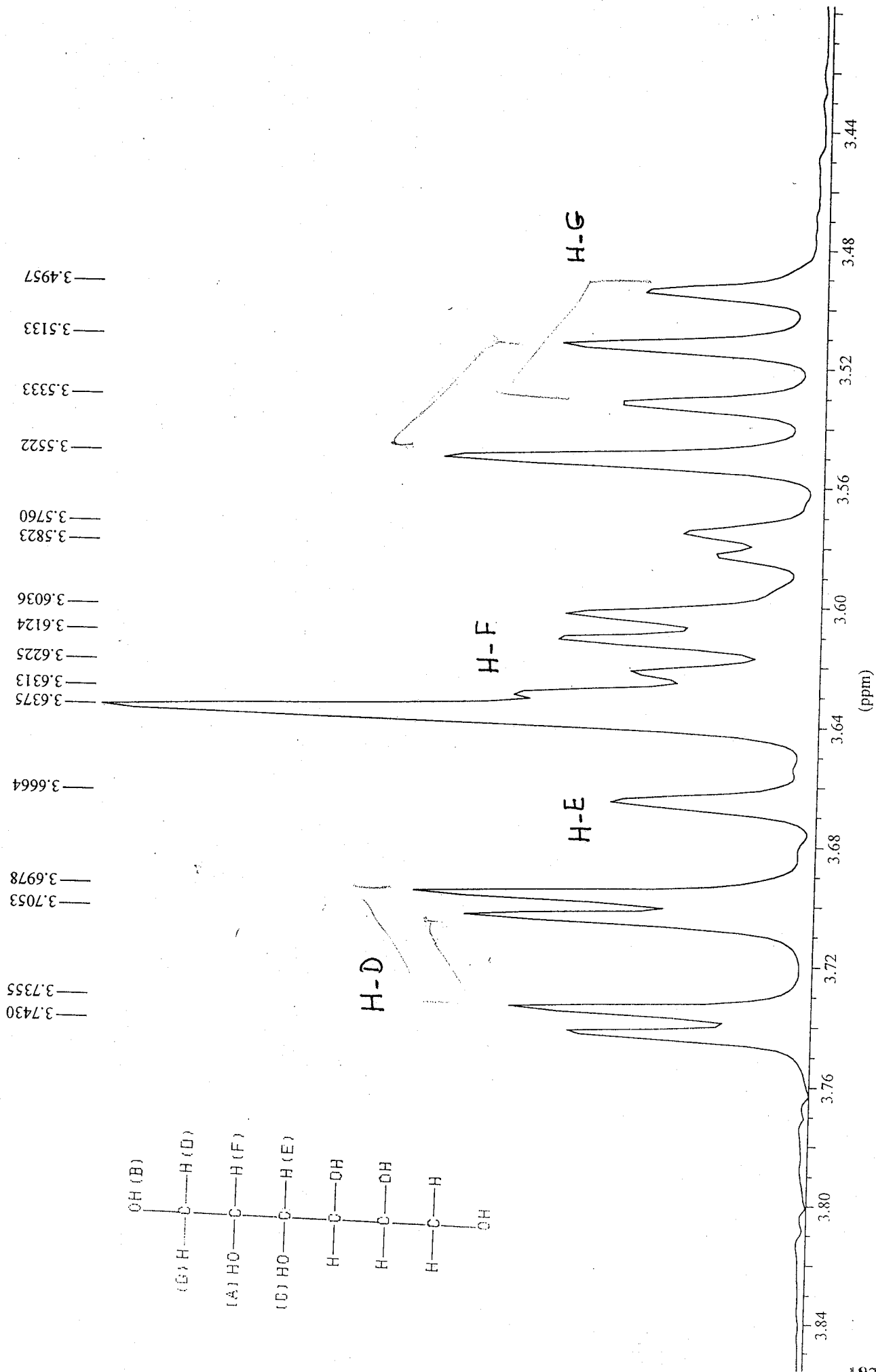
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20030221
 Time 11.23
 INSTRUM spect
 PROBD 5 mm BBI 1H-BB
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT D2O
 NS 16
 DS 0
 SWH 6172.839 Hz
 FIDRES 0.188380 Hz
 AQ 2.6542580 sec
 RG 35.9
 DW 81.000 usec
 DE 5.50 usec
 TE 300.0 K
 D1 1.00000000 sec

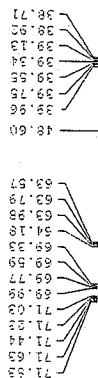
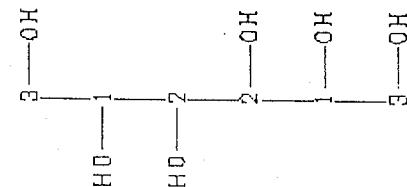
==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 4.50 usec
 PL1 1.00 dB
 SF01 300.1328512 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 16384
 SF 300.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00



44.21
55.79





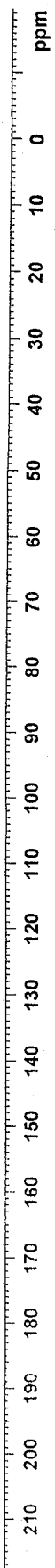
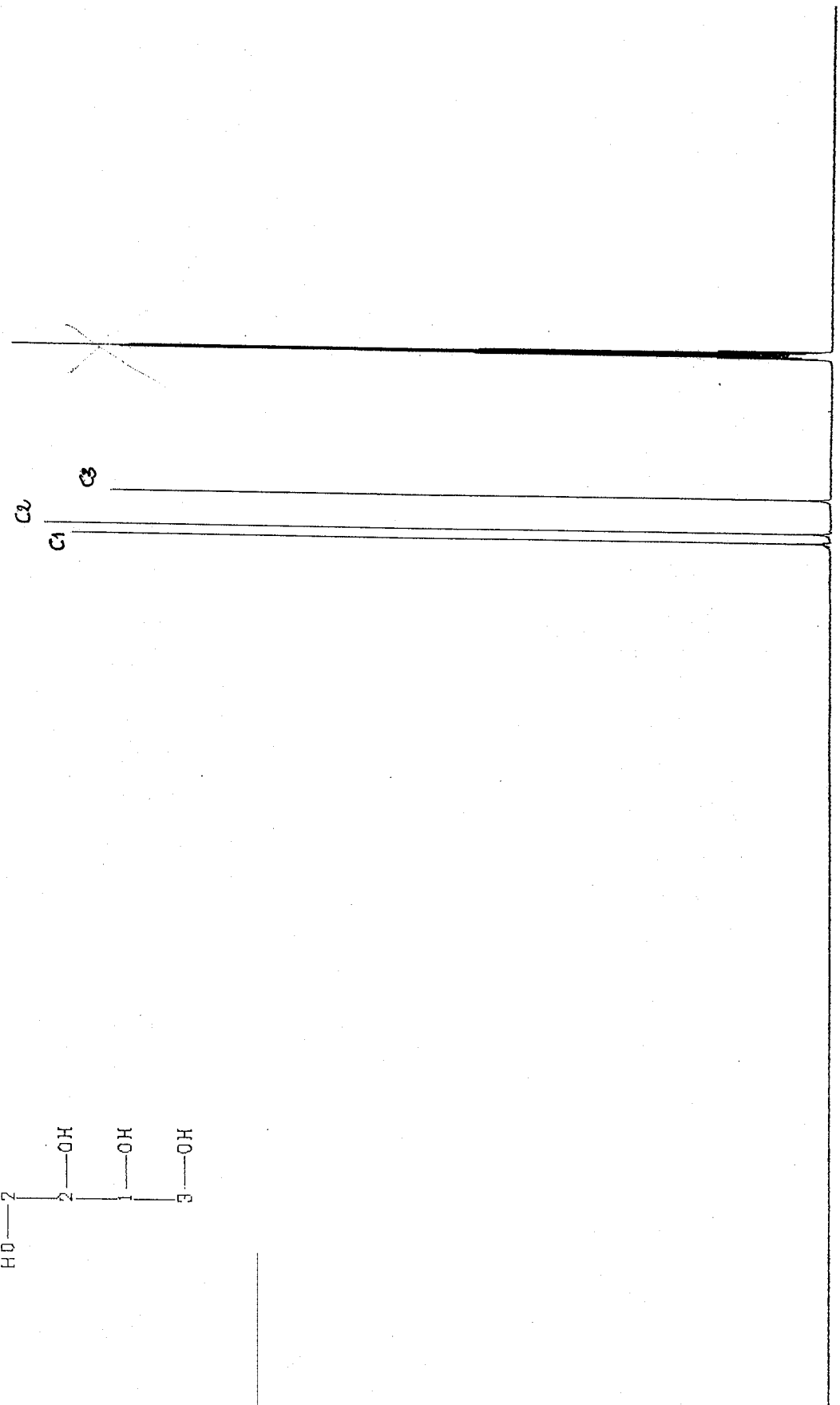
Current Data Parameters
 NAME Nov30-2004
 EXPNO 200
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20041201
 Time_ 0.33
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 7168
 DS 2
 SWH 23980.814 Hz
 FIDRES 0.365918 Hz
 AQ 1.3664756 sec
 RG 1149.4
 DW 20.850 usec
 DE 10.00 usec
 TE 296.0 K
 gH1 0.03000000 sec
 D1 2.00000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 9.00 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 100.6228298 MHz

==== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 ECPD2 80.00 usec
 PL2 -4.00 dB
 PL12 14.00 dB
 PL13 14.00 dB
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6128193 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40





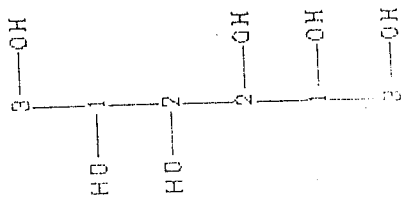
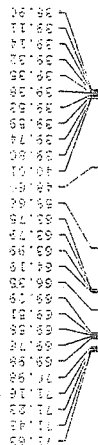
Current Data Parameters
 NAME Nov30-2004
 EXPNO 201
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20041201
 Time 5.26
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG dept135
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 5120
 DS 4
 SWH 23980.814 Hz
 FIDRES 0.365918 Hz
 AQ 1.3664756 sec
 RG 23170.5
 DW 20.850 usec
 DE 10.00 usec
 TE 295.2 K
 CNST2 145.0000000
 d2 0.00344828 sec
 d12 0.0002000 sec
 D1 2.0000000 sec
 DELTA 0.00001146 sec
 TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P2 18.00 usec
 P1 9.00 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 100.6228298 MHz

==== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 P4 20.00 usec
 P3 10.00 usec
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 14.00 dB
 PL1 -4.00 dB
 SFO2 400.1316005 MHz

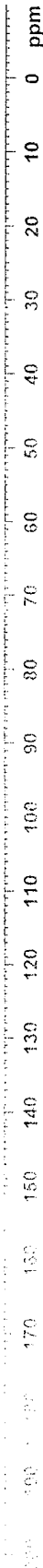
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6128193 MHz
 EM
 WDW 0
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40



CH

CH₂

C₃





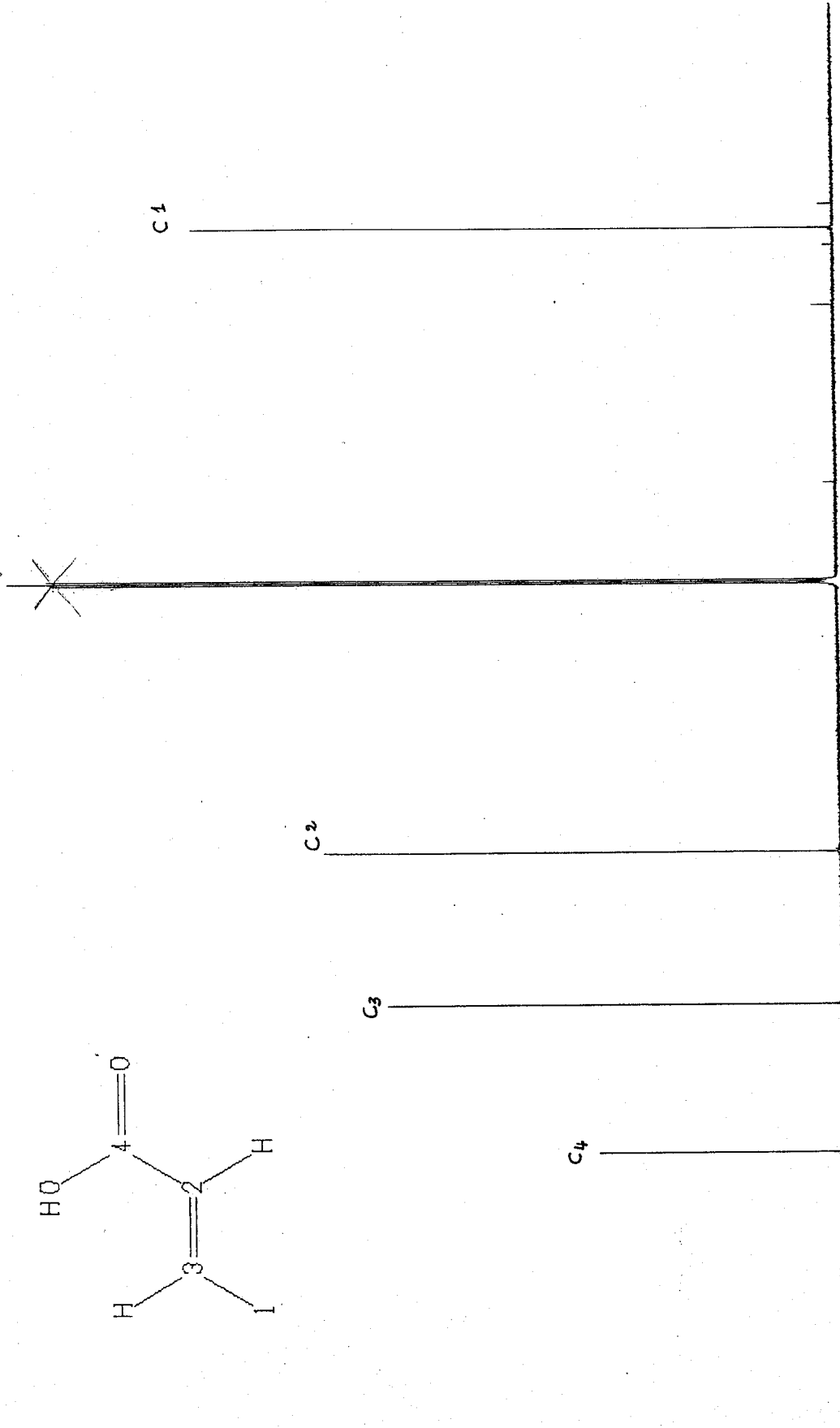
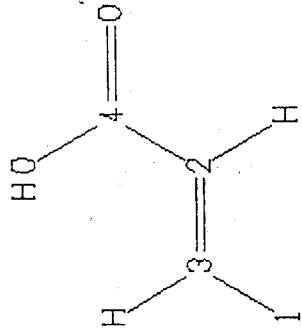
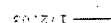
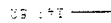
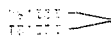
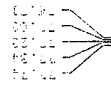
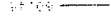
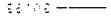
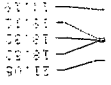
Current Data Parameters
 NAME Jan19-2006
 EXPNO 110
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20060120
 Time 7.08
 INSTRUM spect
 PROBRD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 5120
 DS 2
 SWH 23980.814 Hz
 FIDRES 0.365918 Hz
 AQ 1.3664756 sec
 RG 1149.4
 DW 20.850 usec
 DE 10.00 usec
 TE 296.5 K
 D1 2.00000000 sec
 d11 0.03000000 sec
 DELTA 1.89999998 sec
 TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 9.00 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 100.6228298 MHz

==== CHANNEL f2 =====
 NUC2 1H
 P2 80.00 usec
 PL2 -4.00 dB
 PL12 14.00 dB
 PL13 14.00 dB
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6127690 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40





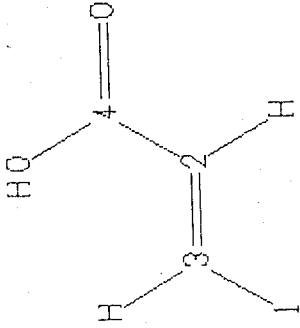
Current Data Parameters
 NAME Jan20-2006
 EXPNO 10
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date 20060120
 Time 12.18
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT CDCl3
 NS 2048
 DS 4
 SWH 23980.811 Hz
 FIDRES 0.365317 Hz
 AQ 1.3664756 sec
 RG 18390.4
 DW 20.850 usec
 DE 10.00 usec
 TE 296.3 K
 CNST2 145.0000000
 D1 2.000000000 sec
 d2 0.00344828 sec
 d12 0.000020000 sec
 DELTA 0.00001146 sec
 TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 13C
 P1 9.00 usec
 P2 18.00 usec
 PL1 -1.00 dB
 SFO1 100.6228298 MHz

==== CHANNEL f2 =====
 CPDPRG2 waltz16
 NUC2 1H
 P3 10.00 usec
 P4 20.00 usec
 PCPD2 80.00 usec
 PL2 -4.00 dB
 PL12 14.00 dB
 SFO2 400.1316005 MHz

F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 100.6127690 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 0

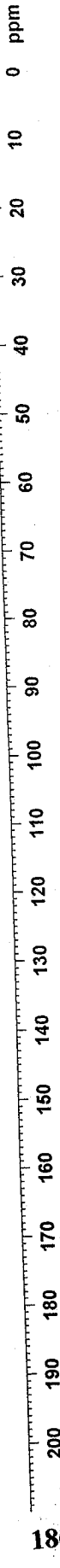


CH
 CH
 CH₃

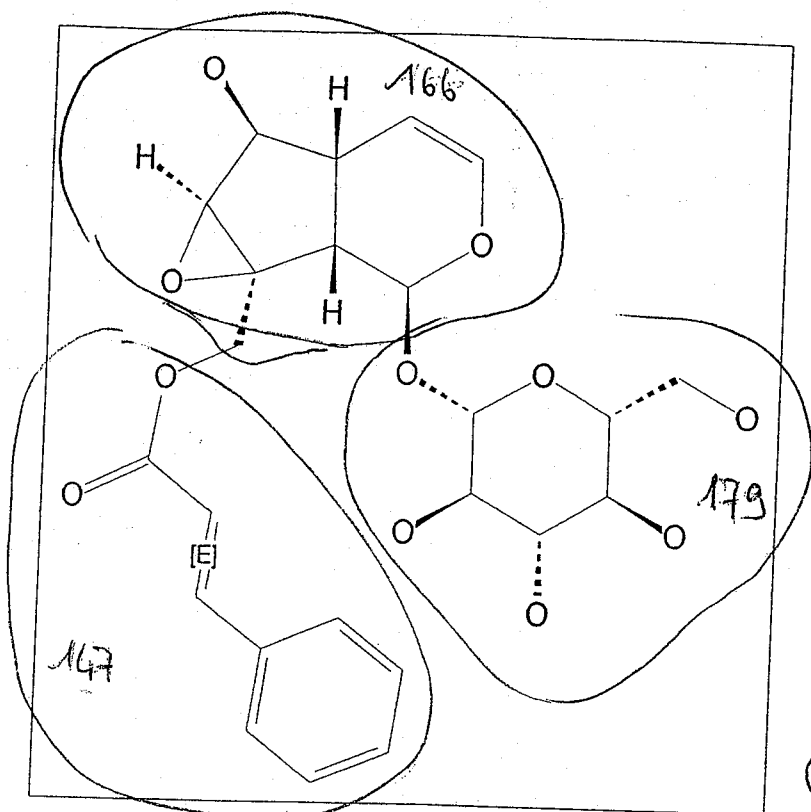
C1

C2

C3



Annexe D
Spectre de S.M



Globularin

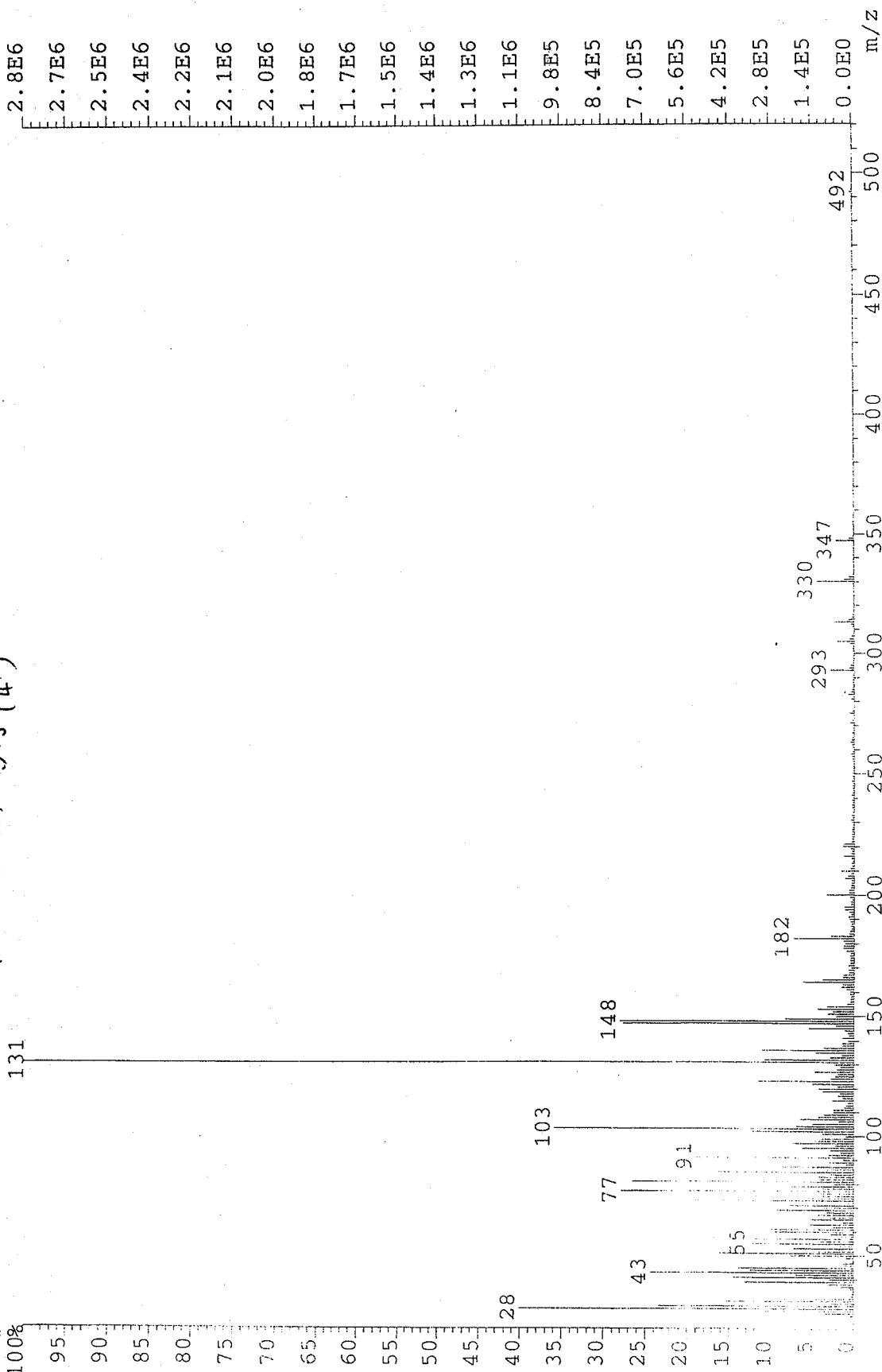
Substance

Beilstein Registry Number	5193000
CAS Registry Number	1399-49-1, 58286-51-4, 76248-14-1
Chemical Name	globularin
Autoname	3-phenyl-acrylic acid 6-hydroxy-2-(3,4,5-trihydroxy-6-hydroxymethyl-tetrahydro-pyran-2-yloxy)-1b,5a,6,6a-tetrahydro-2H-1,3-dioxo-cyclopropa- α -inden-1a-ylmethyl ester
Molecular Formula	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₁
Molecular Weight	492.48
Lawson Number	21646, 17647, 10663
Structure Keyword	Stereo compound
Compound Type	heterocyclic
Constitution ID	4337240
Tautomer ID	4923462
Beilstein Reference	6-19
Entry Date	1992/08/28
Update Date	1999/01/25

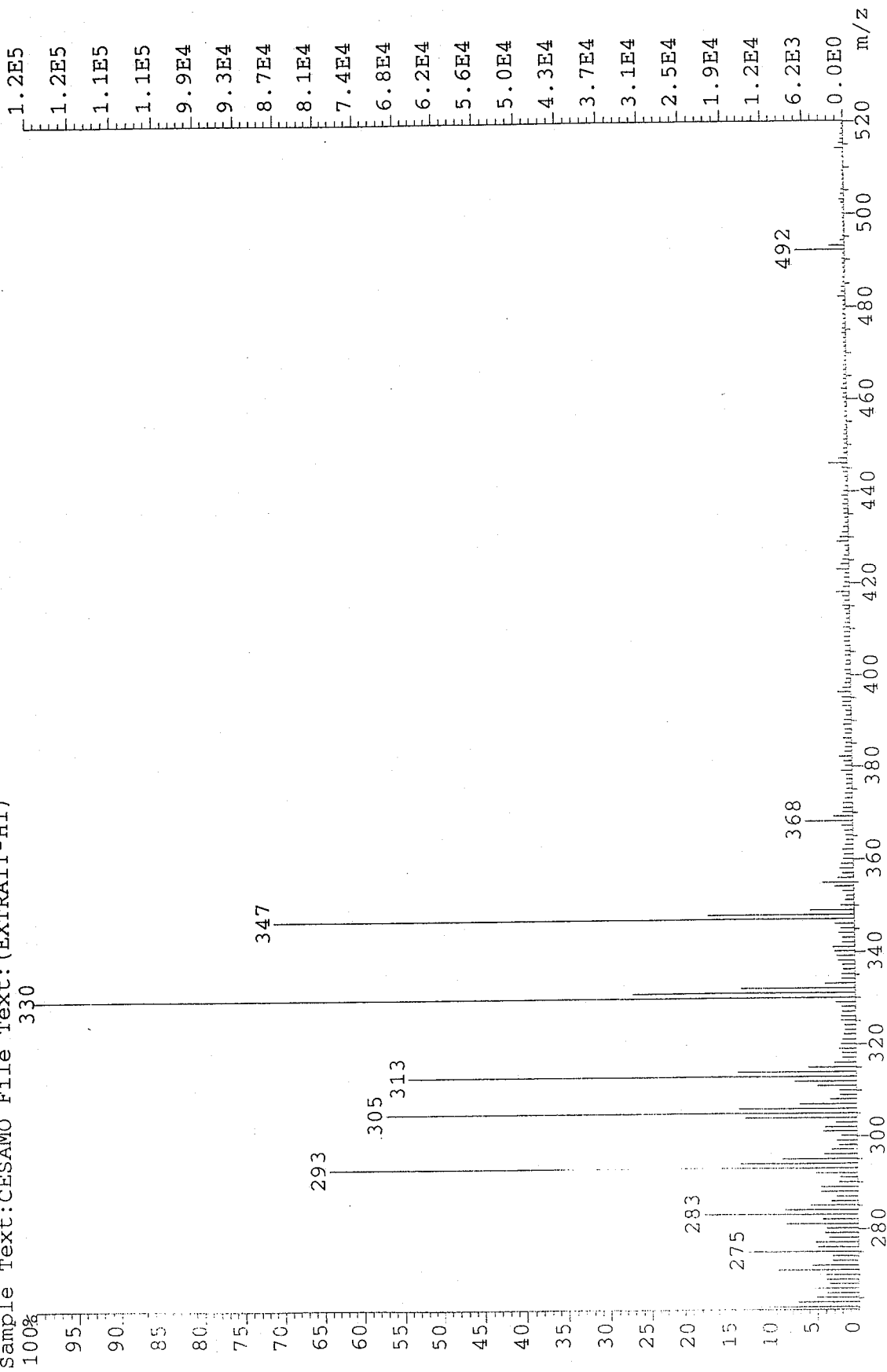
Field Availability List 1-6 of 6

Code	Field Name	Occ.
RX	Reaction	2
RSTR	Related Structure	1
INP	Isolation from Natural Product	3
MP	Melting Point	1
ORP	Optical Rotatory Power	1

File: 200451EIID-GRIGNON Ident: 200_229-85 Mer Def 0.25 Acq: 7-JUN-2000 14:18:00 +9:23 Cal: CAL-EI
 AutoSpecEQ EI+ Magnet BpM: 131 BpI: 2789640 TIC: 28456716 Flags: HALL
 Sample Text: CESAMO File Text: (EXTRAIT-H1) 3-5 (4')



File: 200451EIID-GRIGNON Ident: 200_230 Mer Def 0.25 Acq: 7-JUN-2000 14:18:00 +9:24 Cal: CAL-EIID->
AutoSpecEQ EI+ Magnet BpM: 131 BpI: 2769772 TIC: 31204296 Flags: HALL
Sample Text: CESAMO File Text: (EXTRAIT-H1)



ANNEXE E

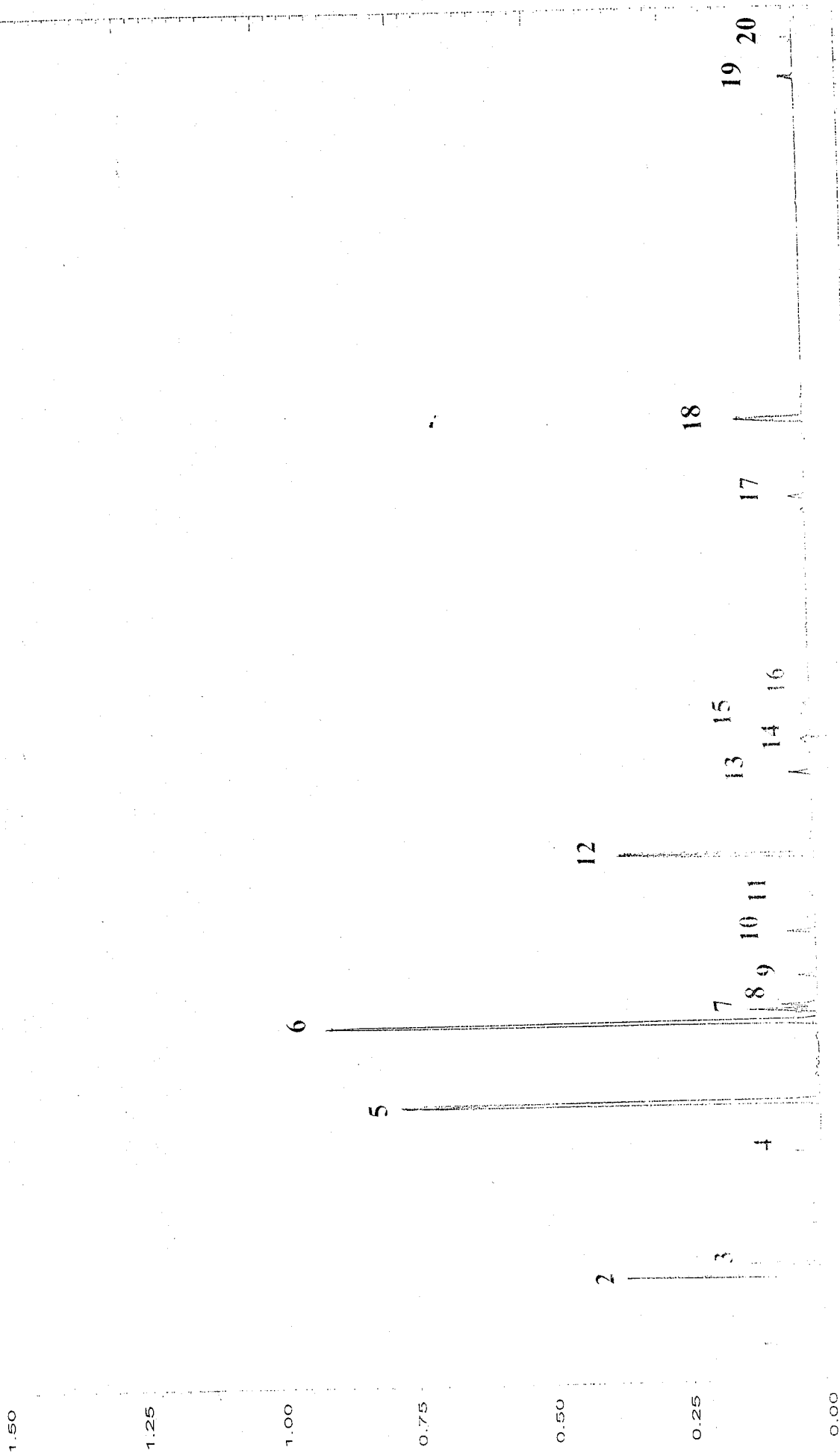
***Chromatogrammes et spectres
S.M des composés identifiés***

Chromatogr

**Chromatogramme de l'huile essentielle de Ruta
chalepensis L. de provenance Beni Mester (octobre 2005)
CG-SM (DB 5)**

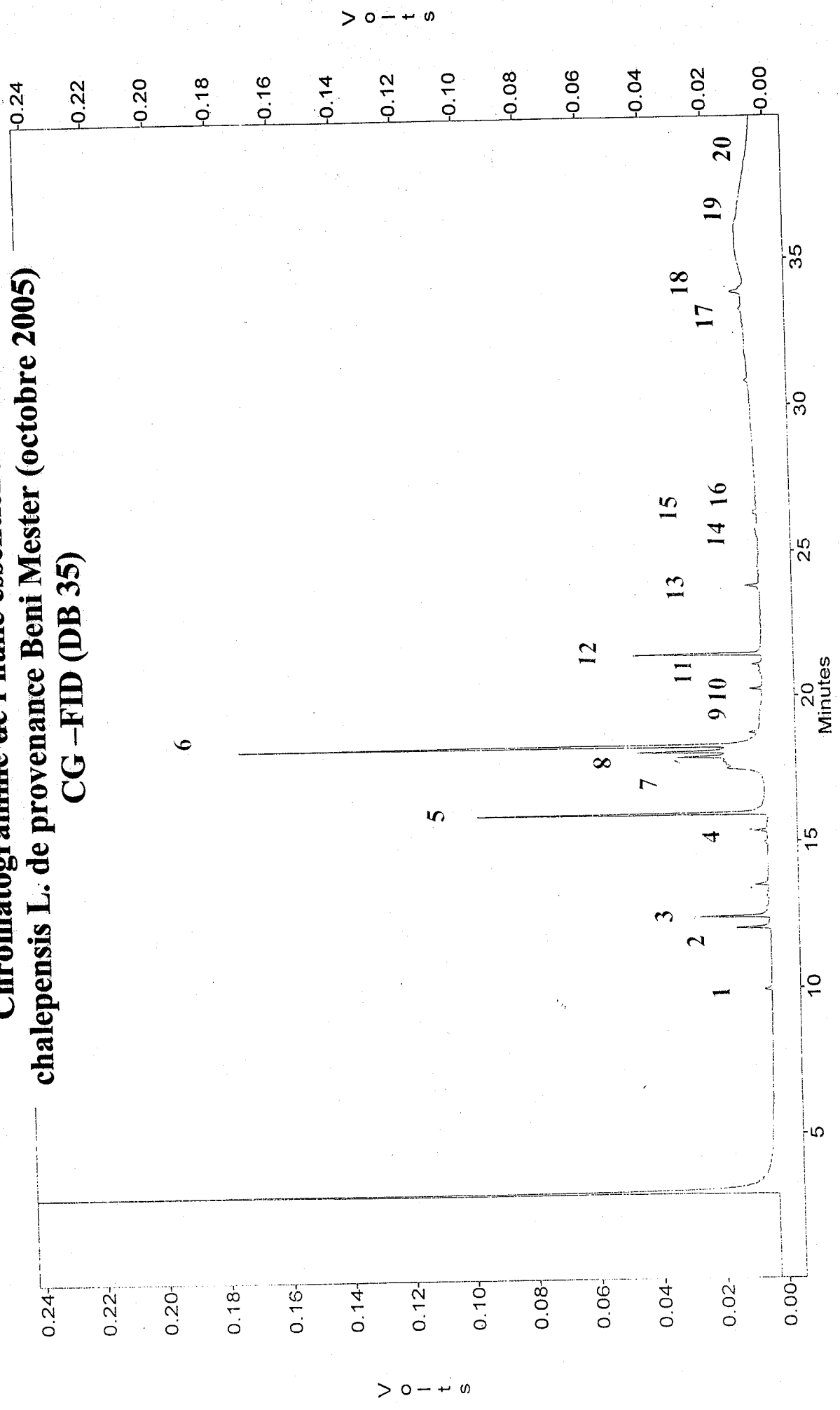
File: c:\saturmws\
Sample: TABTIF
Scan Range: 1 -
MCounts

|| TABTIFHM2.SMS



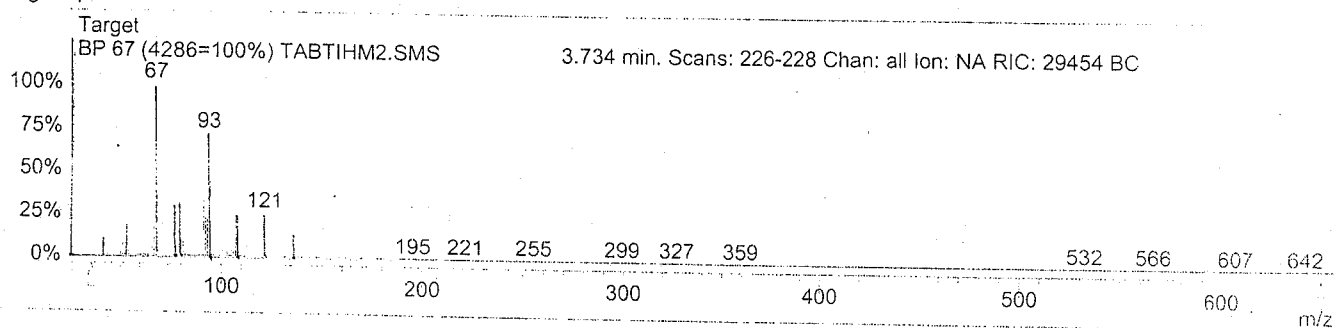
minutes	Scans
7.5	403
10.0	621
12.5	779
15.0	937

**Chromatogramme de l'huile essentielle de Ruta
chalepensis L. de provenance Beni Mester (octobre 2005)
CG-FID (DB 35)**

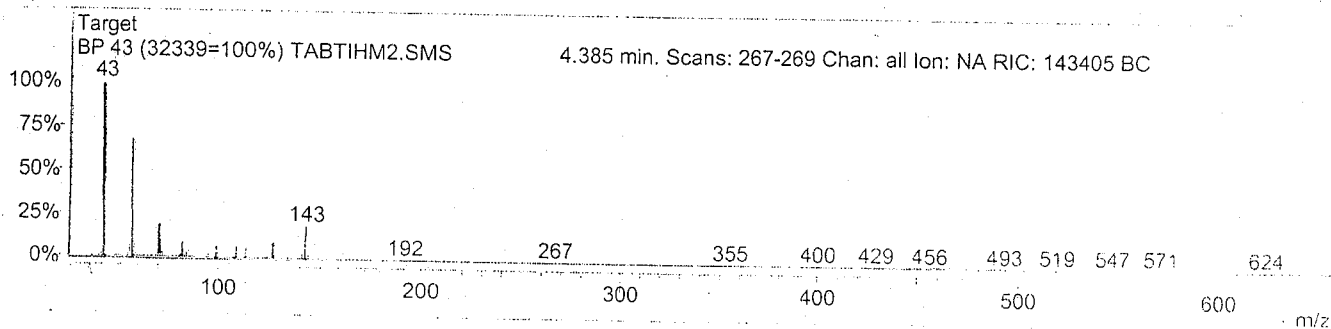


N°	Composé	N°	Composé
1	Limonène	11	2- Dodécanone
2	2-Nonanone	12	1- Dodécanol
3	2- Nonanol	13	2-Tridécanone
4	2- Décanone	14	E-11, 13-diméthyl-12-tétradécèn-1-ol acétate
5	1-Décanol	15	Elémol
6	2-Undécanone	16	Elemicin
7	2-Undécanol	17	2-Butyl 4-(3',5'-benzo-dioxy)-acétate
8	1,7Octadiene2,7diméthyl 3,6 bis (méthylène)	18	6-(3',5'-Benzo-dioxy)-3,3-diméthyl-1-hexène
9	1-Undécanol	19	Chalepensin
10	2-Dodécanone (forme branchée)	20	Clausindin

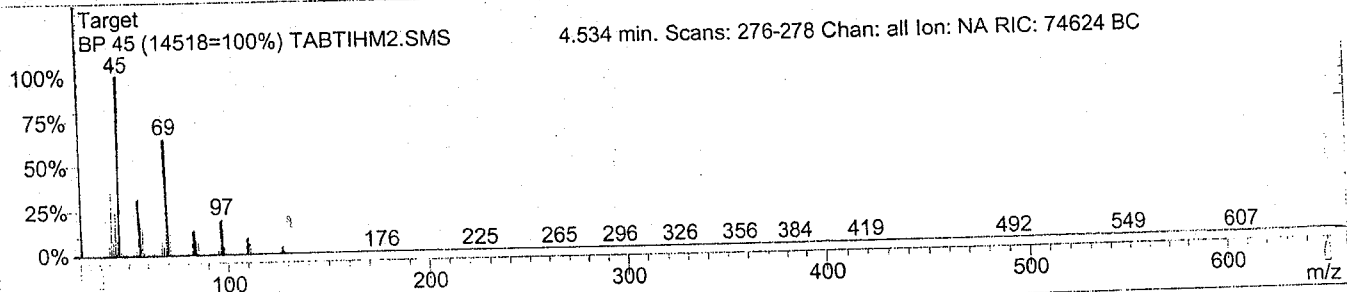
Target Spectrum



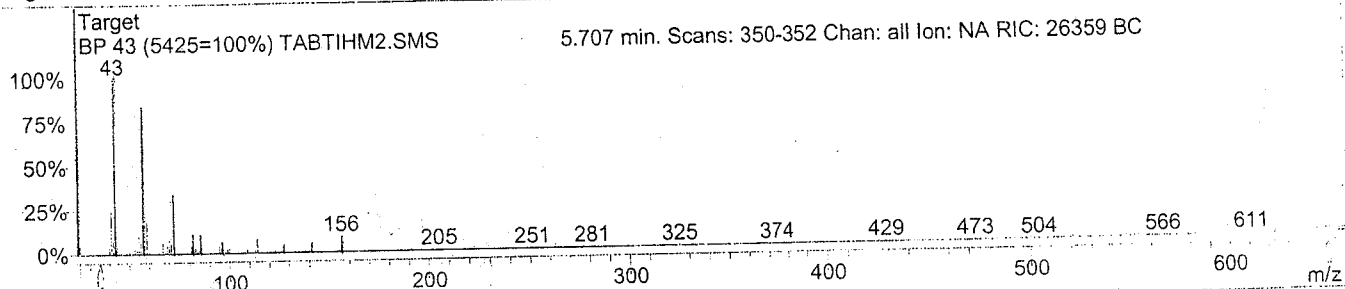
Composé 1



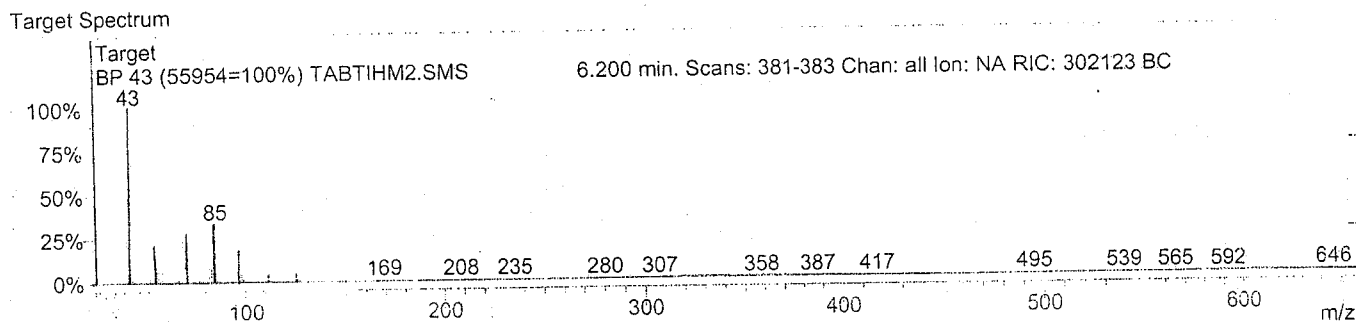
Composé 2



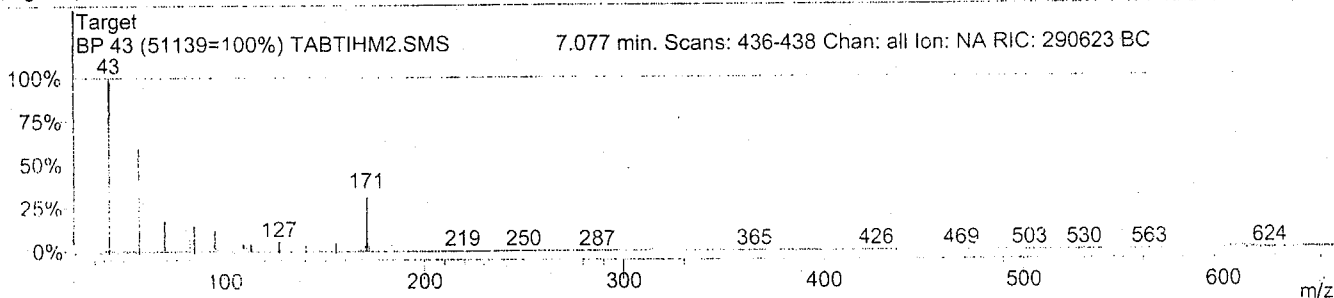
Composé 3



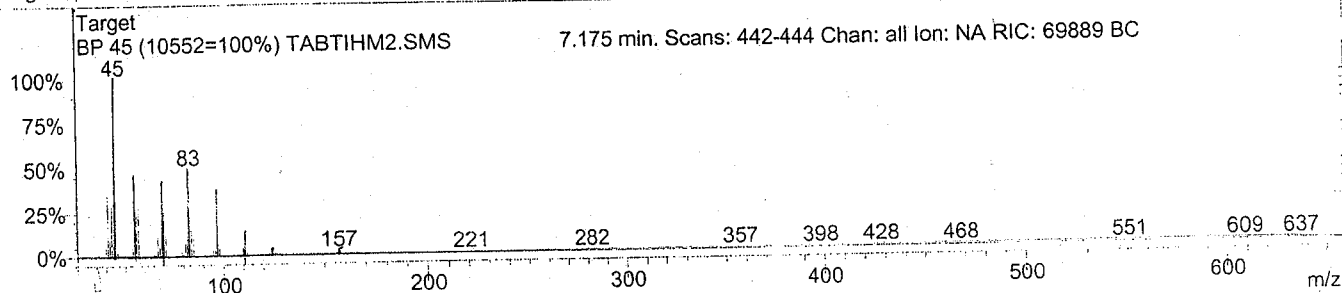
Composé 4



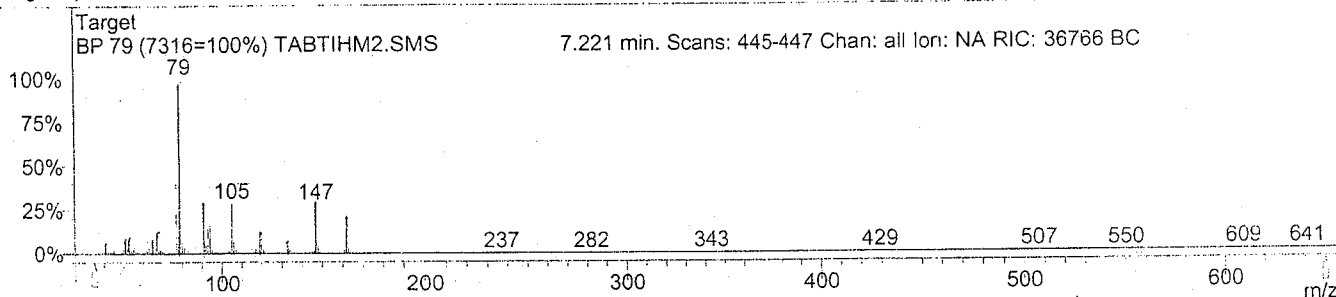
Composé 5



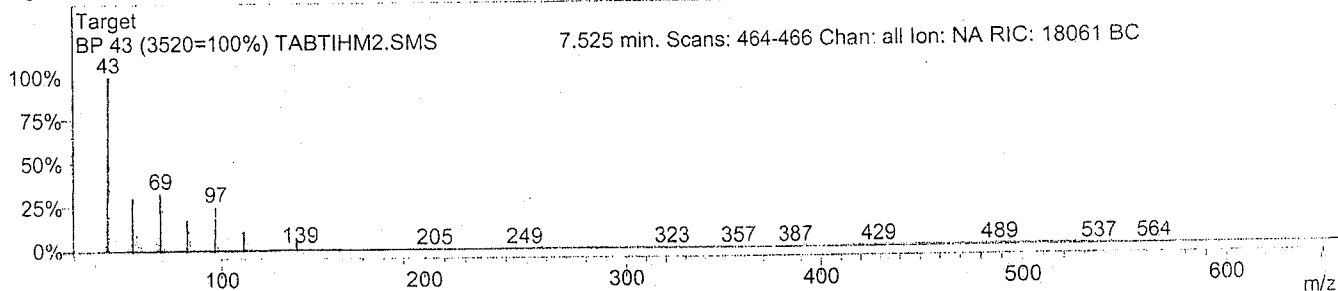
Composé 6



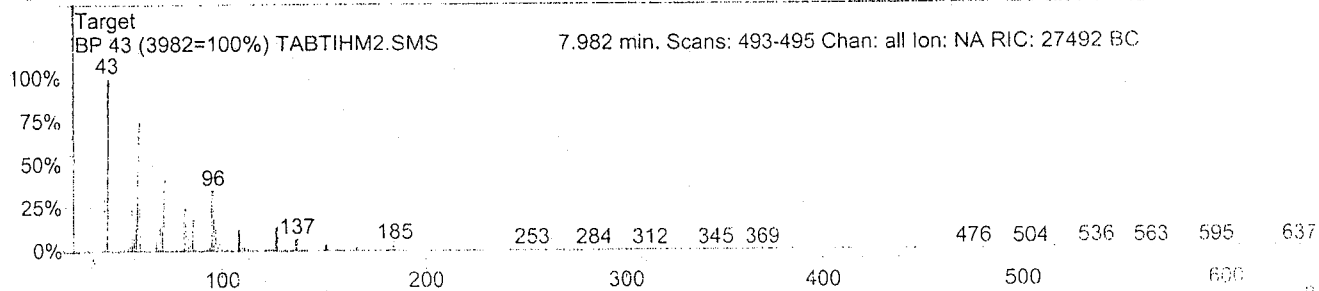
Composé 7



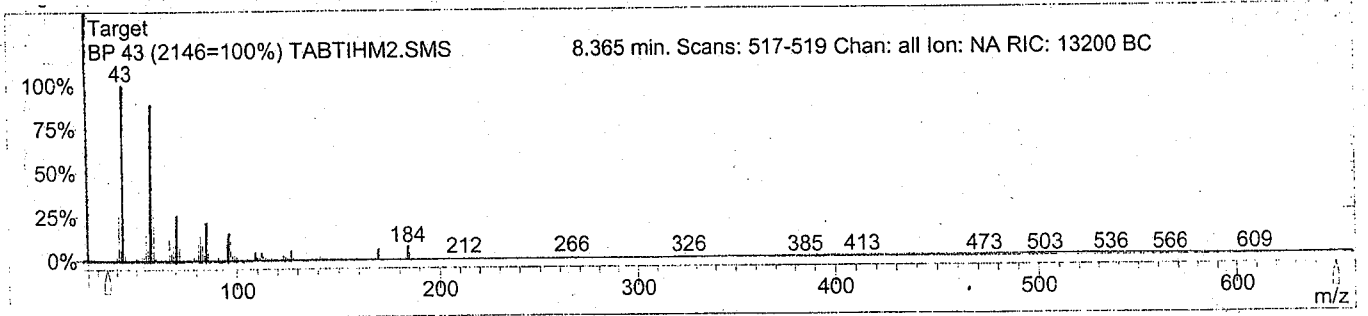
Composé 8



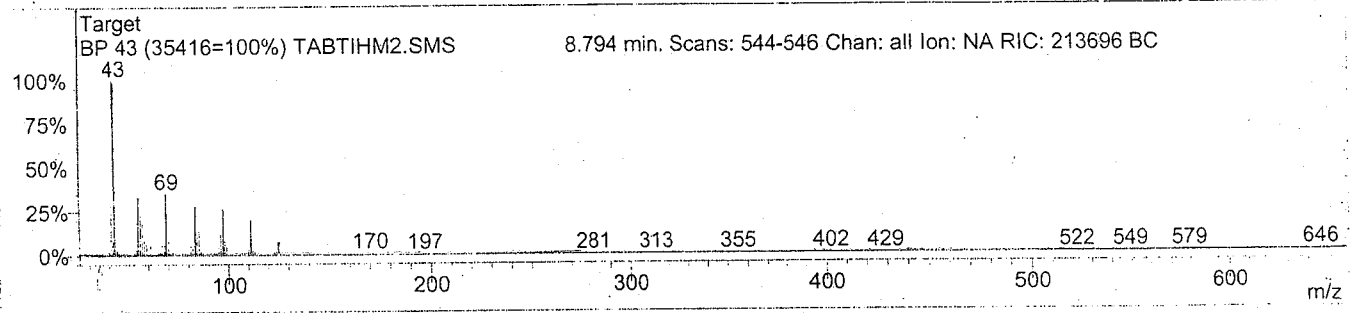
Composé 9



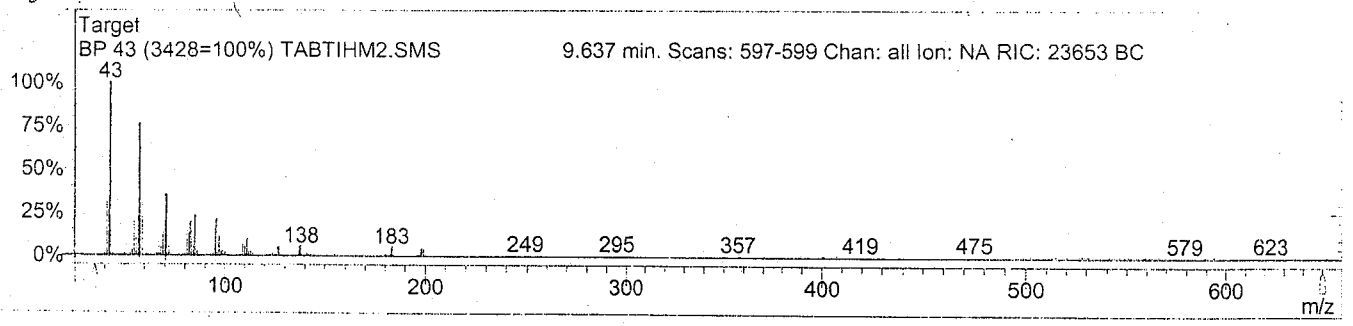
Composé 10



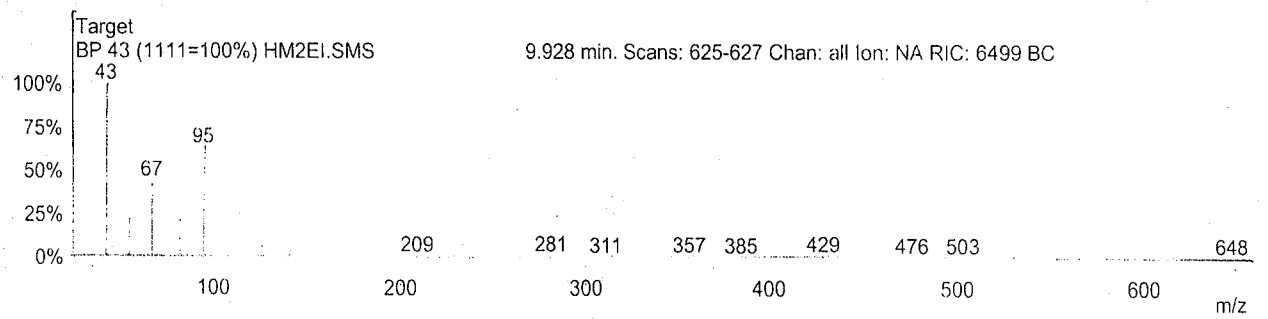
Composé 11



Composé 12

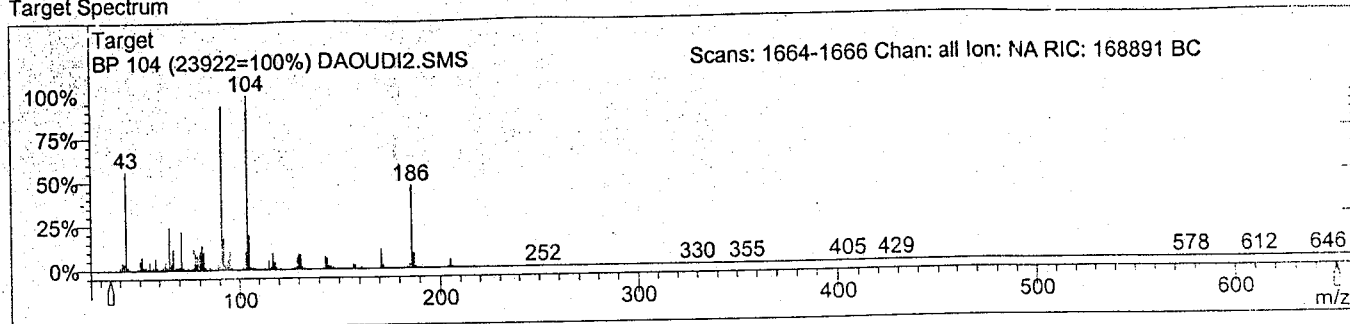


Composé 13

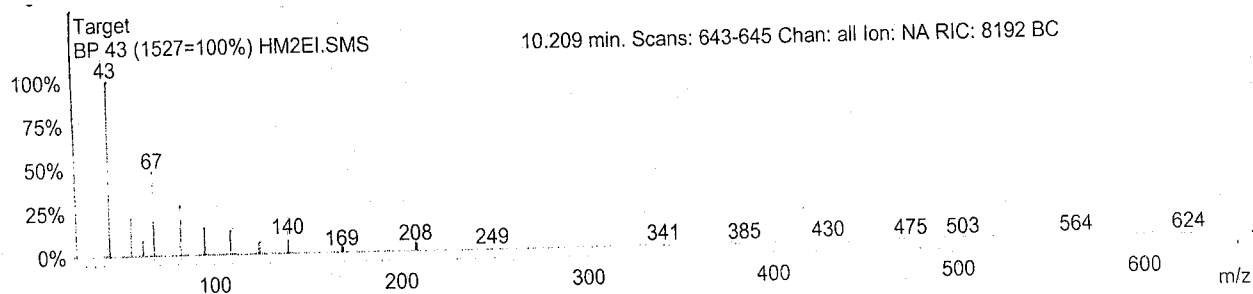


Composé 14

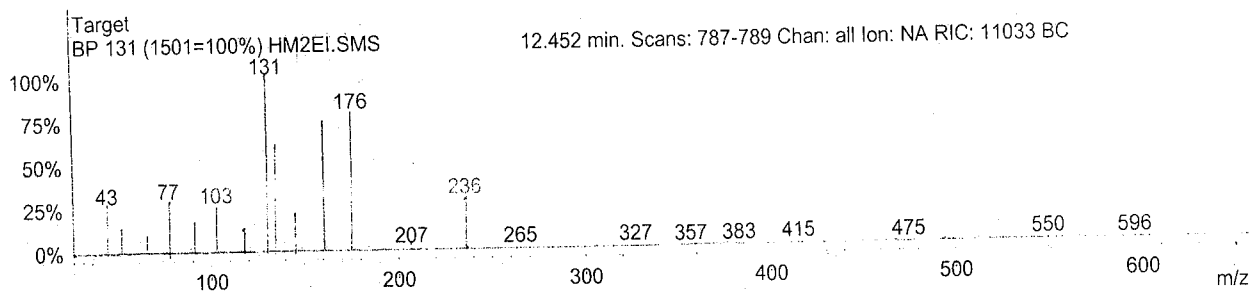
Target Spectrum



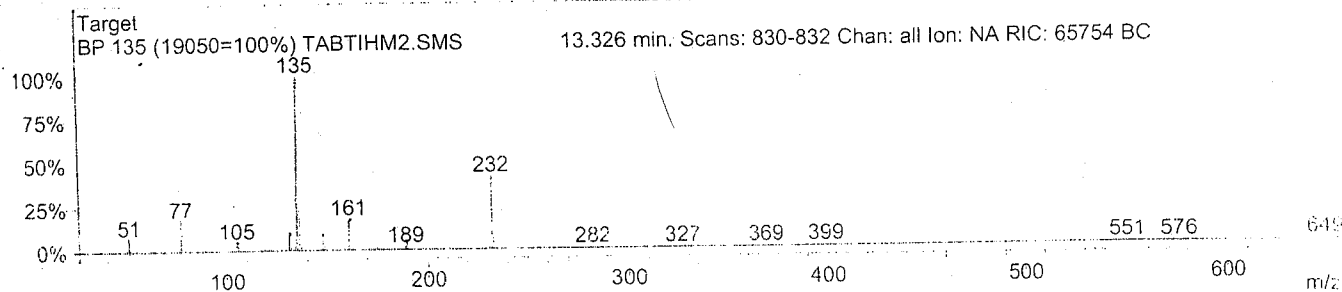
Composé 15



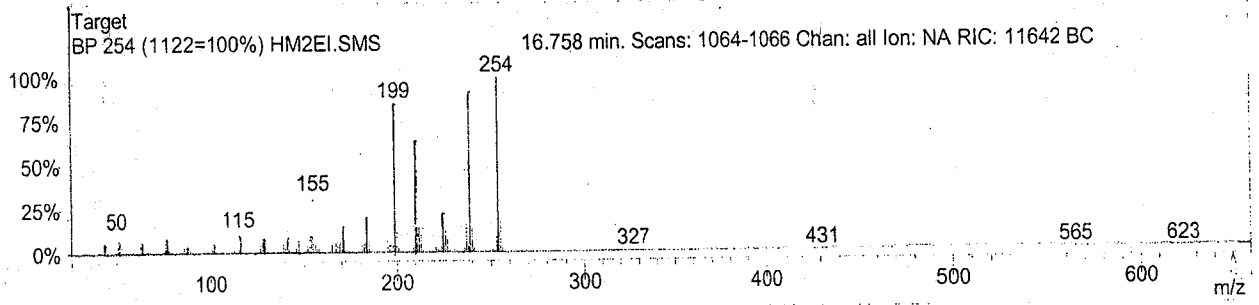
Composé 16



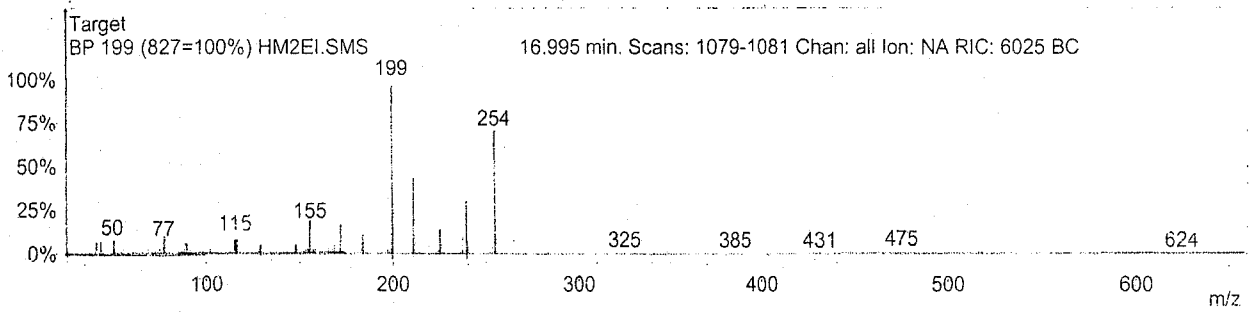
Composé 17



Composé 18



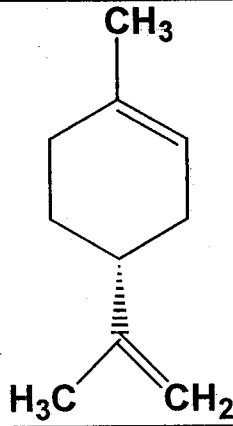
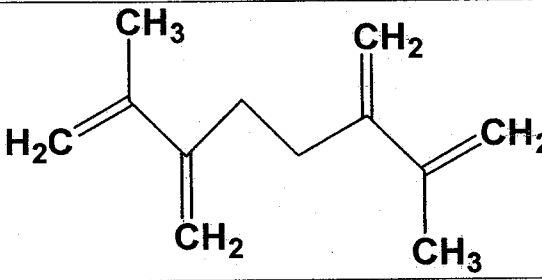
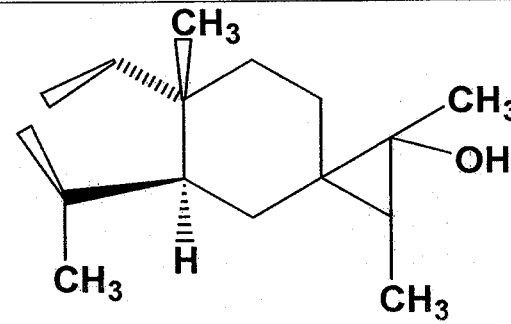
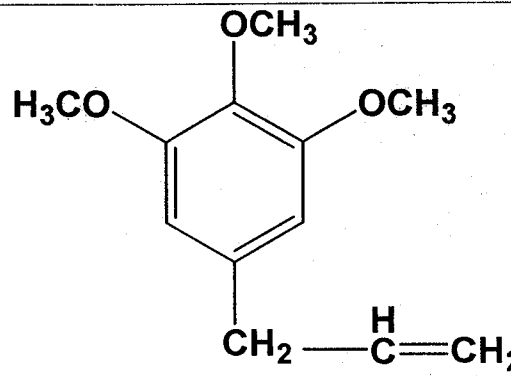
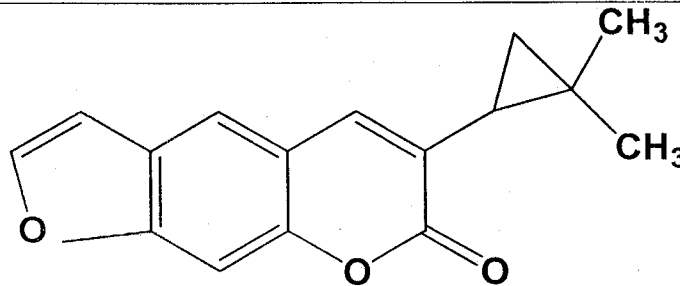
Composé 19



Composé 20

Annexe F

Structures de quelques molécules identifiées dans l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L.

Limonène	
1,7-Octadiène-2,7-diméthyl-3,6-bis(méthylène)	
Elémol	
Elémicine	
Clausidine	

***Communications
et publication***

1. S. MERGHACHE, M. GRIGNON DUBOIS

Phytochemical study of *Globularia alypum* L., Symposium International "chimie verte", Poitiers, 19-23 Mai (2003).

2. S. MERGHACHE, M. GRIGNON DUBOIS, B. TABTI, M. BENDEHOU, C. SELLES

Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale *Globularia Alypum*, 3^{ème} Colloque International sur la chimie hétérocyclique, Tlemcen, 5-7 Mai (2004).

3. S. MERGHACHE, M. GRIGNON DUBOIS

Medicinal plants from Magreb: Phytochemical study of *Globularia Alypum* L. 1^{er} Congrès Maroco - Espagnol sur la Chimie Organique et 4^{ème} Rencontre Andalou - Marocaine sur la Chimie des Produits Naturels, Marrakech, 16-18 Septembre (2004).

4. S. MERGHACHE, M. HAMZA, B. TABTI, N. DJEBOU, H. ALLALI, M.A. DIB, A. BENDIABDELLAH

Les plantes accumulatrices des métaux, solution écologique pour la décontamination des eaux et des sols, Journées d'informations sur les produits toxiques, Tlemcen, 20 - 21 Mars (2006).

ASIAN JOURNAL OF CHEMISTRY

(An International Bimonthly Research Journal of Chemistry)

11/100, Rajendra Nagar, Sector-3, Sahibabad-201 005 (Ghaziabad) INDIA

Email: ajchem@rediffmail.com

Editor-in-Chief

Prof. R. K. AGARWAL

Ph.D., D.Sc.

Circulation/Database Manager

Mrs. Anjul Agarwal

Dated: 14th September 2007

Dr. S. Merghache

Department of Chemistry

Faculty of Sciences.

Laboratory of Organic Chemistry,

Natural Substances and Analysis,

University of Tlemcen,

P.O. Box 119, Tlemcen 13000,

Algeria

Dear Dr. S. Merghache,

We are pleased to inform you that your research manuscript No. 6976/2007, entitled "*Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Ruta chalepensis L. Essential Oil from Algeria*" has been accepted for publication in Asian Journal of Chemistry. The paper will appear in Volume 20 (2008) issue of Asian Journal of Chemistry. Here, we are enclosing an invoice bill No. 949 dated 14th September 2007 of US \$ 315=00 (US Dollars Three Hundred and Fifteen Only) towards the Printing/Publication and Membership charges.

So, we request you to please remit the payment at your earliest as possible of our bill in favour of Asian Journal of Chemistry. Your early response will be highly appreciated.

Thanks

Sincerely Yours



Dr. Himanshu Agarwal

Executive Editor

Asian Journal of Chemistry

Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Ruta chalepensis* L. Essential Oil from Algeria

S. MERGHACHE*, M. HAMZA, M. BENDAHOUST† and B. TABTI

Department of Chemistry, Laboratory of Organic Chemistry, Natural Substances and Analysis, University of Tlemcen, P.O. Box 119, Tlemcen 13000, Algeria
Fax: (43)(21)5886; E-mail: merghach_s@yahoo.fr

Water distilled essential oil from aerial parts of *Ruta chalepensis* L. was analyzed by GC and GC/MS. 20 Compounds were identified representing 93.99-98.58 % of the oil. 2-Undecanone (79.06-82.74 %) was the major component, followed by 2-decanone (3.53 - 4.38 %). Variations in essential oil composition, physicochemical properties and yields was studied according to state of material used (fresh or dry) and years of collection of the plant. The essential oil of aerial parts was tested for its antimicrobial activity by paper disc diffusion method. The oil was inactive on the inactivation of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma* Sp. and *Cladonia* Sp. In contrast the essential oil demonstrated significantly antifungal activities (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria* Sp, *Trichoderma* Sp. and *Cladonia* Sp.).

Key Words: *Ruta chalepensis*, Rutaceae, Essential oil composition, 2-Undecanone, Antimicrobial activity.

INTRODUCTION

Natural products contribute in great extent to the fight against pathogenic microorganisms. Several plants or parts of them are used in food as spices and are thought to display some therapeutic activity or to provide a natural conservation by inhibiting the microbial growth.

The antimicrobial activity is another widely studied feature of essential oils. Recently, many studies on plants revealed antibacterial and anti-inflammatory activity and therefore, have been made in order to understand their antimicrobial properties²⁻⁴.

Rutaceae constitutes a systemically difficult taxon that is widely distributed and consists of ca. 160 genera and over 1600 species⁵⁻⁷.

†Department of Biology, Faculty of Sciences, Laboratory of Organic Chemistry, Natural Substances and Analysis, University of Tlemcen, P.O. Box 119, Tlemcen 13000, Algeria.

Ruta chalepensis L., locally known as Fidjel is indigenous to the Mediterranean. It is a small shrub measuring between 0.5 and 1m in height that grows naturally. It is a member of the rutaceae family. It is an aromatic plant, widely diffused in the Mediterranean area⁸. It grows well at the cool climates of higher altitudes but can also be grown in plains. It prefers a well-drained, calcareous clayey soil⁹. In Algeria the plant is often cultivated in gardens.

Ruta chalepensis L. is an ancient medicinal plant still used in the traditional medicine of many countries as a laxative, antiinflammatory, antispasmodic, abortifacient and for dermatopathy treatment¹⁰.

Pharmacological investigations clearly indicated that the ethanolic extract of the aerial part of *Ruta chalepensis* shares the antiinflammatory and antipyretic activities¹¹.

Phytochemical screening showed that the aerial part of *Ruta chalepensis* yielded coumarins (chalepensis, chalepin, rutamarin) as well as alkaloids (kokusaginine, skimmianine, arborinine)^{12,13}.

The literature reports some works on the composition of *Ruta chalepensis* oil from Argentine, Saudi Arabia, Turkey, Italy, Greece, Iran and India¹⁴⁻²¹.

To our knowledge, there is no information on the chemical composition of *Ruta chalepensis* oil from Algeria and there is no previous study on the antimicrobial activity of *Ruta chalepensis* using a paper disc diffusion method.

The aim of this paper is to perform a qualitative and semi quantitative analysis of the essential oil of this rutaceae specie growing in the north west of Algeria, to compare their chemical composition according to state of plant material (fresh or dry) and year of cultivation and we elucidate its antimicrobial effect (bacterial and antifungal effects).

EXPERIMENTAL

The aerial part of *Ruta chalepensis* were collected in April 2004 and 2005 from the Azizian mountains, Tlemcen in northern Algeria. A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the Laboratory of Botany, Department of Biology, Tlemcen University, Tlemcen, Algeria.

A part of the plants material, were extended by ground, in one layer, in an open room protected from the sun. During drying time, plants were turned over to allow homogeneous drying.

Essential oil isolation: Aerial part fresh or dried at room temperature for two weeks, were hydrodistilled for 5 h, using Clevenger type apparatus. The oils were dried over anhydrous sodium sulphate and stored at low temperature prior to analysis. The oils obtained were yellow, with a strong deterrent odour.

Physicochemical analysis: The physicochemical properties of the oils were determined according to AFNOR standards²².

Chemical analysis: Identification of volatile compounds was performed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Analytical GC: GC analyses were carried out using two GC apparatus:

Semi quantitative analysis: The component relative percentages in each essential oil were calculated from GC peak areas, using a Shimadzu-GC 17A gas chromatograph, under the following operating conditions: vector gas, N₂ (1.8 mL/min); injector and detector (FID) temperatures, 270 °C; DB35-MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness); temperature program 60-220 °C at 5 °C/min and 220 °C for 10 min.

Qualitative analysis: GC analyses were carried out using a DB521 gas chromatograph with DB5-MS capillary column (50 m × 0.32 mm × 0.25 µm film thickness). Oven temperature was programmed from 60 to 228 °C at 4 °C/min with initial hold of 5 min. Injector and detector (FID) temperatures were maintained at 230 and 235 °C, respectively. Nitrogen was used as carrier gas (1.2 mL/min).

The retention indices (RI) were calculated for volatile constituents using an *n*-alkanes homologous series (C₆-C₂₀) at the same GC conditions.

GC-MS analyses: The essential oils were analyzed by GC/MS using a Varian CP 3800/Varian Saturn 2000 with DB5-MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness). Oven temperature was programmed from 80 to 300 °C at 10 °C/min with initial and final hold of 1 min and 30 min, respectively. Injector temperature was maintained at 220 °C. Helium was used as carrier gas (1.2 mL/min) with a split ratio of 1/50 and the MS were taken at 70 eV. Mass spectral data were analyzed by Nist 98r.lbr, Mainlib and Replib libraries search.

Component identification was based on a comparison of retention indices and mass spectra with those of authentic sample and with literature data^{18,23-29}. Others identifications were made by comparison of mass spectra with those in the data system libraries (Nist 98r.lbr, Mainlib and Replib).

Microbial strains, inoculation and media

Bacteria: The strains were obtained from IPP (Institut de Pasteur de Paris). It concerns two Gram-negative: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and two Gram-positive: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Listeria monocytogens* (ATCC 19115).

Yeasts: One strains of *Candida albicans* was used throughout this study (Ca 444). It was obtained from IPP.

Fungi: The four tested strains have been isolated and purified at the laboratory of microbiology, Department of Biology, Tlemcen University: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* Sp and *Trichoderma* Sp.

Preparation of the inoculum

Bacteria: The strains preserved in nutrient agar at 4 °C, were revived in nutrient solution and incubated at 37 ± 1 °C during 18 to 24 h. 0.1 mL of each culture was added to 10 mL BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Pronadisa Hispanalab, S.A.).

Yeasts: The strains preserved at 4 °C in the Sabouraud agar supplemented with chloramphenicol, were revived in nutrient solution and incubated at 30 ± 1 °C during 24 to 48 h. 0.1 mL of each culture was added to 10 mL sterile physiological water.

Fungi: The inoculum was presented in the form of spores' suspension in sterile physiological water at 0.1 % of Tween 80³⁰.

The inoculum used for all the assays reached the microbial density of the order of 10^6 to 10^7 UFC.mL⁻¹ for the bacteria and yeasts and 10^7 to 10^9 spores.mL⁻¹ for the moulds.

Culture media: Muller Hinton for the bacteria. Sabouraud + Dextrose Agar + chloramphenicol for the yeasts. Sabouraud + Dextrose Agar for the moulds (Pronadisa Hispanalab, S.A.).

Antimicrobial assay: The paper disc diffusion method was used to test the microbial activity.

Paper disc diffusion: The agar plate containing the appropriate medium was spread with the inoculum previously adjusted to the microbial densities cited above. Several discs (6 mm diameter) have been impregnated with 10 mL of essential oil. After incubation (18 to 24 h at 37 ± 1 °C for the bacteria, 24 to 48 h at 30 ± 1 °C for the yeasts and 10 to 12 h at 25 ± 1 °C for the moulds) the diameter of inhibition zones were measured with a calliper.

The antibiotics Gentamicine (100 UI/disc) and piperacillin (100 µg/disc) served as positive control for the bacteria. For the yeasts and moulds, we used amphotericine (100 µg/disc) and econazole (50 µg/disc).

When the inhibitory zone diameter is lower or equal to 6 mm, the sample was considered as not active.

RESULTS AND DISCUSSION

The yields and physicochemical properties of essential oils of aerial parts of *Ruta chalepensis* were presented in Table-1. Comparing the essential oils of the fresh and dry material (April 2004), no big difference was found. The decline is certainly due to the evaporation of the volatile compounds during drying times (2 weeks). These results suggest that we can consider the effective time of drying two weeks corresponding to 16.67 % water content.

A significant effect on yields was observed when the essential oil was obtained from the aerial part of plants collected in April 2004 and from the aerial part of plants collected in April 2005. The local climatic conditions

TABLE-2
CHEMICAL COMPOSITION OF AERIAL PART ESSENTIAL OILS OF *Ruta chalepensis*

Compounds ^a	M _w ^b	RI ^c	RI ^{lit}	April 2004		April 2005		I.M. ^d
				Fresh matter	Dry matter	Dry matter	Dry matter	
Limonene	136	1030	1031	0.05	0.09	0.06	0.06	MS, RI
2-Nonanone	142	1086	1083	0.34	0.57	0.26	0.26	MS, RI
2-Nonanol	144	1097	1099	0.32	0.71	0.16	0.16	MS, RI
2-Decanone	156	1192	1194	3.53	4.38	3.67	3.67	MS, RI
1-Decanol	158	1272	1273	0.05	0.03	0.05	0.05	MS, RI
2-Decanone	172	1297	1297	80.11	79.06	82.74	82.74	MS, RI
2-Undecanol	172	1305	1308	2.68	1.18	0.31	0.31	MS, RI
1,7-Octadiene-2,7-dimethyl-3,6-bis(methylene) ^e	162	1311	-	tr	tr	0.93	0.93	MS
1-Undecanol	172	1367	1367	0.76	0.42	0.15	0.15	MS, RI
2-Dodecanone ^f	184	1488	1488	0.69	0.50	0.54	0.54	MS, RI
2-Dodecanone	184	1490	1488	1.76	1.78	2.11	2.11	MS, RI
1-Dodecanol	186	1553	1556	0.11	0.04	0.12	0.12	MS, RI
Unknown ^g	208	1700	1700	0.13	0.10	0.16	0.16	MS, RI
2-Tridecanone	198	1491	1488	0.99	1.42	1.30	1.30	MS, RI
E-11, 13-dimethyl-12-tetradecen-1-ol acetate ^e	282	1525	-	0.03	0.58	0.37	0.37	MS
Elemol	222	1553	-	0.02	0.43	0.33	0.33	MS, RI
Elemicin	208	1565	-	0.35	0.69	0.19	0.19	MS
2-Butyl 4-(3',5'-benzo-dioxyl)-acetate ^b	236	1700	-	1.39	2.19	tr	tr	MS
6-(3',5'-Benzo-dioxyl)-3,3-dimethyl-1-hexene ^b	232	1753	-	-	2.81	tr	tr	MS
Chalepensiin ^h	254	1890	-	-	tr	0.29	0.29	MS
Clausindin ^h	254	1898	-	0.61	0.93	0.41	0.41	MS
Identified compound (%)				98.58	97.81	93.99	93.99	

^aCompounds are listed in order of their elution from DB5 column. ^bMolecular weight (mole). ^cRetention indices are determined on DB5-MS column using the homologous series of *n*-alkanes. ^dMethods of identification: MS, RI, IR, GC-MS. ^eIdentified compounds based on mass spectrum. ^fComputer mass libraries; RI, by comparison of RI with those from the literature; RI^{lit}, tentative identification based on mass spectrum. ^gBranched form. ^hUnknown (RI = 1470): 284(2), 251(1), 225(1), 211(2), 193(2), 178(4), 160(24), 120(4), 105(90), 91(100), 43(48). ⁱTentative identification based on mass spectrum and literature. ^jtr: Trace (<0.01 %).

octyl acetate (44.0 %) and β -phellandrine (10.7 %) were the main components¹⁸.

In conclusion, the chemical composition of the analyzed essential oils showed quantitative variation by the influence of state of plant (fresh or dry) and local climate conditions of years of collection.

It is known that natural products can contribute to the fight against pathogenic micro organisms. *Ruta chalepensis* is used in traditional medicine of many countries, in particular antiinflammatory and antispasmodic activities. For evaluation of the antimicrobial activity of the essential oil from the aerial part of plant, 8 strains of micro organisms were studied in this assay. Table -3 summarizes the antimicrobial activities on various terms. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogens* were resistant and do not show any activity.

TABLE-3
in vitro ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AERIAL
PART ESSENTIAL OIL OF *Ruta chalepensis*

Tested strains	Diameter of inhibition zone (mm)				
	E.O	Gentamicine	Piperazone	Amphotericine	Econazole
Bacteria:	—	—	—	—	—
<i>E. coli</i>	n.a	22	13	—	—
<i>P. aeruginosa</i>	n.a	14	—	—	—
<i>S. aureus</i>	n.a	22	—	—	—
<i>L. monocytogens</i>	n.a	20	n.a	—	—
Yeast:	—	—	—	—	—
<i>C. albicans</i>	12	—	—	15	14
Fungi:	—	—	—	—	—
<i>A. flavus</i>	21	—	—	n.a	20
<i>A. niger</i>	—	—	—	n.a	35
<i>Alternaria</i> Sp.	21	—	—	n.a	39
<i>Trichoderma</i> Sp.	20	—	—	n.a	42

E.O. Essential oil (10 μ L/disc) of aerial part of *Ruta chalepensis* which was collected in April 2005; n.a.: not active.

The fungus *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria* Sp and *Trichoderma* Sp. were insensitive to the amphotericine. In accordance with previous antifungal properties of essential oils and as show in Table-3, the essential oil of plant demonstrated significantly antifungal activities. The essential oil was more active against *Aspergillus niger* than *Aspergillus flavus*, *Alternaria* Sp and *Trichoderma* Sp, with inhibitory zones 22, 21, 21 and 20 mm, respectively. On the other hand, the yeast *Candida albicans* showed a lower inhibition with the inhibitory zones of 12 mm.

The results presented here for the antimicrobial activity study demonstrate the antifungal activity of *Ruta chalepensis* L. and support the use of this plant in traditional medicine.

REFERENCES

1. S.G. Deans, in eds.: H.F. Linsken and J.F. Jackson, Modern Evaluation of Antimicrobial Activity of Essential (Volatile) Oils. Modern Methods of Plant Analysis, Essential Oils and Waxes, Heidelberg, Springer-Verlag, Vol. 12, p. 209 (1991).
2. I.S. Chen, H.F. Chen, Y.L. Cheng, C.M. Teng and I. Tsutomu, *J. Nat. Prod.*, **64**, 1143 (2001).
3. C.S. Vairappan, M. Suzuki, T. Abe and M. Masuda, *Phytochemistry*, **58**, 517(2001).
4. M. Resch, J. Heilmann, A. Steigel and R. Bauer, *Planta Med.*, **67**, 437 (2001).
5. J.F. Macbride, *Field Mus. Nat. Hist., Bot. Ser.*, **13**, 655 (1949).
6. Rutaceae: from Wikipedia, The Free Encyclopedia. H:\ Rutaceae-wikipedia-encyclopedia.htm, (2007).
7. NT. WS. Beniston, *Fleurs d'Algérie*. Entreprise nationale du livre, Alger, p. 1 (1984).
8. Anonymous, CSIR, New Delhi, Raw Material, Vol. 9, p. 94 (1972).
9. L.D. Kapoor, CRC Hand Book of Ayurvedic Medicinal Plants, p. 292 (1990).
10. T. Johnson, *Ethnobotany Desk Reference*, CRC Press Boca Raton, Florida, New York, Washington, D.C., USA, p. 730 (1999).
11. S.M. Al-Said, M.A. Tariq, M.A. Al-Yahya, S. Rafatullah, T. Ginnawi and A.M. Ageel, *J. Ethnopharmacol.*, **28**, 305(1990).
12. A. Ulubelen, B. Terem, E. Tuzlaci, F.K. Cheng and M. Korkmaz, *Phytochemistry*, **25**, 2692 (1986).
13. N. Mohr, H. Budzikiewicz, B.A.H. El-Tawil and F.K.A. El-Beih, *Phytochemistry*, **7**, 1838 (1982).
14. R.P.A. Inigo, M.E.L. Be Viana, C.A.N. Catalan and A. De Iglesias, *Essenze Deriv. Agrum.*, **51**, 349 (1981).
15. A.O. Baghlaf, S.K.A. El-Beih and A.H. El-Tawil, *Hung.*, **22**, 39 (1983).
16. K.H.T. Baser, T. Özek and S.H. Özalp, *J. Essent. Oil Res.*, **8**, 413 (1996).
17. A. Verzera, L. Mondello, S. Ragusa and A. Dugo, *Essenze Derivati Agrumari*, **70**, 207 (2000).
18. O. Tzakou and M. Cholidis, *J. Essent. Oil Res.*, **13**, 258 (2001).
19. A. Rustaiyan, M. Khoshdeli, F. Sultani-Lotfabadi, M. Yari, S. Masoudi and A. Monfared, *J. Essent. Oil Res.*, **14**, 233 (2002).
20. G.D. Bagchi, S. Mandal, A.A. Naqvi and S. Kumar, *Indian Perfumer*, **47**, 1, 39 (2003).
21. G.D. Bagchi, P.D. Dwivedi, Singh, F. Haider and A.A. Naqvi, *J. Essent. Oil Res.*, **15**, 63 (2003).
22. AFNOR (Association Française de Normalisation), *Recueil des normes françaises sur les huiles essentielles*, 2ème Edition, Paris (1992).
23. R. Congianni, F. Chierri, B. Marongiu, A. Piras and S. Porcedda, *Flavour Fragr. J.*, **17**, 239 (2002).
24. R.P. Adams, Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography Mass Spectrometry, Allured, Carol Stream, USA (2001).
25. L.P. Van Stee, J. Williams, J. Beens, M. Adahchour, R.J.J. Vreuls, U.A. Th. B. J. van der Grinten and J. Lelieveld, *Atoms Chem. Phys. Discuss.*, **3**, 1139 (2003).
26. R.P. Limberger, C.A. Simoes-Pires, M. Sobral, C. Menu, J.M. Bessiere and A.T. Henriques, *Flavour Fragr. J.*, **17**, 341 (2002).
27. S. Wu, H. Zorn, U. Krings and R.G. Berger, *Flavour Fragr. J.*, **22**, 53 (2007).
28. E.S. Elena, R. Acosta and J.R. Martinez, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **43**, 379 (2000).
29. T.S. Wu, L.S. Shi, J.J. Wang, S.C. Iou, H.C. Chang, Y.P. Chen, Y.H. Kuo, Y.L. Chang and C.M. Teng, *J. Chin. Chem. Soc.*, **50**, 171 (2003).
30. Tentaoui-Elaraki, A.A. Errifi, B. Bendjillali and N. Lallaoui, *Rivista Ital. EPPOS*, **6**, 20 (1992).

(Received: _____)

; Accepted: _____)

AJC