

Université de SAAD DAHLAB de Blida

Faculté des sciences de l'ingénieur

Mémoire de Master

en chimie industrielle

Spécialité : Matériaux et Produits Organiques Industriels

Thème :

**EXTRACTION ET ETUDE DE L'ACTIVITE  
ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE  
ESSENTIELLE & DES FLAVONOIDES DE  
*L'Artemisia campestris L.* DES HAUTS  
PLATEAUX ALGERIENS**

Par

IBELAIDEN Hassiba

Encadré par :

Dr K. BOUTEMAK

Pr M. BEZZINA

Blida octobre 2011

## الملخص

في إطار تقييم الأنواع النباتية الجزائرية ، أجرينا دراسة عن هذه الدراسة على واحدة من أكثر الأعشاب الطبية استعمالا من قبل سكان المغرب العربي الكبير الا و هي الارتميزيا كمباستريسي " الشح البستاني" المعروفة باسم "الدققت" للهبصاب العليا و التي تنتمي لعائلة Compositae.

عملية المختارة لاستخراج الزيت العطري هو التقطير بالبخار. أظهرت دراسة لبعض المعلمات التي تؤثر على محصول الزيت العطري من هذا النبات أن الورقة هي الهيئة التي تعطي أفضل مردود (م=2,3) (%).

تحديد التركيب الكيميائي للزيت أساسي من *L. campestris* الأرطماسيا التي يؤديها MS / GC

تركيب المركبات الأغلبية هي: Germacrène- D: 5(6H)-Benzocyclooctènone,7-8-dihydro-8,8-, diméthyl T-Muurolol Lavanduyl acétate1-oxaspiro[2,5]oct-5-ène,8,8-dimethyl-4-méthylène

وتم أيضا تنفيذ استخراج الفلافونويد في بيوتانول ن و خلات الإيثيل ومن ثم تحليلها من قبل

TLC. التي بينت ان هذه اتنبتة تحتوى على العديد منها,

وكشفت الاختبارات المضادة للبكتيريا للزيت أساسي و مستخلص الفلافونويد هذا النبات يملك

فعالية على بعض سلالات (القولونية، المكورات العنقودية، والأمعائية المريحة *Klebssiella*

الرئوية) ومدا قوة هذه الفعالية مرتبطة بنوع السلالة

## RESUME

Dans le cadre de la valorisation de l'espèce végétale Algériennes, nous avons réalisé cette étude sur l'une des plantes médicinales les plus utilisées par la population du grand Maghreb, c'est l'*Artemisia campestris* L. des hauts plateaux Algériens qui appartient à la famille des Composées.

Le procédé choisi pour l'extraction de l'huile essentielle est l'hydrodistillation. L'étude de certains paramètres influençant le rendement en huile essentielle de cette plante a montré que les feuilles est l'organe le plus riche en huile essentielle ; il donne le meilleur rendement( R=2,3%).

La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* réalisée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CG/SM a montré que les composés majoritaires sont :

5(6H)-Benzocyclooctènone,7-8-dihydro-8,8-diméthyl , Germacrène- D, T-Muurolol , 1-oxaspiro[2,5]oct-5-ène,8,8-diméthyl-4-méthylène

Nous avons aussi procédé à l'extraction des flavonoïdes par le n-butanol et l'acétate d'éthyle puis à leur analyse par CCM qui a révélée l'existence de plusieurs types de flavonoides tel que les flavones.

Les tests antibactériens de l'huile essentielle des parties aériennes et les extraits flavoniques de cette plante sur quelques souches (*Escherichia coli*, *staphylococcus aureus*, *Klebssiella pneumoniae* et *Enterobacter aerogenes*) a révélé l'existence d'un pouvoir inhibiteurs de ces substances plus ou moins considérables.

## ABSTRACT

As part of the valuation of the Algerian plant species, we conducted a study on the medicinal plants used by most of the large North African population is the *Artemisia campestris* Highlands Algerians belonging to the Compositae family.

Areal parts of *Artemisia campestris* L. were analysed for their volatile components. The volatile fraction was isolated by hydrodistillation and analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC/SM). The study of some parameters influencing the yield of essential oil of this plant showed that the leaf is the organ that gives the best performance a yield of 2,3% . The main components were:

5(6H)-Benzocyclooctenone, 7-8-dihydro-8,8-dimethyl , Germacrene- D, T-Muurolol , 1-oxaspiro[2,5]oct-5-ene, 8,8-dimethyl-4-methylene.

We also performed the extraction of flavonoids in the butanol and ethyl acetate and then analyzing them by TLC. The results showed that the *Artemisia campestris* contains flavonoides .

The antibacterial tests of the essential oil of aerial parts and extracts of this plant flavone on some strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae*) revealed the existence of an inhibitory power of these substances more or less considerable.

# ***DEDICACES***

## **À la mémoire de mon très cher PAPA**

**JE DÉDIE AUSSI CE TRAVAIL À :**

**MON TRÈS CHER ÉPOUX QUI M'A BEAUCOUP AIDÉ ET SOUTENU,**

**MA TRÈS CHÈRE MAMAN QUE J'AIME ET QUE DIEU LA  
PROTÈGE,**

**TOUTE MA FAMILLE ; SCEURS, FRÈRES ET NEVEUX,**

**TOUTES MES AMIES ET TOUS CEUX QUI M'AIMENT.**

# REMERCIEMENTS

*AVANT TOUT, JE TIENS À REMERCIER DIEU DE M'AVOIR DONNÉ LA CHANCE ET LA FORCE DE RÉALISER CE TRAVAIL.*

*MES CORDIAUX REMERCIEMENTS VONT AUX MEMBRES DU JURY QUI M'HONORENT PAR LEUR PRÉSENCE ET D'AVOIR ACCEPTÉ DE JUGER CE TRAVAIL.*

*J'EXPRIME D'ABORD MES PROFOND REMERCIEMENTS ET MA VIVE RECONNAISSANCE À M<sup>ME</sup> K.BOUTEMAK D'AVOIR ACCEPTÉ DE M'ENCADRER; QU'ELLE TROUVÉ ICI MES SENTIMENTS DE GRATITUDE ET DE DÉFÉRENCE.*

*JE TIENS À REMERCIER ÉGALEMENT MON CO-PROMOTEUR LE PR M.BEZZINA DE M'AVOIR AIDÉ POUR LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL.*

*JE REMERCIE AUSSI M<sup>ELLE</sup> LABGAA FATIMA DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE BLIDA.*

*JE REMERCIE M<sup>R</sup> A.GHARBI MAITRE ASSISTANT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE, DÉPARTEMENT DE MÉDECINE.*

*MES REMERCIEMENTS LES PLUS SINCÈRES VONT À M<sup>ME</sup> S.BELKHIRAT ET M<sup>R</sup> MEKRACHI*

*JE TIENS AUSSI À EXPRIMER MA RECONNAISSANCE POUR TOUS LES ENSEIGNANTS QUI ONT CONTRIBUÉ À MA FORMATION ET TOUS LE PERSONNEL DU DÉPARTEMENT DE CHIMIE INDUSTRIELLE*

*SANS OUBLIER DE REMERCIER, NADJIA, SOUAD, ZAHIRA ,KARIM, TOUTES MES AMIES POUR LES MOMENTS SYMPATHIQUES PASSÉS ENSEMBLE ET TOUS CE QUI ONT CONTRIBUÉ DE PRÈS OU DE LOIN À LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL.*

## TABLE DES MATIERES :

RESUME	1
REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	6
Liste des illustrations, graphiques et tableaux	9
INTRODUCTION	13
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I-GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES ET LES FLAVONOIDES	
I-1-HUILES ESSENTIELLE	15
I-1-1-Définition	15
I-1-2-Localisation des huiles essentielles dans la plante	15
I-1-3-Propriétés physiques	17
I-1-4-Composition chimique	17
I-1-5- Variabilité des huiles essentielles	20
I-1-6-Activité biologique des huiles essentielles	21
I-1-7- Procédés d'extraction des huiles essentielles	23
I-2- LES FLAVONOIDES	
I-2-1-Définition	25
I-2-2-Structure chimique et biosynthèse des flavonoïdes	25
I-2-3-Classification des flavonoïdes	28

I-2-4- Propriétés biologiques des flavonoïdes	30
I-2-5- Autres propriétés des flavonoïdes	31
II-MATIERE VEGETALE :	
II-1-Présentation de la plante <i>Artemisia campestris</i>	32
II-2-Répartition géographique	33
II-3-Usage médicinal de l' <i>Artemisia campestris</i>	34
II-4-Quelques travaux déjà réalisés sur l' <i>Artemisia campestris</i>	35
DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTALE	
III-MATERIELS ET METHODES	
III-1-Extraction de l'huile essentielle :	42
III-2-Mise en évidence et extraction des flavonoïdes	46
III-3- Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et des flavonoïdes de l' <i>Artemisia campestris</i> :	52
IV-RESULTATS ET DISCUSSION	
IV-Extraction de l'huile essentielle de l' <i>Artemisia campestris</i>	59
IV-1-1 Caractérisation de l'huile essentielle	68
IV-1-2 Analyse de l'huile essentielle de l' <i>Artemisia campestris</i> par CG/SM	70
IV-2 Extraction des flavonoïdes	73
IV-2-1 Mise en évidence des flavonoïdes	73
IV-2-2 Extraction des flavonoïdes	74

IV-3 Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et du contenu flavonique	83
CONCLUSION	90
APPENDICES	92
Liste des produits	103

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

### Liste des figures :

<b>Figure I-1</b> : Localisation des structures sécrétrices pour quelques plantes aromatiques	16
<b>Figure I-2</b> : 2-méthylbuta-1,3-diène	17
<b>Figure I- 3</b> : Exemples de composants sesquiterpéniques	19
<b>Figure I-4</b> : Exemples de composants Diterpéniques	19
<b>Figure I-4</b> : Exemple d'un composant triterpénique	20
<b>Figure I-5</b> : Structure de base des flavonoïdes	26
<b>Figure I-7</b> : Schéma simplifié de la biosynthèse de différentes classes des flavonoïdes	27
<b>Figure II-1</b> : Photographies des touffes de l' <i>Artemisia campestris</i> dans la nature	34
<b>Figure III-1</b> : La plante <i>Artemisia campestris</i> L	40
<b>Figure III- 2</b> : Schéma directeur de l'expérimentation	41
<b>Figure III-3</b> : l'appareillage de l'hydrodistillation	42
<b>Figure III-4</b> : Evaporateur rotatif	43
<b>Figure III-5</b> : protocole de l'extraction des flavonoïdes	47
<b>Figure III-6</b> : schéma représentant l'appareillage et le principe de la technique CCM	48
<b>Figure III-7</b> : Aromatogramme sur boîte de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque	53

<b>Figure III-8:</b> Schéma représentant les différentes étapes de la réalisation d'un Aromatogramme	57
<b>Figure IV-1 :</b> Variation du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de l'A.campestris L ; en fonction du temps de l'extraction.	60
<b>Figure IV- 2:</b> évolution du rendement en huile essentielle des feuilles de l'A.campestris en fonction du temps de l'extraction.	61
<b>Figure IV- 3:</b> Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle des tiges de l'Artemisia campestris :	62
<b>Figure IV-4 :</b> Contribution des différents organes à la cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'Artemisia campestris L	63
<b>Figure IV-5 :</b> influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle	64
<b>Figure IV- 6 :</b> Influence de la durée de séchage sur le rendement	66
<b>Figure IV-7:</b> variation du rendement en huile essentielle de l'A.campestris L. en fonction du mode de séchage.	67
<b>Figure IV-8:</b> Huile essentielle de l'armoise champêtre	69
<b>Figure IV-9 :</b> Identification des constituants de l'huile essentielle d'Artemisia campestris L. par CG/SM	72
<b>Figure IV-10 :</b> virage de couleur(mise en évidence des flavonoïdes)	73
<b>Figure IV-11:</b> extrait de l'acétate d'éthyle et de n-butanol	74
<b>Figure IV-12:</b> extraits des contenus flavoniques utilisés pour CCM	75
<b>Figure IV-13 :</b> Plaques de gel de silice après migration et avant la révélation chimique (extraits flavoniques de l'acétate d'éthyle e et de n-butanol).	76
<b>Figure IV-14 :</b> Plaques de gel de silice après migration et après la révélation chimique par l'iode (extraits flavoniques de l'acétate d'éthyle et de n-butanol).	77

- FigureIV-15:** Plaques de polyamide après migration et après la révélation chimique par l'iode (extraits flavoniques de n-butanol et de l'acétate d'éthyle) 78
- Figure IV-16 :** Chromatogramme du contenu flavonique récupéré à partir de l'extrait de n-butanol observé sous UV 80
- Figure IV-17 :** Chromatogramme du contenu flavonique récupéré à partir de l'extrait de l'acétate d'éthyle observé sous UV 81
- FigureIV-18 :** résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de l'*Artemisia campestris*. 83
- Figure IV-19 :** Résultats de l'activité antibactérienne des extraits flavoniques de l'*Artemisia campestris* L. 87

## Liste des tableaux :

<b>Tableau I-1 :</b> Exemples de quelques monterpènes	18
<b>Tableau I-2 :</b> Distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes	29
<b>Tableau III-1 :</b> Préparation du support en CCM	49
<b>Tableau IV-1 :</b> Le rendement en huile essentielle en fonction de la partie de la plante	59
<b>Tableau IV-2 :</b> Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle	68
<b>Tableau IV-3 :</b> Caractéristiques physiques de l'huile essentielle	69
<b>Tableau IV-4 :</b> Caractéristiques chimiques de l'huile essentielle	70
<b>Tableau IV-5 :</b> Constituants majoritaires de l'huile essentielle d' <i>Artemisia campestris</i> L. analysée par GC/MS.	71
<b>Tableau IV-6 :</b> résultats de CCM des extraits flavoniques de butanol et de l'acétate d'éthyle sur gel de silice	77
<b>Tableau IV-7 :</b> résultats de CCM des extraits flavoniques de butanol et de l'acétate d'éthyle sur gel de silice	78
<b>Tableau IV-8 :</b> Résultat de la CCM du contenu flavonique de l'extrait de n-butanol	80
<b>Tableau IV-9 :</b> Résultat de la CCM du contenu flavonique de l'extrait de l'acétate	81
<b>Tableau IV-10 :</b> La relation entre la fluorescence et les flavonoides d'éthyle	82
<b>Tableau IV-11:</b> Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle sur les souches pathogènes	84
<b>Tableau IV-12:</b> Résultats de l'activité antibactérienne des extraits flavoniques sur les souches pathogènes	88

## INTRODUCTION :

Depuis la plus haute antiquité, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition. Les plantes sont dites médicinales lorsqu'un de leurs organes, par exemple la feuille, possède des activités pharmacologiques, pouvant conduire à des emplois thérapeutiques.

D'une plante médicinale on n'utilise presque toujours qu'une partie, un organe plus riche que les autres en principes actifs et parfois de composition chimique différente de celle des autres parties. Frais ou plus souvent desséché, cet organe privilégié est appelé « drogue végétale » ou simplement drogue. La thérapeutique est l'art d'utiliser les médicaments chez l'Homme malade (ou chez les animaux malades) en tenant compte du comportement individuel de chacun. De là dérivent la Phytothérapie : thérapeutique n'utilisant que les plantes ; Aromathérapie : emploi thérapeutique des huiles essentielles ; Gemmothérapie : utilisation des bourgeons végétaux sous forme d'extraits.

Les plantes médicinales sont utilisées tant par des populations qui dépendent encore souvent de ces ressources pour se soigner, que par les herboristes et de nombreux autres thérapeutes en médecine alternative et complémentaire (MAC).

Elles sont également utilisées par la médecine moderne, constamment à la recherche de nouvelles molécules pour le développement de médicaments. En 2000, l'OMS estimait les dépenses mondiales de médicaments à base de plantes à 60 milliards de \$ US.

Les plantes aromatiques sont des plantes qui renferment des principes odorants pouvant être employés en parfumerie, en pâtisserie, en confiserie, en savonnerie et en pharmacie. Depuis des siècles l'homme reconnaît et utilise les vertus médicinales de nombreuses plantes aussi bien pour l'usage humain qu'animal. .

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. On estime que 80 % de la population mondiale dépend directement des plantes médicinales pour ses soins de santé, en partie à cause d'un approvisionnement inadéquat de médicaments allopathiques réservés principalement aux populations des pays occidentaux. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces

nouveaux composés potentiellement intéressants, les Huiles essentielles et les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

Afin de contribuer à une meilleure connaissance de notre patrimoine naturel en PAM, nous allons, dans ce travail, étudier la plante *Artemisia campestris* L. (nom français : armoise champêtre, nom vernaculaire : "Degouft" ou "Chaal", nom arabe utilisé dans les pays orientaux : "Echchih el boustani") qui est une espèce spontanée largement utilisée par les habitants des hauts plateaux algériens en médecine traditionnelle. Connue pour ses propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, et antidiabétiques.

Ainsi, l'objectif de ce travail se résume à l'étude de certains métabolites secondaires (Huile essentielle et flavonoïdes) qui peuvent être à l'origine des vertus thérapeutiques de cette plante.

Pour réaliser cet objectif, nous avons structuré le travail comme suite:

- la première partie est une étude bibliographique dans laquelle, on présentera la matière végétale, son utilisation et les travaux dont elle a fait l'objet et des généralités sur les huiles essentielles et les flavonoïdes .
- La seconde partie est une étude expérimentale et sera consacrée à :
  - ❖ L'extraction de l'huile essentielle des différentes parties de l'*Artemisia campestris* par hydrodistillation et l'étude de certains facteurs affectant son rendement,
  - ❖ La caractérisation physicochimique et organoleptique de cette huile essentielle.
  - ❖ La détermination de la composition chimique de l'huile essentielle de l'*Artemisia.campestris* L. par CG/SM.
  - ❖ L'extraction des flavonoïdes de cette plante et l'analyse des extraits flavoniques par CCM.
  - ❖ L'étude du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et des contenus flavoniques de l'*Artemisia.campestris* L..

A partir de l'interprétation des résultats expérimentaux nous aboutirons à une conclusion générale qui nous permettra d'avoir des perspectives liées à ce travail.

# **Chapitre I : GENERALITES SUR LES HUILES ESSENTIELLES ET LES FLAVONOIDES**

Les plantes sont capables de produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à coté des métabolites primaires, elles accumulent des métabolites secondaires parmi lesquels ; les huiles essentielles et les flavonoïdes qui sont très utilisés par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire.

## **I-1- LES HUILES ESSENTIELLES :**

### **I-1-1-Définition:**

D'après AFNOR ce sont des produits obtenus soit à partir de matière première naturelle par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques.[1]

### **I-1-2-Localisation des huiles essentielles dans la plante :**

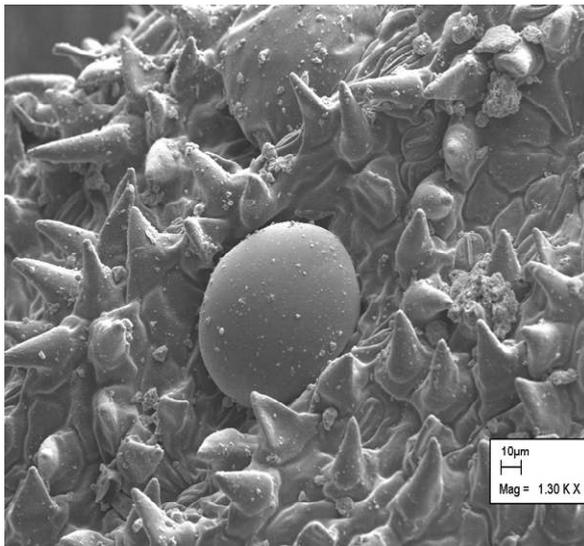
Les huiles essentielles dans les plantes sont synthétisées et sécrétées par l'intermédiaire des cellules ou organes particuliers où elles restent localisées. Elles peuvent être stockées dans tous les organes de la plante :

- les feuilles comme pour le basilic.
- les fleurs comme pour la rose.
- le fruit comme pour le citron.
- les graines comme pour la coriandre.
- l'écorce comme pour la cannelle.
- les racines comme pour le gingembre.

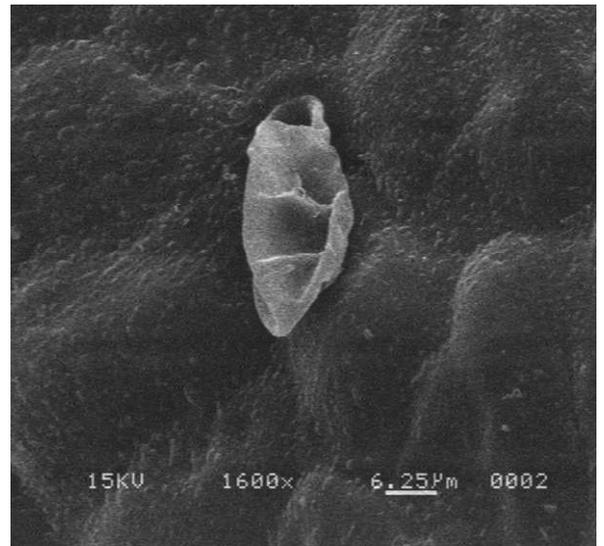
Si tous les organes d'une même espèce peuvent renfermer une huile essentielle, la composition de cette dernière peut varier selon sa localisation [2].

Ces structures histologiques spécialisées, sont souvent situées sur, ou à proximité de la surface de la plante et elles varient selon les familles botaniques : Cellules à huiles essentielles des Lauraceae, poils sécréteurs des Lamiaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae, canaux sécréteurs des Asteraceae [3].

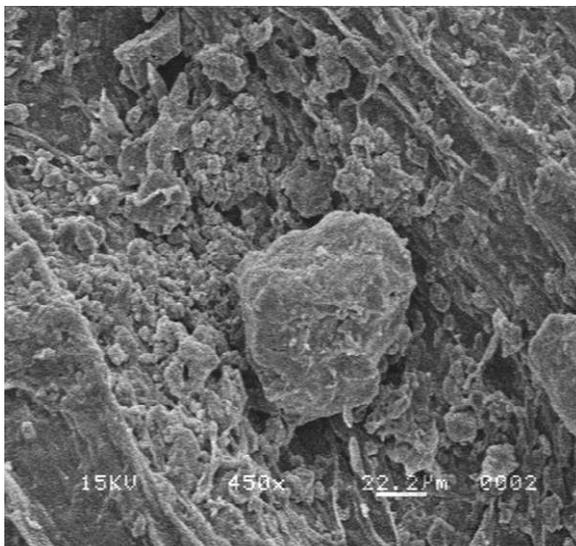
La figure I-1 illustre la localisation des cellules contenant les huiles essentielles pour quelques plantes aromatiques.



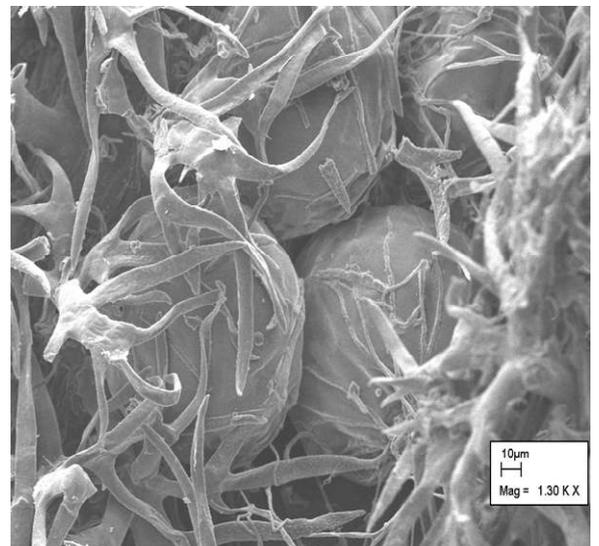
Thym



Menthe



Carvi



Lavande

**Figure I-1** : Localisation des structures sécrétrices pour quelques plantes aromatiques [4].

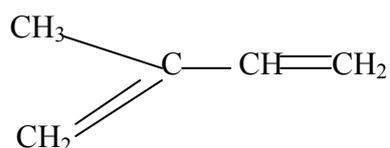
### I-1-3-Propriétés physiques [3] :

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles. Elles ne sont que très rarement colorées (en rouge pour la cannelle, en bleu pour la camomille...). Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau (les huiles essentielles de sassafras, de girofle ou de cannelle constituent des exceptions). Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles. Entraînables à la vapeur d'eau, elles sont très peu solubles dans l'eau ; elles le sont toutefois suffisamment pour communiquer à celle-ci une odeur nette. Cette eau est dite « eau distillée florale ».

### I-1-4-Composition chimique:

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et variés, constitués de composés organiques de structures et de fonctions chimiques très diverses. Généralement, on classe ces composés en deux groupes : les composés terpéniques et les dérivés phénylpropaniques.

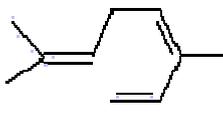
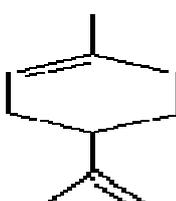
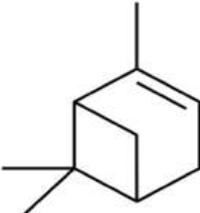
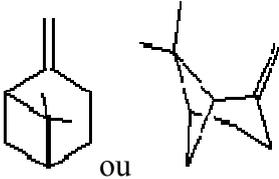
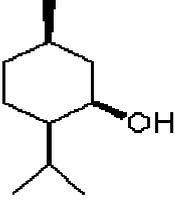
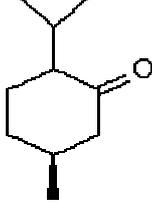
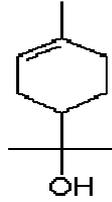
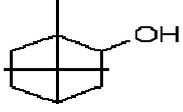
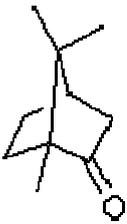
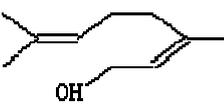
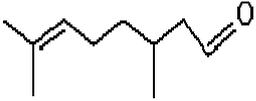
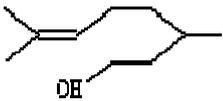
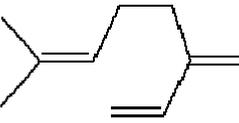
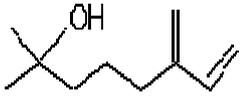
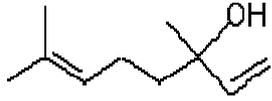
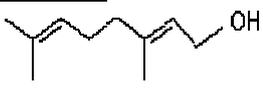
- Les composés de type terpénique sont largement rencontrés dans les huiles essentielles. Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable. Bien que les hydrocarbures terpéniques aient des structures très diverses, ils sont formés d'un multiple pair ou impair d'unités de 2-méthylbuta-1,3-diène ( $C_5H_8$ ) ou appelé encore isoprène. De ce fait, une classification rationnelle, basée sur le nombre d'unités isopréniques qu'ils renferment est possible. Ainsi, on distingue : les monoterpènes ( $C_{10}$ ), les sesquiterpènes ( $C_{15}$ ), les diterpènes ( $C_{20}$ ), les triterpènes, ( $C_{30}$ ) et les tétraterpènes ( $C_{40}$ ) [5].



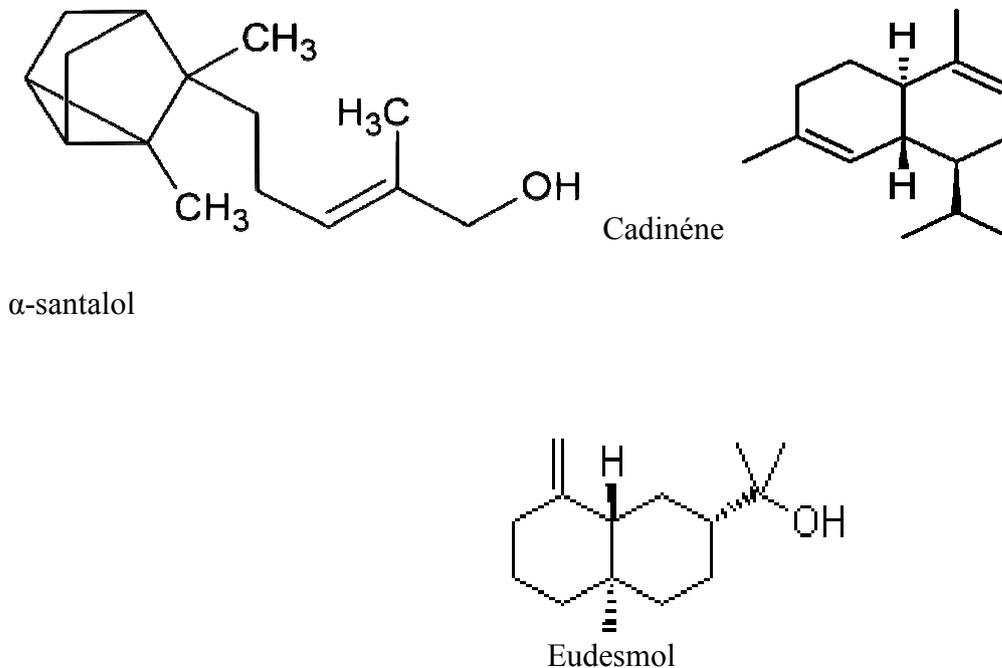
**Figure I-2** : 2-méthylbuta-1,3-diène

**Monoterpène** :: Les monoterpènes ( $C_{10}$ ) peuvent être classés en acycliques, monocycliques et bicycliques. Il existe même un monoterpène tricyclique précisément appelé « tricylène ». Dans chaque série, on rencontre les produits oxygénés tels que les alcools, les aldéhydes, les cétones, les esters....., connus depuis un siècle environ, ils constituent les composants principaux d'un très grand nombre d'huiles essentielles extraites de fleurs, feuilles ou fruits [5].

**Tableau I-1** : Exemples de quelques monoterpènes [5,6] :

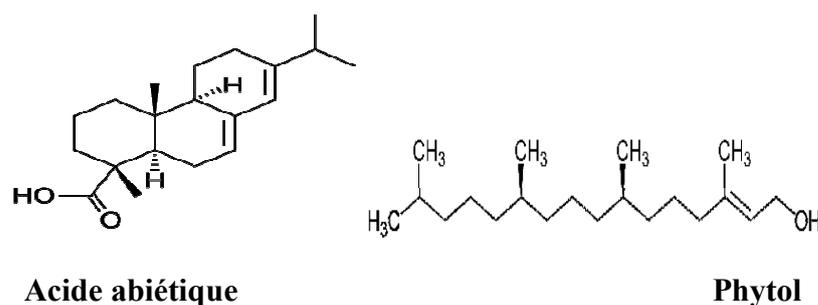
<u>Ocimène</u> 	<u>Limonène</u> 	<u><math>\alpha</math>-pinène</u> 	<u><math>\beta</math>-pinène</u> 
<u>Menthol</u> 	<u>Menthone</u> 	<u>Terpinéol</u> 	<u>Isobornéol</u> 
<u>Camphre</u> 	<u>Nérol</u> 	<u>Citronellal</u> 	<u>Citronellol</u> 
<u>Myrcène</u> 	<u>Myrcénol</u> 	<u>Linalol</u> 	<u>Géraniol</u> 

- **Sesquiterpènes** : Ce sont des hydrocarbures de formule  $C_{15}$ , ils constituent un groupe de structures très diversifiées, plus de 200 squelettes carbonés ont été identifiés [7].



**Figure I- 3** : Exemples de composants sesquiterpéniques

- **Diterpènes [7]** : Ce sont des dérivés des hydrocarbures en  $C_{20}H_{32}$ , Issus du couplage de quatre unités isopréniques ( $n= 4$ ). Ces composés, à point d'ébullition élevé, se rencontrent surtout dans les résines, ils sont particulièrement abondants chez les Lamiaceae et les Asteraceae. Ils peuvent être acycliques, bi ou tri-cycliques. Ils sont surtout répandus chez les végétaux supérieurs et classés en fonction de leur diversité structurale.



**Figure I-4** : Exemples de composants Diterpéniques

- **les triterpènes [8]**. Ces composés en  $C_{30}$  sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre, estérifiés, ou sous forme hétérosidique.



Squalène

**Figure I-5 :** Exemple d'un composant triterpénique.

Dans les huiles essentielles, les terpènes les plus rencontrés sont les terpènes les plus volatils c'est à dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée tels que les mono et les sesquiterpènes.

- Les dérivés phénylpropaniques ( $C_6-C_3$ ) sont beaucoup moins fréquent que les précédents. Ce sont souvent des allyl- et propénylphénols et parfois des aldéhydes [3].

#### **I-1-5- Variabilité des huiles essentielles [4]:**

La composition chimique, la qualité et la quantité extraite d'une huile essentielle dépendent de plusieurs paramètres à savoir :

- Intrinsèques: les facteurs génétiques, la localisation des cellules à l'huile essentielle, le degré de maturité
- Extrinsèques : le sol, le climat, l'environnement
- Type de culture, mode de récolte, mode d'extraction.

Par conséquent la composition chimique d'une huile essentielle peut varier au sein d'un même genre botanique. Parfois ces variations peuvent s'observer au sein d'une même espèce, on parlera alors de chémotypes : il s'agit d'un polymorphisme chimique.

### **I-1-6-Activité biologique des huiles essentielles :**

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne et d'origine fongique. Cependant, elles possèdent également, des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre.

Dans le domaine phytosanitaire et agro-alimentaire, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires.

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... [8]

L'activité biologique d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique et les possibles effets synergiques entre ses composants [9].

#### **I-1-6-1-Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles :**

Une substance antibiotique est un composé chimique produit ou dérivé d'un organisme vivant, capable d'inhiber des processus vitaux des micro-organismes [10].

Le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles fut même le premier usage des aromathérapeutes modernes. C'est ainsi que Paule DURAFFOURD a mis au point « l'aromatogramme » testant la sensibilité des germes vis-à-vis des essences. L'action bactériostatique des essences permet de ménager l'utilisation des antibiotiques habituels et éviter l'apparition des « résistances » ; grave problèmes de la médecine actuelle [11].

#### **I-1-6-1-1-Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les cellules microbiennes :**

Le mécanisme d'action des substances antimicrobiennes autre que les antibiotiques reste encore peu connu. L'intérêt de les étudier est apparu particulièrement avec la mise en évidence accrue des souches résistantes aux antiseptiques [12].

Les huiles essentielles peuvent avoir une ou plusieurs cibles selon leur concentration et leur nature. Dans la plupart des cas, l'accès à la cible nécessite le franchissement de la paroi cellulaire qui est un obstacle chimique et physique.

Les huiles essentielles ont plusieurs modes d'action sur les souches bactériennes mais d'une manière générale, cette action peut être résumée en trois points :

- L'attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité et une perte des composants de structure.
- Acidification de l'intérieur de la cellule bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

Les huiles essentielles sont classées en trois groupes :

**a)-Les huiles majeures** : elles agissent aussi bien sur les bacilles à gram+ ou à gram-. Ce sont des huiles dont l'action bactéricide est constante et forte. Elles sont également appelées essence du germe.

**b)-Les huiles médiums** : Elles sont moyennement antiseptiques. Elles assurent la transition entre les majeures et les essences spécifiques nécessaires à chaque malade.

**c)-Les huiles de terrain** : ce sont des huiles dont l'indice aromatique est inférieur à 0,1.

Seul l'aromatogramme pourra nous révéler leur pouvoir bactéricide ou bactériostatique.

[13]

#### **I-1-6-1-2-L'aromatogramme [14] :**

Cette technique inspirée de celle de l'antibiogramme permet de savoir si les germes d'un prélèvement biologique sont sensibles ou résistants à une huile essentielle.

Un milieu gélosé estensemencé avec une suspension bactérienne. Des disques calibrés imprégnés d'une huile essentielle connue sont disposés sur le milieuensemencé ; après 24 heures d'incubation à l'étuve à 37°C, la lecture sera effectuée. En cas d'activité de l'huile essentielle, une zone circulaire d'inhibition (halo d'inhibition) apparaît. Selon la taille du halo d'inhibition, nous distinguerons :

- Des germes résistants à l'huile essentielle.
- Des germes assez sensibles à l'huile essentielle.
- Des germes très sensibles à l'huile essentielle.

## **I-1-7- Procédés d'extraction des huiles essentielles**

### **I-1-7- 1- Entraînement à la vapeur :**

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés d'extraction les plus anciens et l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un flux de vapeur descendant ou ascendant sans macération préalable. Le plus souvent, la vapeur d'eau est injectée au bas d'une charge végétale. Les vapeurs chargées en composés volatils sont condensées avant d'être décantées et récupérées dans un essencier (vase de décantation des huiles essentielles).

### **I-1-7-2- Hydrodistillation :**

L'hydrodistillation est la méthode normée pour l'extraction des huiles essentielles à partir des épices sèches, ainsi que pour le contrôle de qualités des huiles essentielles au laboratoire. Son principe consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, ensuite l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. Ensuite, ce mélange azéotropique « eau + huile essentielle » est refroidi, condensé et récupéré dans un essencier ou vase florentin [15].

### **I-1-7-3- Turbodistillation :**

La turbodistillation est un procédé d'hydrodistillation accélérée en discontinu développée en France par la société DCF-Aromaprocess [16]. Cette technique est prédestinée aux matières premières végétales difficiles à traiter comme les racines, les ligneux ou les graines. Elle représente une alternative à des hydrodistillations de longue durée ou en surpression. Le réacteur contenant la matière végétale est équipé d'une turbine qui permet d'une part, la dilacération des matières végétales, d'autre part, une agitation turbulente,

d'où un meilleur coefficient de transfert thermique et une augmentation de la surface de vaporisation. Ce procédé permet la récupération des fractions les plus volatiles grâce à un système de condensation. La présence d'une colonne à plateaux contribue à l'enrichissement des vapeurs en huile essentielle, d'où une amélioration du rapport d'entraînement.

#### **I-1-7-4- Expression à froid [17] :**

Les huiles essentielles d'agrumes sont les seules à être extraites par le procédé d'expression à froid, qui est basé sur la rupture des péricarpes riches en huiles essentielles. L'huile essentielle ainsi libérée est entraînée par un courant d'eau. Une émulsion constituée d'eau et d'essence se forme. L'essence est alors isolée par décantation. Diverses techniques manuelles ou mécaniques, traitant le fruit entier ou seulement les écorces, sont utilisées.

#### **I-1-7-5-Distillation sèche [15] :**

Il s'agit d'une méthode d'extraction des huiles essentielles caractéristique des végétaux fragiles tels que les pétales de rose. Dans le domaine de l'extraction végétale, la distillation sèche consiste à chauffer de façon très modérée les plantes ou parties de plantes sans ajout d'eau ni de solvants organiques, puis à condenser les substances volatiles. L'avantage de cette méthode est la température à laquelle se déroule l'extraction : inférieure à 100°C, ce qui évite la dénaturation de certaines molécules thermosensibles.

#### **I-1-7-6- Extraction assistée par micro-onde :**

La technique d'extraction par micro-onde a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé d'extraction est basé sur l'absorption de l'énergie de la micro-onde par les composantes du matériel végétal et qui sont mesurées par une constante diélectrique, cette absorption dépend aussi de la fréquence de l'onde et de la température du matériel végétal [6].

L'extraction assistée par microondes est également une alternative aux méthodes d'extraction conventionnelles [18]. Elle est l'une des méthodes les plus récentes pour l'extraction de molécules d'intérêt avec un impact environnemental positif : moins

d'énergie, des temps de traitement plus courts, une meilleure sélectivité, moins de solvants et d'eau usée.

Les premiers travaux utilisant les micro-ondes pour extraire des composés organiques ont été publiés par Ganzler et coll.[19] en 1986. Depuis cette date, les micro-ondes sont de plus en plus utilisés dans le domaine de l'extraction des produits végétaux.

## **I-2-LES FLAVONOÏDES:**

### **I-2-1-Définition :**

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes sont des produits largement répandus dans le règne végétale. Ils forment un groupe de plus de 6000 composés naturels et ils constituent des pigments responsables de colorations jaune, orange et rouge de différents organes de végétaux [7, 20, 21].

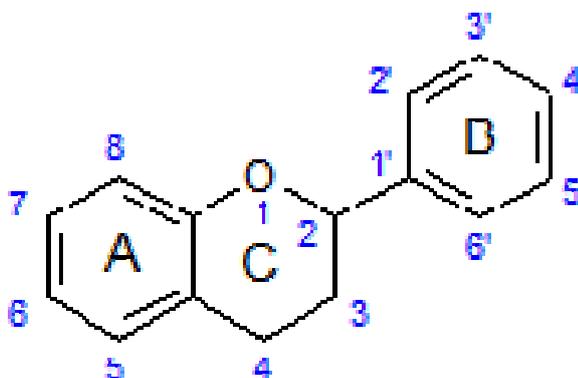
Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique E.Chervreul en 1814, mais ils n'ont été réellement découverts qu'en 1930 par Albert Szent-Györgyui, désignés sous le nom de vitamine P [22, 23].

Les travaux relatifs aux flavonoïdes se sont multipliés depuis la découverte du célèbre "french Paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées [20].

### **I-2-2-Structure chimique et biosynthèse des flavonoïdes :**

Plus de 6000 flavonoïdes ont été identifiés et ils présentent le même élément structural de base. Ces molécules ont un poids moléculaire faible, comporte 15 atomes de carbones arrangés comme suit : C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Ces molécules sont composés de deux noyaux aromatiques A et B (deux cycles benzéniques C<sub>6</sub>), liés par un pont de 3 carbones (chaîne en C<sub>3</sub>) (figure I-5). Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrole souvent sous forme d'un hétérocycle [24].

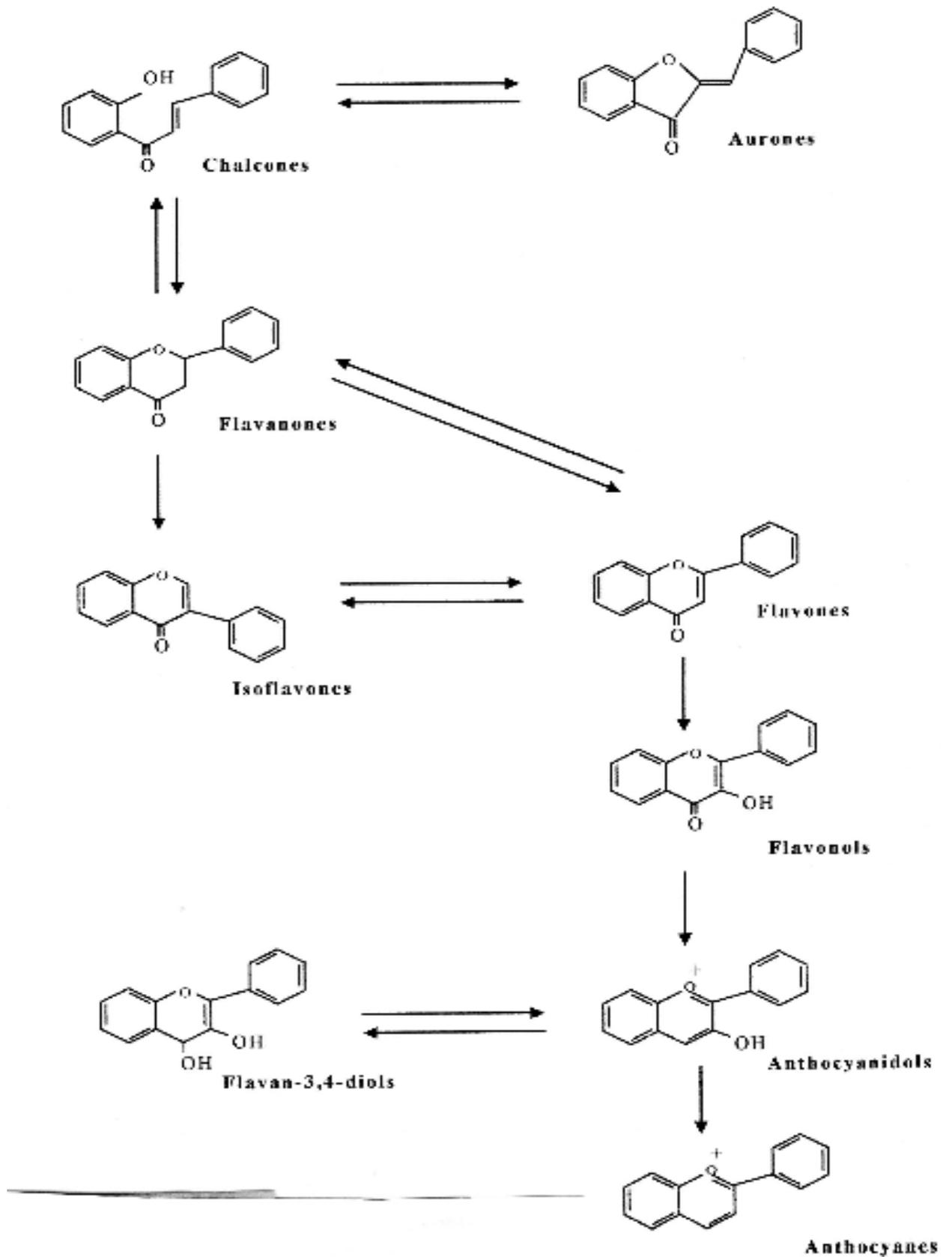
Structuralement, les flavonoïdes peuvent être subdivisés en 6 classes différentes : flavones, flavonols, flavanones, isoflavones, chalcones et aurones [25]. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.



**Figure I-6:** Structure de base des flavonoïdes [26]

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2*S*)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone : apigénine ou le dihydroflavonol : (2*R*, 3*R*)-dihydrokaempférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonolsynthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol : kaempférol ou en flavan-3,4-diol : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3-ols et anthocyanidols [27,28].

Toutes les voies métaboliques intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes peuvent être simplifiées et schématisé dans la figure (I-6).



**Figure I-7 :** Schéma simplifié de la biosynthèse de différentes classes des flavonoïdes [28].

### **I-2-3-Classification des flavonoïdes [28]:**

Les principaux groupes de flavonoïdes peuvent être définis et différenciés comme suit :

**I-2-3-1-Flavones et flavonols :** Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH<sub>3</sub>). Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3.

**I-2-3-2- Flavanones et hydroflavonols :** Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols. Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3.

**I-2-3-3- Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols :** Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols). Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3,4-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou cyanidine.

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés.

**I-2-3-4-Chalcones et aurones :** Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone. Néanmoins, selon d'autres auteurs, la classification des flavonoïdes inclue aussi le groupe des anthocyanes. Ceci en raison de la grande similitude structurale de ces derniers avec les flavonoïdes ; et plus précisément avec les anthocyanidols.

Le tableau suivant illustre la répartition des flavonoïdes dans les fruits et légumes.

**Tableau I-2** : Distribution des flavonoïdes dans les fruits et légumes [20].

<b>Famille</b>	<b>Molécules principales</b>	<b>Distribution</b>
Flavone	apigénine, lutéoline, chrysin	pomme, céleri, grains de céréale,...(teneur = 5-100 mg/kg)
flavanone	hespéridine, naringine, taxifoline	herbes aromatiques (persil, romarin, thym), <i>Petroselinum sativum</i> , <i>Apium graveolens</i>
flavonol	quercétine, myricétine et kaempférol	citrus et agrumes (teneur = 250-6000 mg/kg) <i>eucalyptus globulus</i>
isoflavones	genistéine et daidzéine	pomme, pamplemousse, radis, endive, brocoli, oignon, chou, laitue, vin rouge, raisin, olive, thé noir,... (teneur = 56-250 mg/kg) <i>Sophora japonica</i> , <i>Stellaria media</i> , <i>Vitis vinifera</i>
flavan-3-ols	(+)-catéchine, (-)-epicatéchine, (-)-epigallocatechine et leurs esters de gallate	légumineuses (soja, haricots noirs et pois chiches verts), pousses de luzerne et de trèfle et les graines de tournesol (teneur = 150-1500 mg/kg) <i>Pueraria lobata</i> , <i>stellaria media</i>
anthocyanes	cyanidine, pelargonidine	thé vert et noir, vin rouge (teneur = 5-250 mg/kg) <i>Vitis vinifera</i> fruits et légumes rouges et violets (pommes, raisins, baies, kaki, cassis...) (100-4000 mg/kg)

### **I-2-4- Propriétés biologiques des flavonoïdes :**

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques notamment les flavonoïdes, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire[23].

Les flavonoïdes ingérés avec nos aliments sont réputés protéger l'organisme contre les effets délétères des apports environnementaux oxydants. Des études épidémiologiques prospectives sur cohortes ont montré que la consommation de certains aliments ou boissons (certains jus de raisin, fruits rouges, thé, cacao) riches en flavonoïdes (particulièrement flavanols et anthocyanes), est inversement corrélée à la mortalité par accidents vasculaires cérébraux et coronariens et à la prévention de maladies neuro dégénératives telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [29].

D'autres activités, thérapeutiques, ont été décrites dans la littérature pour les flavonoïdes. Elles seraient la conséquence de l'activité antitumorale [30], anti carcinogène [31], anti-inflammatoire [32-34], antiulcéreuses [35], anticancéreuses [36], antiallergiques[37], antivirales, antibactériennes[38] et leurs caractères antioxydants [39,40].

### **I-2-5-Autres propriétés des flavonoïdes [21]**

- ❖ Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.
- ❖ **Activité photoprotectrice :** Les rayonnements UV sont divisés en trois groupes. Les UVC de 200 à 290 nm sont des rayonnements à haute énergie et qui sont stoppés avant l'entrée dans l'atmosphère par la couche d'ozone. Les UVB (280-320 nm)

sont nocifs pour la santé et n'atteint que l'épiderme, alors que les UVA (320-400 nm) pénètrent plus profondément. La réponse biologique à ce stress peut être immédiate et passagère (inflammation, brûlure), retardée et chronique (vieillessement de la peau, cancer). L'accumulation de ce stress oxydant induit entre autre une augmentation des radicaux libres, qui dégradent les composants cellulaires : lipides, protéines, bases nucléiques..

Les flavonoïdes, suivant leur structure, présentent des maxima d'absorption dans la zone 270 à 350 nm, ce qui pourrait prévenir ou diminuer les dommages de la peau induits par le stress oxydant en particulier ceux des radiations UVB en modulant la réponse cellulaire et en piégeant les espèces radicalaires oxygénées [41]. En effet, plusieurs publications [ 42,43] ont revendiqué l'utilisation des flavonoïdes dans des préparations anti-UV.

## Chapitre II :

### MATIERE VEGETALE : *Artemisia Campestris*

#### II-1-Présentation de la plante *Artemisia campestris* :

##### II-1-1-Classification [1] :

- Règne : *Plantae*.
- Embranchement : *Angiospermes*
- Classe : *Dicotylédones*
- Ordre : *Astrales*
- Famille : *Astéracées ou Composées*
- Sous-famille : *Anthémidées*
- Genre : *Artemisia*
- Espèce : *Campestris*
- Nom français : *Armoise champêtre ou Armoise des champs*
- Nom vernaculaire [2]: "*Degouft*", *Alala* ou "*Chaal*"
- Nom arabe (Moyen orient) : "*Echchih el boustani*"

Le genre *Artemisia* est l'un des plus importants de la famille des *Asteraceae* ; il comprend environ 400 espèces réparties sur les cinq continents, en grande partie utilisées pour leurs diverses propriétés médicinales par les pharmacopées locales [3].

## **II-1-2-Description botanique de l'*Artemisia campestris* :**

La plante *Artemisia campestris* L. (*A. campestris*) (Degouft) appartient à l'embranchement des angiospermes, à la classe des dicotylédones et à la grande famille des composées récemment appelées Astéracées. Cette grande famille comprend près de 13000 espèces réparties en 1500 genres. Cette espèce est caractérisée par un groupement des fleurs en capitules très petits de 1 à 2 mm, étroits, feuilles glabres, d'un vert foncé, ovoïdes ou globuleux et disposés en grappe. Elle a une tige de 30 à 80 cm de hauteur, ligneuse à la base, striée et rameuse. Les feuilles de cette plante sont de couleur vert foncées, glabrescentes, sessiles au sommet, pétiolées à la base, à segments formant des lanières très étroites et espacées. Les fruits ont la forme d'achaine. Le système racinaire est généralement puissant avec une racine principale pivotante pouvant atteindre un mètre de profondeur et présentant des racines secondaires horizontales (voir figure II-1).

*L'Artemisia campestris* L. présente deux périodes de croissance végétative : l'une vers le mois de novembre (après les pluies d'automne) et l'autre, qui est la plus importante, est observée en plein printemps (mars-avril) avec un repos végétatif en hiver (janvier), saison durant laquelle la plante est assez appréciée par les animaux. [4, 5].

## **II-2-Répartition géographique :**

L'armoise champêtre se développe dans une bonne partie de l'Europe et largement répandu dans l'hémisphère nord [6]. Au Mexique et dans la partie nord des Etats unis, elle est classée parmi la végétation des roches silicieuses [7] et en France, on la rencontre au sud de la Seine.

Elle se trouve aussi dans les montagnes du Sahara central, dans les massifs montagneux et dans les fonds des vallées à l'étage saharo méditerranéen inférieur.

Elle est présente au Maroc, en Libye (zone littorale de la tripolitaine) et dans les rivages méditerranéens jusqu'au cœur du Sahara [8].

En Algérie, cette espèce est distribuée sur les hauts-plateaux, elle est plus rare dans la région présaharienne et au Sahara septentrional ; elle apparaît dans les montagnes du Sahara central, en altitude (assez répandue au Hoggar, plus rare au Tafdest et au Tassili des Ajjer) [4].



**Figure n°II-1** : Photographies des touffes de l'*Artemisia campestris* dans la nature

### **II-3-Usage médicinal de l'*Artemisia campestris* :**

L'*Artemisia campestris* est une plante aromatique et médicinale, très connue par les habitants du Maghreb ; elle est largement utilisée et réputée pour ses vertus thérapeutiques [9].

Les parties aériennes de la plante sont utilisées par la médecine populaire comme antihelminthique, antiseptique, cholagogue, tonic, hypotensif et antivenin [10]

En Algérie, elle est largement utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des maux d'estomac et dans le cas des règles douloureuses. Elle est aussi utilisée comme vermifuge, vulnéraire, elle possède des propriétés cicatrisantes et emménagogues. Les parties utilisées sont les feuilles et les sommités en infusion, en décoction, en macération ou en cataplasme [11].

En Tunisie les feuilles de l'*A.campestris* L. sont utilisées en médecine traditionnelle en décoction comme antivenin, anti-inflammatoire, et pour ses propriétés antirhumatismales et antimicrobiennes. Il a été mentionné que l'application locale de la poudre des feuilles séchées est efficace en cas de piqûre de scorpion ou de morsure des serpent et pour la cicatrisation des brûlures ( dans ces cas, la population consomme toute la plante). La fumigation ou le décocté sont utilisés, en usage interne, contre la toux, le diabète et l'ulcère gastrique. En usage externe, cette plante est utilisée pour traiter et soulager l'eczéma [12].

La plante était utilisée par les tribunes Amérindiennes du nord de l'Amérique comme remède pour les difficultés de grossesse, pour soigner le rhumatisme, l'eczéma, les ecchymoses et les plaies. Le liquide récupéré après l'écrasement de la plante était utilisé pour soigner les irritations des yeux. L'infusion des racines était utilisée spécialement pour

les enfants comme tonifiant des cheveux et pour le traitement des infections du cuir chevelu [13]. L'Armoise champêtre figure aussi dans la liste des plantes vasculaires médicinales indigènes du Québec [14].

#### **II-4-Quelques travaux déjà réalisés sur l'*Artemisia campestris* :**

Plusieurs travaux de recherche ont été réalisés sur l'armoise champêtre (*Artemisia campestris*) dont parmi eux sont :

##### **II-4-1- Etude de la Composition chimique de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* :**

- Une étude a été réalisée par Akrouf et coll [15] qui a montré que la teneur en huile essentielle, isolée à partir des feuilles de *Artemisia campestris* collectée au mois de novembre 1996 dans quatre régions de sud-est de la Tunisie (Benguardane, Benikhdache, Jerba et Tataouine) est de l'ordre de 0,65 %. L'huile essentielle est principalement composée des hydrocarbures monoterpéniques (47,8-63,8%) dont les principaux composés sont :  $\beta$ -pinène (24,3-27,9 %), p-cymène (17,4-22,3 %) et  $\alpha$ -pinène (4,1-11,0 %).
- L'huile essentielle extraite de *Artemisia campestris* collectée dans différentes régions d'Italie est principalement composée de  $\alpha$ -pinène (6,9-57,2%), de germacrène D (0,4-28,6%), myrcène (1,7-11,2%) et bicyclogermacrène (1,0-14,5%) [16].
- Les variations de la composition chimique de l'huile essentielle isolée de la partie aérienne de *A. campestris* collectée au sud de France ont été étudié par Juteau et coll [17], cette étude a montré que l'huile essentielle est principalement composée des hydrocarbures dont les pourcentages varient de 94% au stade végétatif, à 90% au stade avant l'anthèse, 87% au stade de floraison et 63% au stade de formation de semences. On a remarqué que la fraction des composés oxygénés est essentiellement formée par des sesquiterpènes et augmente au cours de cycle phénologique de cette plante, en allant de trace au stade végétatif, 3% au stade de floraison (bourgeon et floraison total) et 17% au stade de formation de semences.

On a constaté que qualitativement la composition chimique de l'HE obtenue de différents stades phénologiques est similaire : les principaux composés sont  $\gamma$ -terpinène (1,4-46,5%), capillène (8,9-33,1%), 5-Phényl-penta-1,3-diyne (16,2-29,7%), spathuléol (0-11,3%), o-méthyleugénol (4,5-6,6%), p-cymène (1,7-4,5%) et  $\beta$ -pinène (0-3,7%). Ils ont remarqué que  $\gamma$ -terpinène est plus abondant dans l'HE de stade végétatif (47%) que dans les huiles des stades de floraison (27% et 21%) et de stade de formation de semences (1%); le capillène est moins abondant dans l'HE de stade végétatif (9%) que dans les huiles des stades de floraison (27%et 22%) et de stade de formation de semences (33%). Ils ont signalé que la teneur en 5-Phényl-penta-1,3-diyne est relativement élevée dans toutes les huiles essentielles étudiées (16,2-29,7%) et ne varie pas au cours du cycle phénologique. Les teneurs des autres composés majoritaires (spathuléol, o-méthyleugénol, p-cymène et  $\beta$ -pinène) n'ont pas montré des variations significatives au cours des stades phénologiques.

- Une étude comparative de la composition de l'huile essentielle issue de matériel frais, séché à l'air libre, ou séché avec ventilation (de 24h à 21j.) a été appliquée. Les rendements varient de 0,3 à 0,7%, les huiles obtenues sont fluides, de couleur jaune vif, avec une intense odeur boisée. Les analyses par CPG et CG/SM ont permis de mettre en évidence que les composés majoritaires sont toujours le 1-phenylpenta-2,4-diyne (18-34%) et le capillène (13-27%), deux polyacétylènes aromatiques, le  $\gamma$ -terpinène (6-25%), le méthyl eugénol (3-5%), le *p*-cymène (2-9%) et le germacrène D (2-6%). Ces variations de composition restent donc essentiellement d'ordre quantitatif, il a été permis de conclure que le protocole de séchage exerce une influence relativement faible sur la composition de l'huile essentielle de *A. campestris*. Ces résultats sont encourageants dans la perspective d'une exploitation de cette espèce [3].
- Des travaux menés sur la partie aérienne de la plante collectée dans la région de Boussaada –Algérie. Le rendement en huile essentielle isolée par hydrodistillation était de 0,66% (exprimé en matière sèche). Elle est constituée principalement par acétate de  $\alpha$ -terpenyl(19%),  $\alpha$ -pinène (18%) , camphre (9%), camphène (8%), limonène (5%) et bornéol (5%) [18].

- Une autre étude [19] a rapporté que la teneur en huile essentielle de la partie aérienne de l' *Artemisia campestris* de la Serbie extraite par hydrodistillation était de 0.2% . L'huile essentielle est analysée par CPG et CG/SM . 38 composés sont identifiés dont les principaux sont : les alcools sesquiterpéniques: spathulenol (9.2%) et 4-hydroxy-9-epi-[beta]-caryophyllene (3.0%); et les hydrocarbures monoterpéniques:  $\beta$ -pinène (9.1%),  $\alpha$ -pinène (3.4%), limonène (2.5%) et germacrène D (3.3%).

#### II-4-2- Etude des flavonoïdes de l' *Artemisia campestris* :

- Une étude réalisée par Hurabielle et coll [20] pour l'extraction des flavonoides. Les sommités fleuries d'*Artemisia campestris* , séchées et pulvérisées, sont dégraissées à l'éther de pétrole et épuisées par le chloroforme. Le fractionnement de l'extrait chloroformique, par chromatographie sur colonne de silice et la purification de certaines fractions ont conduit à l'isolement de six génines flavoniques, à l'état pur. L'étude des spectres UV, des spectres de masse et des spectres de RMN et la comparaison avec des échantillons authentiques permettent de proposer, pour ces flavonoïdes, les structures de la pinostrobine, de la pinocembrine, de la sakuranétine, de la naringénine (flavanones), de la méthyl-7-aromadendrine, (dihydroflavonol) et de l'hispiduline (flavone); quatre de ces génines sont méthylées.
- De Pascual et coll. [21] ont pu isoler et identifier les flavonoïdes suivants à partir d'un extrait chloroformique de la partie aérienne de *Artemisia campestris*: le sakuranétine (5,7-dihydroxy-7,3'-diméthoxy flavanone), le diméthyléther de dihydroquercétine (5,7,4'-trihydroxy-6-méthoxy dihydroflavonol), isosakuranétine (5,7-dihydroxy-4'-méthoxy flavanone), le naringénine (5,7,4'-trihydroxy flavanone), homoeriodictyol (5,7,4'-trihydroxy-3'-méthoxy flavanone), le 7,3'-diométhyldihydroquercétine (5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxy dihydroflavonol), le 7-ométhyleriodictyol (5,3',4'-trihydroxy-7-méthoxy flavanone), le padmatine (5,3',4'-trihydroxy-7-méthoxy dihydroflavonol) et l'hispiduline (5,7,4'-trihydroxy-6-méthoxy flavone).

### **II-4-3-Etude de l'activité antioxydante et antitumorale de l'A. campestris [12]:**

Cette étude a été consacrée à l'activité antioxydante et l'inhibition in vitro de la croissance du cancer des cellules de carcinome (HT-29) d'un colon humain par quelques extraits de *A. campestris*. Afin de reproduire l'exposition à des composés phytochimiques dans l'administration traditionnelle de ces plantes, des extraits de perfusion d'eau ont été digérés in vitro avant d'être mélangé avec un milieu de culture cellulaire.

L'étude a été conçue pour examiner l'activité antioxydante et antitumorale de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*. La composition chimique a été étudiée en utilisant les techniques CPG et CPG/SM. L'huile essentielle est principalement constitués des hydrocarbures terpéniques : bêta-pinène, alpha-pinène, germacrène, D-myrcène et le limonène.

Les résultats ont montré une activité antitumorale contre plusieurs types de cancers, comme le cancer du sein. La croissance la plus significative de l'action inhibitrice a été démontrée par huile essentielle de l'*A. campestris* avec un GI50 valeur de 46,82 lg / ml. En ajout la capacité antioxydante a montré une forte activité pour cette huile.

Ils ont suggéré que ces activités soient attribuées à alpha-pinène, bété-pinène et le limonène.

- L'activité antibactérienne, antiradicalaire, antifongique et insecticide ont été étudiés sur l'huile essentielle extraite à partir des feuilles d'*artemisia campestris*. Les résultats de cette étude ont montré que ces activités sont moyennes à faibles [22].

Une étude préliminaire basée sur d'autres études déjà réalisés sur la plante *Artemisia campestris* L. de Tunisie a montré les différentes classes de métabolismes secondaires et leur localisation dans la plante.

Les conclusions tirées à partir de ces travaux ont montré que :

- les classes de composés du métabolisme secondaire qui peuvent exister dans la plante sont : les huiles essentielles, les flavonoïdes, les dérivés phénoliques et les tanins et ces composés sont essentiellement localisés dans la partie aérienne.
- les feuilles doivent être séchées à l'air libre et à l'ombre avant d'être utilisées en médecine traditionnelle;
- Les huiles essentielles de cette plante sont localisées principalement dans les feuilles et n'existent pas dans les tiges.

Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi d'étudier les huiles essentielles et les flavonoïdes extraits à partir de l'*Artemisia campestris* L. d'Algérie, dans le but de contribuer à une meilleure connaissance de ces deux métabolites secondaires de cette plante qui s'est avérée d'un grand intérêt dans la médecine traditionnelle.

Nous allons étudier d'une part, l'extraction de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* L. où nous allons nous concentrer sur la plante entière (partie aérienne : la partie la plus utilisée en médecine traditionnelle), sur les feuilles et aussi sur les tiges.

Nous allons étudier l'effet de certains facteurs, tels que la durée d'extraction, la masse, la durée et le mode de séchage sur la quantité (rendement) des huiles essentielles et d'autre part, nous allons aborder l'extraction des flavonoïdes avec une évaluation de l'activité antibactérienne de celle de l'huile essentielle et du contenu flavonique extraits.

### Chapitre III :

## MATERIELS ET METHODES

L'armoise champêtre (*Artemisia campestris L.*) utilisée provient de la région de Djelfa située à 290 km au sud d'Alger, limité au nord par Médéa, au sud par Laghouat, Ghardaïa et Ouargla, à l'Est par M'Sila, Biskra et El-oued et à l'Ouest par Tiaret.

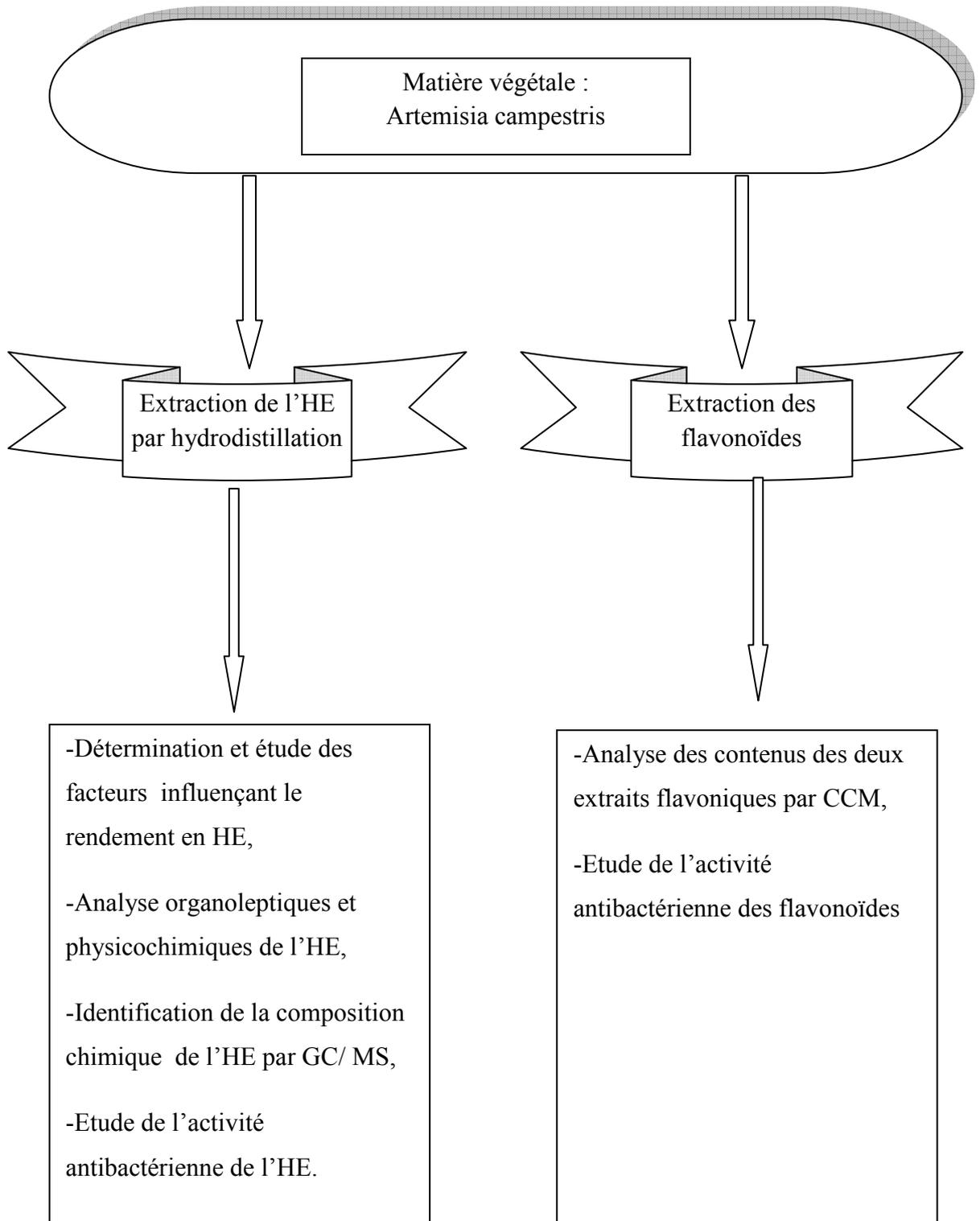
L'identification et la systématique de la plante ont été confirmées au niveau du laboratoire botanique du jardin d'essais d'El Hamma(Alger) (figure III.1).

Les parties de la plante utilisées pour l'extraction sont les parties aériennes, constituées de feuilles et de tiges, cueillies pendant le mois d'Avril en période de prés floraison.



**Figure III-1** : La plante *Artemisia campestris L.*

Le schéma directeur des différentes étapes de cette étude est illustré par l'organigramme suivant :



**Figure III- 2:** Schéma directeur de l'expérimentation :

### III-1-Extraction de l'huile essentielle :

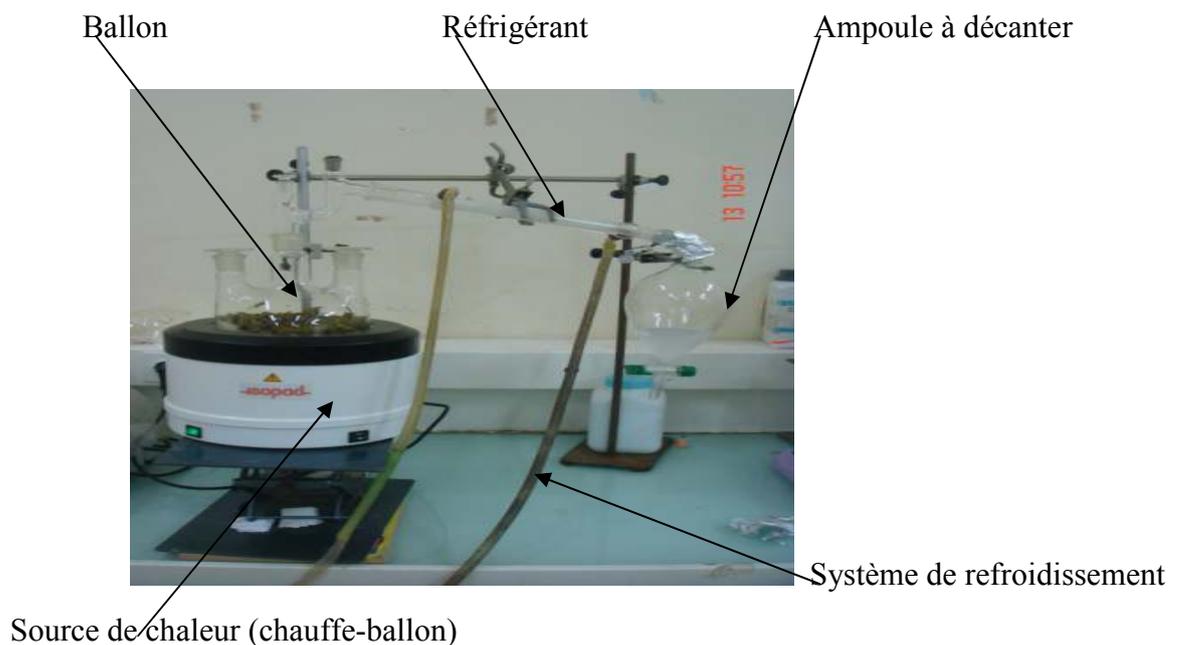
Nous avons réalisé l'extraction de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris L.* à l'échelle laboratoire en utilisant le procédé d'extraction par hydrodistillation.

Nous avons étudié l'influence sur le rendement en huile essentielle de certains paramètres en variant la partie de la plante :

- ✓ Temps de l'extraction,
- ✓ La masse de la matière végétale,
- ✓ Durée de séchage,
- ✓ Mode de séchage,

#### III-1-1-Appareillage :

L'extraction de l'huile essentielle de l'armoise champêtre par hydrodistillation à été réalisée à l'échelle laboratoire en utilisant le dispositif expérimental schématisé dans la figure III-3.



**Figure III-3** : l'appareillage de l'hydrodistillation

Ce dispositif est constitué de :

- un ballon de capacité de 2000ml rempli à 2/3 d'eau ,
- La source de chaleur qui est un chauffe ballon,
- un réfrigérant, alimenté par un système de refroidissement,
- une ampoule à décanter pour la récupération du distillat (eau+huile essentielle).

### **III-1-2-Protocole expérimental**

L'hydrodistillation est une méthode qui consiste à immerger la matière végétale directement dans l'eau qui sera portée à l'ébullition. La vapeur ainsi formée, entraîne l'huile essentielle et elle sera refroidie et condensée dans le réfrigérant puis recueillie dans une ampoule à décanter. Après avoir ajouté de l'éther diéthylique , récupéré la phase étherée qu'on met en contact avec un desséchant de type sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), à fin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau, on procède à l'évaporation du solvant( l'éther diéthylique) dans un évaporateur rotatif (figure III-3)

Ainsi, L'huile essentielle est récupérée et est pesée afin de calculer le rendement de l'extraction par rapport à la masse végétale. Cette huile essentielle est conservée dans le réfrigérateur à l'abri de la lumière et à une température de 4°C.



**Figure III-4** : Evaporateur rotatif**III-1-3-Calcul du rendement :**

Dans cette étude, Le rendement en huile essentielle de l'*Artemisia campestris* est calculé en rapport de masse : masse de l'huile essentielle ( $m_{HE}$ ) sur masse de la matière végétale ( $m_{MV}$ ), et il est exprimé en %.

$$R_{HE}=(m_{HE}/m_{MV}) * 100$$

Où :

$R_{HE}$  : rendement en huile essentielle exprimé en (%),

$m_{HE}$  : la masse de l'huile essentielle en g,

$m_{MV}$  : la masse de la matière végétale en g.

**III-1-4-Propriétés physico-chimiques et organoleptiques :**

La qualité d'une huile essentielle et sa valeur commerciale sont définies par des normes admises et portant sur les indices physico-chimiques caractéristiques.

Ces normes ont été déterminées par plusieurs organisations connues à l'échelle mondiale.

Ces organisations sont :

- I.S.O.
- A.O.A.C.
- A.F.N.O.R.

Cette dernière est privilégiée pour des raisons économiques, dans un but d'homogénéisation de la qualité de produits échangés notamment avec l'Europe et la France en particulier et pour sa grande fiabilité et rigueur scientifique.

Dans cette partie, nous avons déterminés les différentes propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle suivant la norme A.F.N.O.R. [1] . Les modes opératoires sont données en annexe.

### **III-1-5- Analyse de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC/MS :**

L'huile essentielle de l'*Artemisia campestris*L a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée avec la Spectrométrie de Masse (CPG/SM) en utilisant un chromatographe couplée à un spectre de masse de type PERKIN- ELMER model CLARUS 500 dans les conditions opératoires suivants :

- Colonne capillaire Optima 5 MS ( phase de 5% diphenyl – 95% diméthylpolysiloxane) de longueur 30m, 0,25 mm de diamètre et 0,25 µm d'épaisseur.
- Gaz vecteur : Hélium. Débit du gaz vecteur : 1ml/min.
- Température de l'injecteur : 250°C
- Température de la colonne : 70°C pendant 4min, de 70°C jusqu'à 220°C à raison de 4°C /min. 15 min à 220°C.
- Quantité injectée : 0,2 µl. Mode d'injection : splitless.
- Detecteur MS
- Température de l'injecteur : 250°C..
- Température de l'interface : 250°C
- Energie d'ionisation : 70 ev

### **III-2-Mise en évidence et extraction des flavonoïdes :**

#### **III-2-1-Mise en évidence des flavonoïdes [2] :**

Les flavonoïdes sont mis en évidence grâce à un test phytochimique.

On prépare une solution éthanolique avec 10g de matière végétale réduite en poudre et macéré dans 7 ml d'éthanol avec agitation, le mélange obtenu est filtré et la solution récupérée représente un extrait éthanolique.

Dans un tube à essai contenant 5 ml de l'extrait, on met 0,5g de tournure de magnésium puis on ajoute avec précaution quelques gouttes d'acide chlorhydrique à 37%.

#### **III-2-2-Extraction des flavonoïdes :**

Suivant le protocole d'extraction décrit par R. Merghem [3]. Les flavonoïdes sont extraits du matériel végétal, la plante séchée et broyée par macération dans un mélange éthanol-eau (50/50 : v/v).

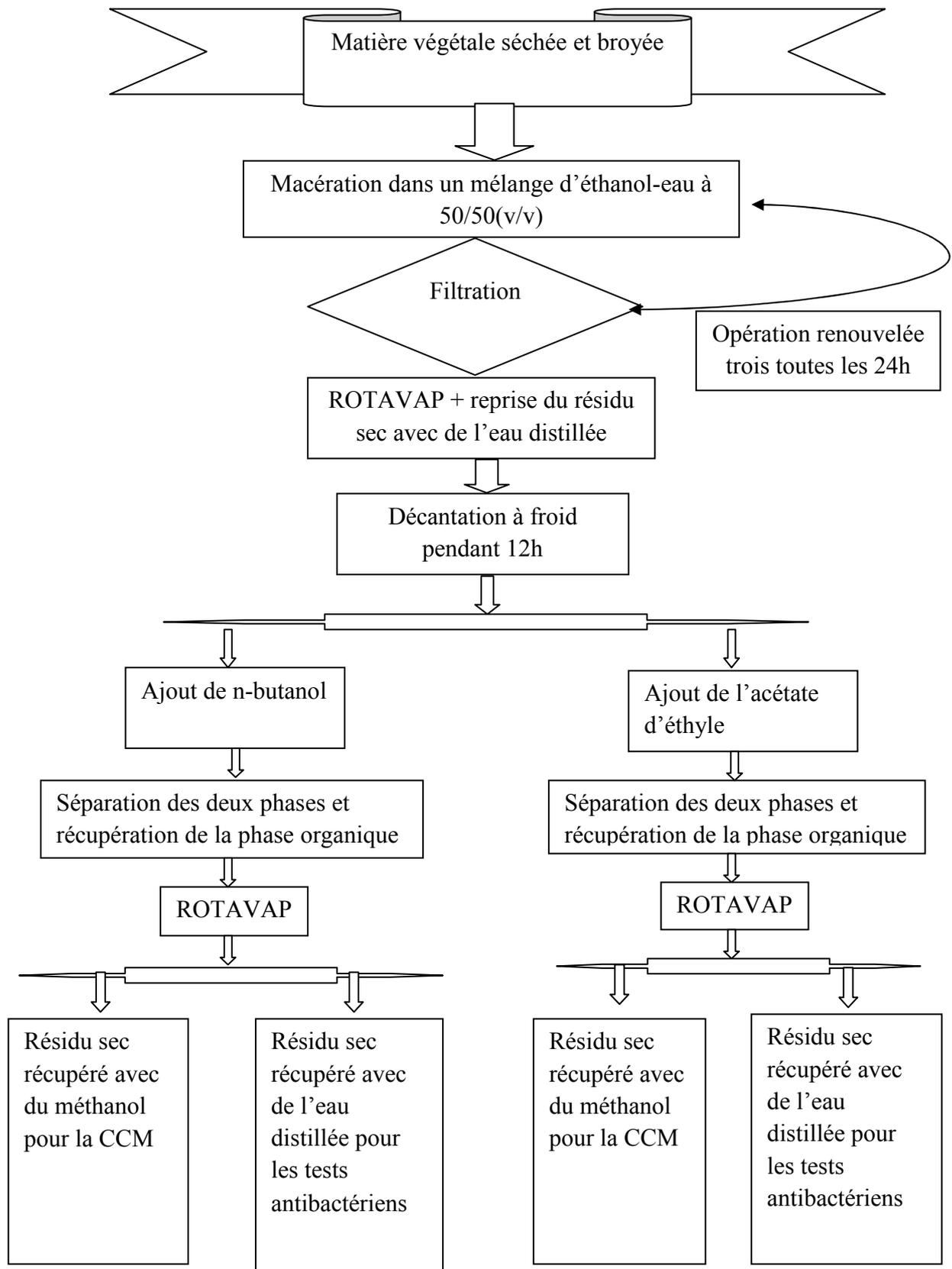
Cette opération est renouvelée trois fois toutes les 24 heures. Après évaporation à sec sous pression réduite (ROTAVAP) des macérations hydro alcooliques, le résidu sec est repris dans de l'eau distillée bouillante qui solubilise quantitativement les flavonoïdes.

Une décantation à froid (12 heures) est réalisée, le contenu flavonique global est partitionné en deux phases par deux solvants organiques spécifiques : phase acétate d'éthyle et phase n- butanol.

Après évaporation à sec des phases acétate et n-butanol les extraits collectés sont soumis à deux traitements différents :

- Une partie de l'extrait est reprise avec du méthanol pour le diagnostic sur CCM analytique.
- L'autre partie du même extrait est reprise avec de l'eau distillée puis conservée à 4°C à l'obscurité pour les tests microbiologiques.

Le schéma suivant (figure III-4) présente les différentes étapes de l'extraction des flavonoïdes.



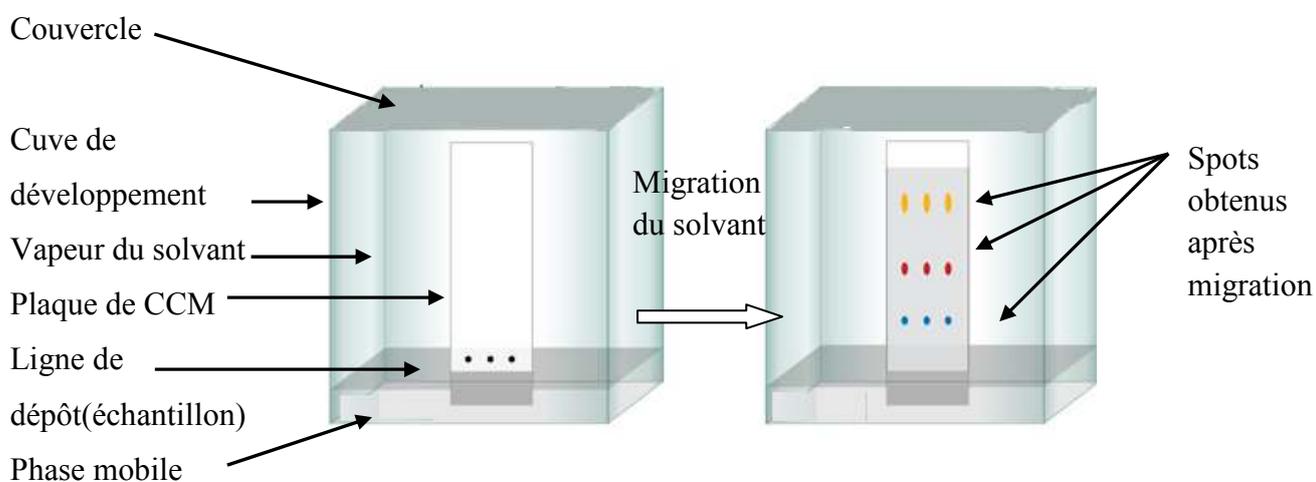
**Figure III-5** : Protocole de l'extraction des flavonoïdes [3]

### III-2-3- Analyse chromatographique sur couche mince (CCM) des flavonoïdes :

- **Principe de la technique et appareillage [ 4 ] :**

La chromatographie sur couche mince repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile, nommé éluant, est un solvant ou un mélange de solvant qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

On dépose sur la phase stationnaire l'échantillon à analyser et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase stationnaire en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. La figure III-5 représente les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince.



**Figure III-6:** schéma représentant l'appareillage et le principe de la technique CCM [5].

- **Mode opératoire**

Pour réaliser ce type d'analyse, il faut le matériel suivant :

**a) Préparation de la phase stationnaire (adsorbant et plaques chromatographiques):**

Les adsorbants les plus employés en CCM sont :

-Gel de silice.

-Alumine ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ).

- Polyamide

L'adsorbant est fixée sur un support solide appelé plaque chromatographique.

### **b- Préparation des plaques chromatographiques**

Pour la préparation il faut :

-des supports de couches minces (plaques de verre) ; Ce dernier peut être une plaque de verre ou une feuille d'aluminium ou de polyester (plastique rigide). Les dimensions standard sont 20x20cm et parfois 10x10 cm ou 5x7 cm.

-la phase stationnaire (gel de silice).

On prépare un mélange homogène de phase stationnaire et d'eau, on étale selon l'épaisseur désirée. On laisse ensuite sécher à l'air ces plaques puis on les place sur un portoir dans une étuve afin de les activer.

**Tableau III-1** : Préparation du support en CCM [5]

Support(mécanisme de séparation)	Proportion pour 5 plaques (20x20 cm)	Durée de séchage et d'activation	Espèces moléculaires séparées
Silice (adsorption)	30g+ 60 ml d'eau	Air=24h 110°C=30 min	-la plupart des molécules organiques simples. -molécules polaires. -substances électrophiles. -substances de haut poids moléculaire.

### **c- Préparation de la phase mobile**

La phase mobile est un liquide non miscible avec la phase stationnaire et choisi en fonction de la polarité des substances à séparer. Elle est constituée, en général, d'un

mélange de différents solvants organiques comme dans le cas de cette étude où nous avons utilisé un mélange de : toluène, méthanol et éthanol.

#### **d- Préparation de la cuve chromatographique**

La phase mobile est située au fond de la cuve chromatographique et monte par capillarité à partir du fond de la plaque qui y est trempé. Il faut une hauteur de 1 à 2 cm de phase mobile au fond de la cuve. On laisse saturer la cuve.

- **Conduite de la chromatographie :**

##### **a- Dépôt de l'échantillon**

Déposer l'échantillon s'appelle « charger » la plaque. L'échantillon est mis en solution avec précaution dans un faible volume de solvant qui sera ensuite évaporé. On trace sur la plaque à 1 cm du bord inférieur une ligne très fine au crayon de papier qui servira à repérer les dépôts ; on veillera à ne surtout pas abîmer la surface de la plaque. L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette sur la couche d'adsorbant en prenant soin de ne pas la détériorer.

##### **b- Développement des plaques**

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. On introduit la plaque verticalement dans la cuve, une fois les dépôts bien secs, doucement, sans remous. On ferme la cuve et on y touche plus jusqu'à la fin du développement. L'éluant ne doit pas être en contact avec la tache de produit. Pendant toute la durée de l'élution, la cuve restera fermée et ne devra pas être déplacée. Par effet de capillarité, le solvant monte, entraînant avec lui les composants de l'échantillon à des vitesses différentes selon leur distribution entre les deux phases utilisées d'où leur séparation. Quand la phase mobile a migré au 2/3 ou au 3/4 de la hauteur de la plaque, on enlève celle-ci, on la pose à plat pour la faire sécher et on relève tout de suite, d'un trait de crayon la position du fond du solvant.

### **c- Révélation [6] :**

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les taches visibles par un procédé de révélation qui peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques.

**\*Révélation aux UV** : qui permet de mettre en évidence sous forme des taches des substances qui absorbent les UV entre 254 nm et 365 nm.

**\*Révélation par des méthodes chimiques** : ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler.

### **d- Identification des flavonoïdes :**

Les spots flavoniques représentant les constituants du dépôt ont été caractérisés par leur fluorescence (couleur) sous lampe UV et leur rapport frontal  $R_f$  (le rapport de la distance parcourue par la tache sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant). La valeur de  $R_f$  est comprise entre 0 (produit ne migrant pas) et 1 (produit n'étant pas retenu).

#### **❖ Structure – $R_f$**

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité :

- Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de  $R_f$  (0,00-0,25)
- Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de  $R_f$  comprises entre (0,3-0,5)
- Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de  $R_f$  (0,5-0,75).

#### **❖ Structure-fluorescence :**

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus utilisée pour la détermination de la structure des flavonoïdes.

### **III-3- Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et des flavonoïdes de l'*Artemisia campestris* :**

Les plantes aromatiques et médicinales ont un spectre d'action très large du point de vue d'activité antibactérienne car elles possèdent le pouvoir d'inhiber la croissance des bactéries, des moisissures et des levures.

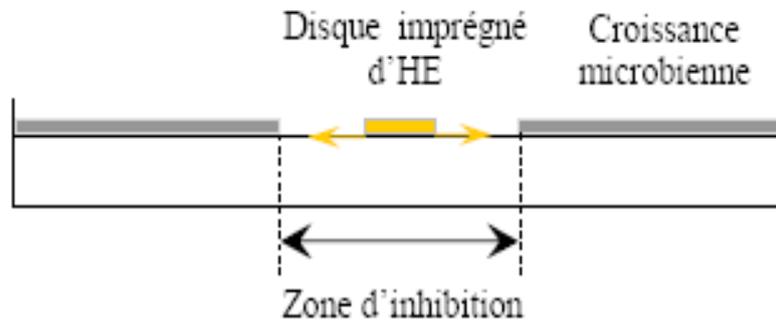
Nous avons appliqué la technique par contact direct dite « aromatogramme » pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* L. et des flavonoïdes.

#### **III-3-1-Diffusion sur gélose :**

La diffusion sur gélose est une méthode largement utilisée pour déterminer l'existence de l'activité antibactérienne qui se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour de la substance à tester.

Cette méthode est réalisée en milieu gélosé dans des boîtes de pétri. [7]

Le contact se fait par l'intermédiaire des disques de papier de Wathman de 9mm de diamètre stérilisés précédemment imprégnés de substances à tester. Les disques sont déposés sur la surface d'une gélose uniformémentensemencée d'une suspension de bactérie à étudier. Chaque substance diffuse à partir du disque sur la gélose et détermine un gradient de concentration. On remarque alors une croissance de bactérie sur toute la surface à l'exception d'une zone autour du disque qui reste indemne de colonies, cette zone est appelée « zone d'inhibition », cette dernière est le critère qui détermine la résistance ou la sensibilité de la bactérie vis-à-vis de la substance antibiotique.



**Figure III-7:** Aromatogramme sur boîte de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle

### III-3-2- Les microorganismes testés

Le nombre de microorganismes testés, lors de cette étude est de 4 souches bactériennes, provenant du laboratoire de microbiologie de l'hôpital de Faroudja de Blida. Les souches testées sont :

- 1) *Escherichia coli*
- 2) *Staphylococcus aureus*
- 3) *Klebsiella pneumoniae*
- 4) *Enterobacter aerogenes*

#### ❖ Caractéristiques des souches :

**1-*Escherichia coli*** a été découverte en 1885 par T. Escherich. C'est un bacille à gram négatif de  $2\mu$  de long et de  $0,6\mu$  de largeur, il peut être mobile ou immobile, enveloppé d'une paroi fine et complexe parfois capsulé, une couche de peptidoglycane adhère à la membrane externe. La bactérie possède un flagelle qui peut atteindre  $20\mu$  de longueur et des fimbriases.[8]

C'est un commensal de l'intestin de l'homme et des animaux représentant l'espèce aérobie, elle représente la plus importante flore digestive ( $10^6$  à  $10^9$  bactérie par gramme de selle).

*Escherichia coli* est le premier germe responsable de l'infection urinaire, de l'infection materno-fœtale, de prostatites, de suppurations divers à partir de la flore digestive (infection des voies biliaires, péritonites, salpingites et infections postopératoire) ; toutes ces infections peuvent se compliquer en septicémie [9].

**2-Staphylococcus aureus** est un germe ubiquitaire qui vit dans le sol, l'air et l'eau. Elle a été découverte par **Rosenbach** **1884**. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme, on le trouve normalement dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles, au niveau des périnées ou des aisselles.

Le tiers des individus sains est porteur de *Staphylococcus aureus* au niveau des fosses nasales. En milieu hospitalier, un malade peut facilement développer une infection à partir des bactéries de sa propre flore ou être contaminé par transmission manuportée, c'est un agent majeur d'infections nosocomiales. Un aliment faiblement contaminé lors de la préparation et conservé à température ambiante qui permet la multiplication d'une souche produisant l'enterotoxine peut être responsable d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) [10]

**3-Klebsiella pneumoniae** : Cette bactérie vit dans l'environnement et dans la flore digestive humaine et animale [11]. Ce bacille atteint fréquemment les malades affaiblis, éthyliques et/ou tabagiques, diabétiques, immunodéprimés ou mal nourris, déjà hospitalisés ou ayant reçu un traitement antibiotique. Ces pneumonies représentent un à trois des pneumonies bactériennes aiguës. [12]

**4-Enterobacter aerogenes** est une nosocomiale et la bactérie pathogène qui provoque des infections opportunistes, y compris la plupart des types d'infections. Les espèces *Enterobacter* peuvent également provoquer diverses infections communautaires. Certaines souches peuvent devenir résistantes aux traitements, du fait de leur colonisation dans les

milieux hospitaliers. Cependant, la majorité de ces souches sont sensibles à la plupart des antibiotiques conçus pour cette classe de bactéries.

Certaines des infections causées par *E. aerogenes* sont causées par des procédures chirurgicales. *E. aerogenes* est généralement trouvé dans le corps humain tractus gastro-intestinal et ne provoquent généralement pas de maladie chez les individus sains. Il a été constaté qu'elle vit dans divers déchets, produits chimiques d'hygiène, et le sol. La bactérie a également une certaine importance commerciale - le gaz hydrogène produit pendant la fermentation a été expérimenté avec l'aide de la mélasse comme substrat.

### **III-3-3-Mode opératoire**

#### **a)Milieu**

-Gélose Mueller Hinton (MH), coulée en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm.

- Les géloses sont solidifiées avant l'emploi.

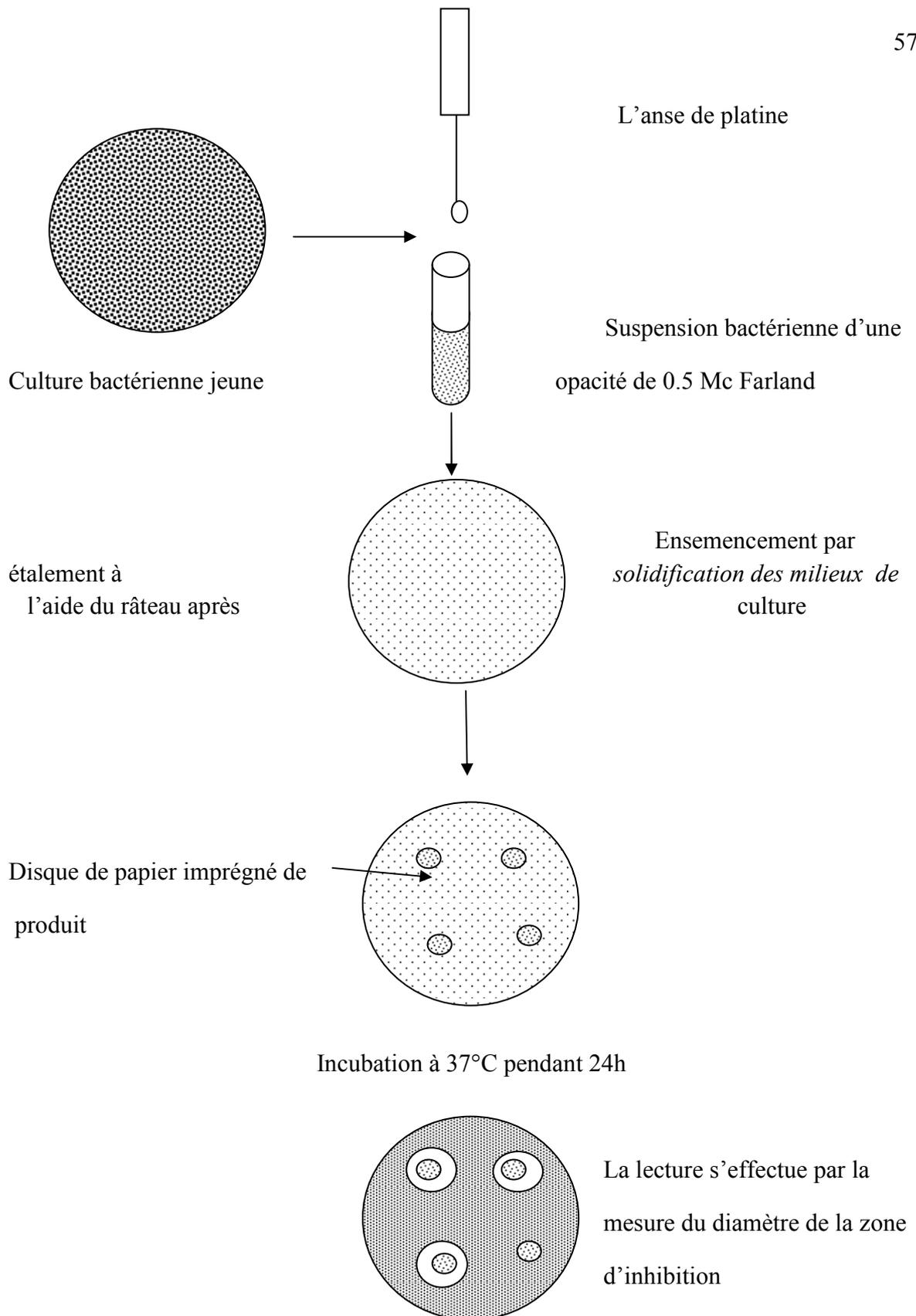
#### **b- Croissance des germes cibles**

Les germes cibles utilisés ont été cultivés sur gélose nutritive, les boîtes ainsiensemencées sont incubées à 37° C pendant 18 heures.

**c- Préparation de la suspension bactérienne :** Afin d'obtenir une suspension bactérienne, des tubes stériles à bouchon à vis contenant de l'eau physiologique (NaCl 9‰) ont été inoculés à partir des cultures bactériennes pures et jeunes ultérieurement préparées. Ces tubes ont été agités pour bien disperser les amas de bactéries et obtenir une suspension légèrement opale ensuite leur densités optiques (DO) ont été mesurées à 625 nm .

**d- Principe:** Des disques après avoir été imprégné d'une quantité de l'HE (dilution de 100%, 80%, 50%,20%) ou de d'extrait flavonique est déposé délicatement dans les boîtes de pétrie contenant le milieu Mueller-Hinton préalablementensemencées suivant la méthode d'étalement par les germes cibles. Après diffusion des produits (HE et extrait flavoniques) dans la gélose pendant 30min à température ambiante, les boîtes sont incubées à 37° C pendant 24h. La lecture s'effectue après 24h d'incubation par la mesure du diamètre de zone d'inhibition.

**e-Lecture :** La présence de zone claire autour du disque exprime la présence de l'activité inhibitrice c'est-à-dire que le micro-organisme est sensible à la substance avec laquelle été imprégné le disque. A la sortie de l'incubateur, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en mm.



**Figure III-8:** Schéma représentant les différentes étapes de la réalisation d'un Aromatogramme

### **III-3-4-Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur un milieu solide :**

La concentration minimale inhibitrice dite CMI est définie comme étant la plus petite concentration de l'agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un micro-organisme après 24 heures d'incubation pour les bactéries et 48 heures pour les levures.

#### **III-3-4-1-Préparation de dilution :**

La préparation de dilution consiste à préparer une série de tubes contenant des concentrations différentes d'HE de l'*Artemisia campestris* de 100%, 80%, 50% et 20%.

L'HE est dissoute dans de l'eau physiologique à laquelle on a additionné le Tween 80 à raison de 1% pour permettre une meilleur dissolution de cette HE.

## Chapitre IV :

### RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### IV-1- Extraction de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris L.* :

L'huile essentielle de l'armoise champêtre a été extraite par hydrodistillation à l'échelle laboratoire. L'étude du rendement en huile essentielle a été effectuée au premier temps en fonction de la partie aérienne de la plante ensuite selon les différentes parties de la plante (plante entière (partie aérienne), feuilles et tiges séparées) en fonction de certains paramètres pouvant l'influencer le rendement en huile essentielle tels que : la durée d'extraction, la masse végétale, la durée de séchage) et aussi en fonction du mode de séchage (pour la plante entière).

#### IV-1-a-Détermination du rendement en huile essentielle en fonction de la partie de la plante :

En premier temps, et dans le but de savoir si les différentes parties de la plante renferment de l'huile essentielle, des essais préliminaires sont effectués sur les tiges et sur les feuilles séparément pour déterminer l'organe le plus riche de cette substance. La durée d'extraction est fixée à 60 min. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant.

**Tableau IV-1** : Le rendement en huile essentielle en fonction de la partie de la plante

La partie de la plante	Tiges	Feuilles
Masse de matière végétale (g)	70	70
Le rendement en huile essentielle (%)	0,24	0,88

Les résultats donnés dans le tableau IV-1 montrent que les huiles essentielles se trouvent dans les feuilles et dans les tiges, ce qui nous mène à conclure que les glandes sécrétrices qui contiennent l'huile essentielle se trouvent dans les feuilles et dans les tiges avec des concentrations différentes. Comparativement aux travaux réalisés par Akrouf [1] sur

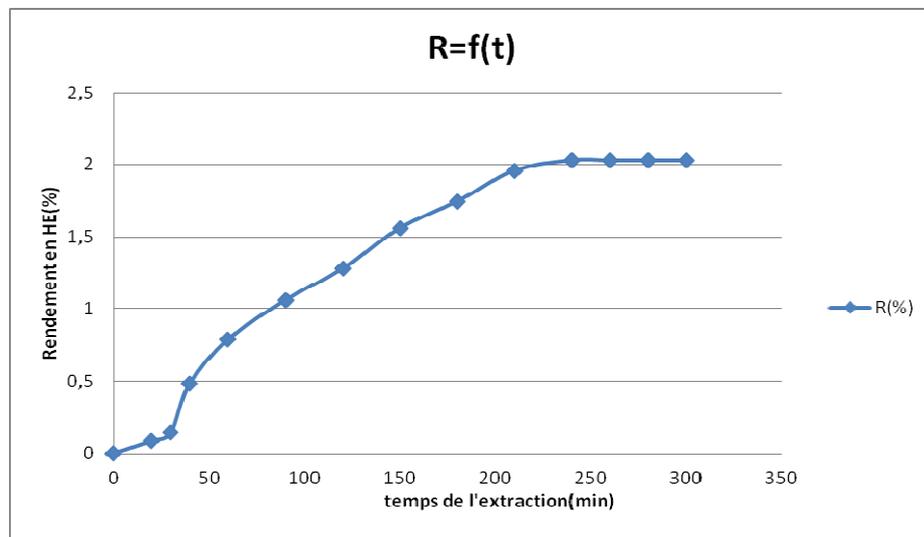
l'espèce *Artemisia campestris* L, qui a trouvé que les huiles essentielles de cette plante sont localisées principalement dans les feuilles et que les tiges n'en contiennent pas.

#### **IV-1-b- Variation du rendement en huile essentielle en fonction du temps d'extraction :**

La durée d'extraction est théoriquement le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile de récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus. Lors de cette étude, un suivi cinétique a été réalisé sur l'extraction de l'huile essentielle des différentes parties de la plante (plante entière (partie aérienne), feuilles et tiges séparément) par hydrodistillation.

##### **➤ Evolution du rendement en huile essentielle extraite de la plante entière en fonction du temps.**

Pour l'étude de l'influence de la durée d'extraction sur le rendement en huile essentielle de la plante entière (partie aérienne). Nous avons fixé la masse végétale à 70g, Le ballon est rempli à 2/3 d'eau. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure IV-1.



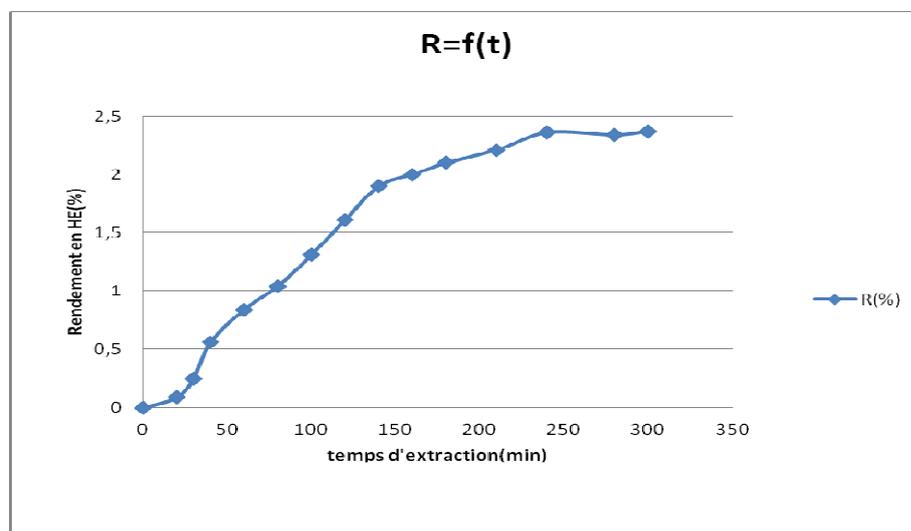
**Figure IV-1 :** Variation du rendement en huile essentielle de la partie aérienne de l'*A.campestris* L ; en fonction du temps de l'extraction.

L'allure générale de la courbe représentant le rendement en fonction du temps est croissante. Le rendement augmente progressivement jusqu'à atteindre un rendement égale à 2,028% au bout de 240 min et la courbe tend vers un pseudo palier, qui correspond au

rendement maximum possible d'être atteint dans les conditions expérimentales pour une matrice donnée.

➤ **Evolution du rendement en huile essentielle extraite à partir des feuilles en fonction du temps.**

Les résultats sont présentés dans la figure IV-2.



**Figure IV- 2:** évolution du rendement en huile essentielle des feuilles de l'A.campestris en fonction du temps de l'extraction.

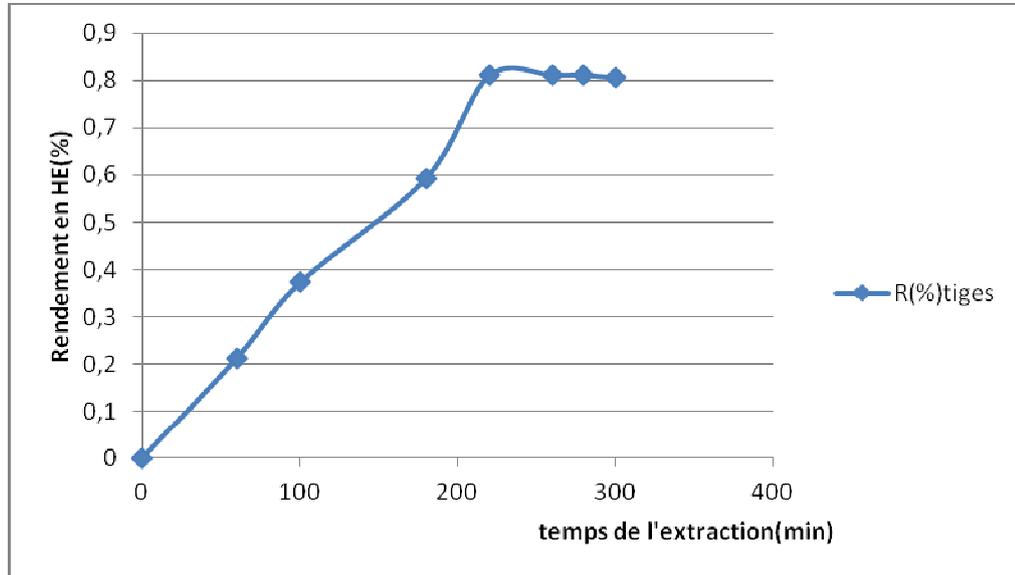
D'après les résultats obtenus on remarque que :

La première goutte d'huile essentielle est récupérée au bout d'un temps égal à 20 min.

L'allure générale de la courbe représentant le rendement en fonction du temps est croissante. Il augmente progressivement jusqu'à atteindre un maximum égale à 2,36% .Au bout de 240 min, un pseudo palier est enregistré et au delà de ce temps la variation du rendement devient presque négligeable.

➤ **Evolution du rendement en huile essentielle extraite à partir des tiges en fonction du temps.**

Les résultats sont représentés dans le graphe suivant.

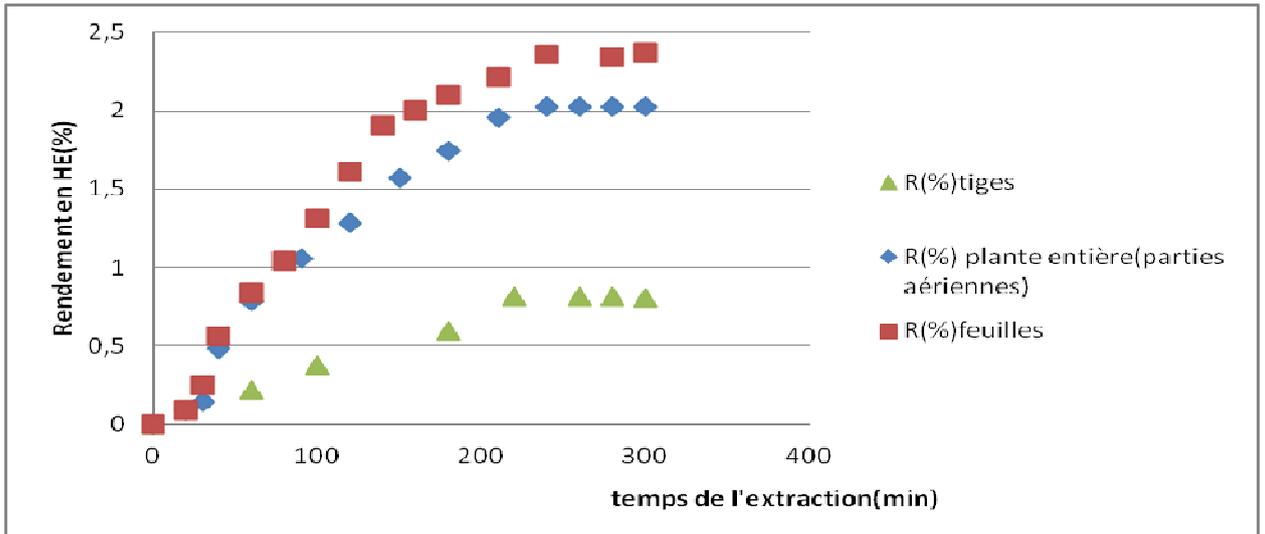


**Figure IV- 3:** Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle des tiges de l'*Artemisia campestris* :

A partir des résultats obtenus, on peut constater que la première goutte d'huile essentielle est obtenue au bout de 60 min par contre, celle extraite de la feuille est obtenue après 20 min d'extraction. Cela pourrait être dû à la structure morphologique de la feuille et de la tige qui est tout à fait différente ainsi qu'à la localisation des sites producteurs d'huiles essentielles dans les deux parties de la plante.

Le rendement en huile essentielle des tiges augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur maximale de 0,81% au bout d'un temps égale à 220 min. Au-delà de ce temps, le rendement atteint un plateau.

❖ Afin d'apprécier la contribution de la cinétique de chaque organe à la cinétique globale d'extraction de l'huile essentielle à partir d'un échantillon constitué de la plante entière (partie aérienne), de tiges et de feuilles séparés, nous avons regroupés les différents résultats donnés dans les figures précédentes dans le graphe suivant (figure IV-4).



**Figure IV-4** : Contribution des différents organes à la cinétique d'extraction de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L.

Ces courbes montrent qu'au cours de vingt minutes c'est l'extraction de l'huile essentielle à partir des feuilles qui confère sa cinétique au processus globale, l'extraction de l'huile essentielle à partir des tiges est relativement négligeable devant celle des feuilles et celle de la plante entière (partie aérienne).

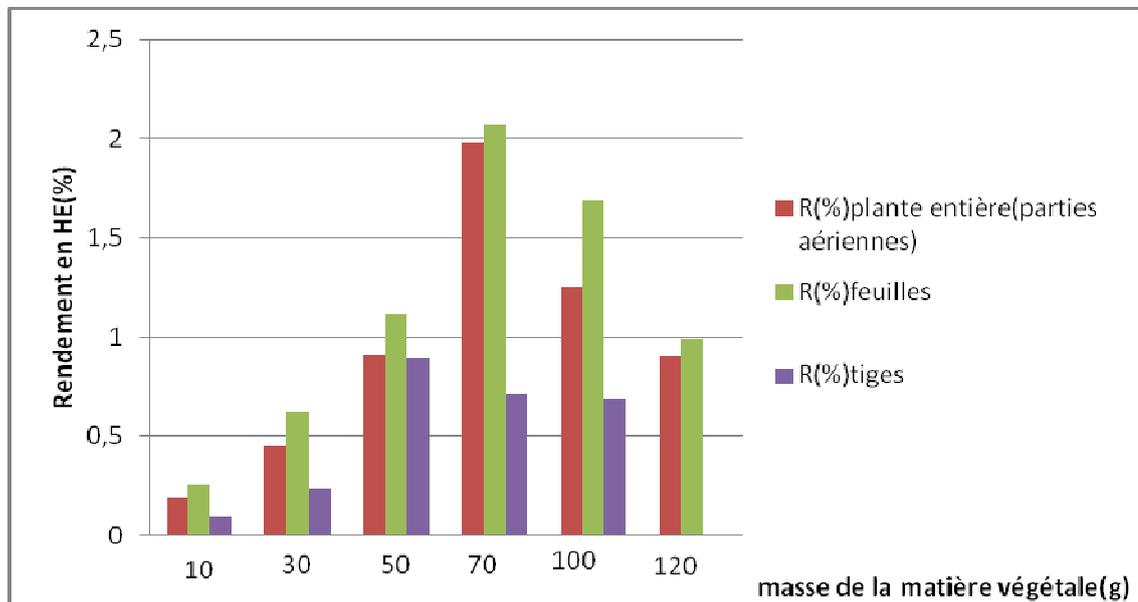
L'évolution du rendement en huile essentielle extraite à partir des feuilles et celle de la partie aérienne, nous observons une progression assez lente jusqu'au environ 35min, suivie d'une augmentation plus rapide et l'apparition d'un palier à partir de 240 min. Cette cinétique suggère que l'huile essentielle est située dans des glandes endogènes au sein de la feuille, ce qui est en accord avec des études menées sur quelques *Artemisia* [2], les auteurs ont signalé la présence d'huile essentielle dans des glandes endogènes.

Concernant l'évolution du rendement de l'extraction de l'huile essentielle à partir des tiges, nous observons que la récupération de la première goutte d'huile essentielle est au bout de 60min. Ce qui nous permet de suggérer que l'huile essentielle dans ce cas est difficilement accessible à la vapeur d'eau et laisse penser qu'elle serait située dans des sites endogènes.

#### IV-1-c- Variation du rendement en huile essentielle en fonction de la masse végétale :

Afin d'étudier l'influence de la masse végétale sur le rendement en huile essentielle, nous avons effectuée différentes séries d'essais pour l'extraction de l'huile essentielle à partir d'un échantillon constitué de feuilles et de tiges séparés et d'un autre échantillon constitué de la plante entière (partie aérienne). Nous avons suivi l'évolution du rendement en fonction de la masse. Les résultats obtenus sont représentés par le graphe suivant. Une série d'expériences est effectuée pour chaque partie de la plante.

Le paramètre temps d'extraction pour chaque essai est considéré constant.



**Figure IV-5 :** influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle

D'après les résultats, le rendement en huile essentielle varie en fonction de la masse de la matière végétale. On remarque aussi que le rendement varie en fonction de l'organe de la plante utilisée où le meilleur rendement en huile essentielle est obtenu uniquement avec les feuilles, il atteint le maximum lorsque la masse des feuilles est égale à 70g. Quant à l'influence de la masse des tiges, on observe que le meilleur rendement est obtenu lorsque la masse des tiges est égale à 50g. Toutefois, le rendement en huile essentielle des tiges reste beaucoup moins important par rapport à celui des feuilles et même à celui de la

partie aérienne. De ce fait, on peut conclure que les glandes sécrétrices de cette plante sont concentrées dans les feuilles.

Ces variations du rendement sont probablement liées au degré de tassement de la matière, quand ce dernier est insuffisant ou excessifs, il impose à la vapeur d'emprunter des chemins préférentiels. De ce fait, à certains endroits ; la vapeur n'entre pas en contact avec la matière végétale et en conséquence le rendement diminue.

#### **IV-1-d-Influence de la durée de séchage sur le rendement en huile essentielle :**

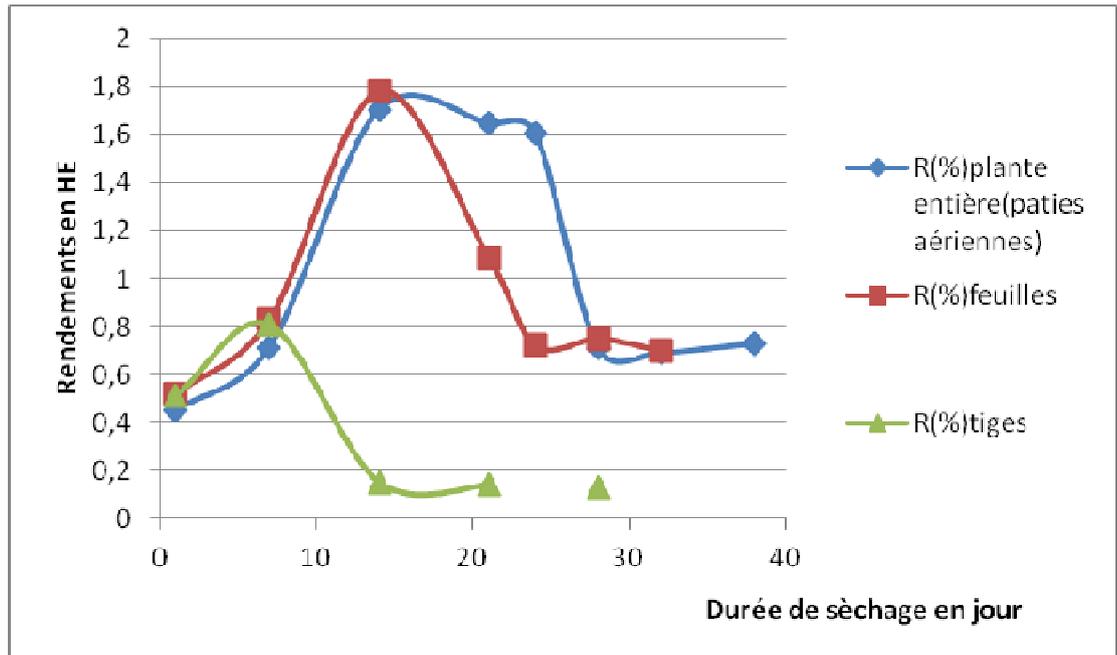
Le but de séchage est d'éviter la modification des caractéristiques chimiques et biologiques des principes actifs au cours de conservation sous l'effet des facteurs externes et des réactions internes provoqués par l'activité enzymatique des cellules végétales [1].

Le séchage naturel consiste à exposer le matériel végétal directement au soleil ou sous abri loin de lumière jusqu'à un taux minimal d'humidité.

Nous avons suivi l'évolution du rendement en huile essentielle pour trois lots d'échantillon exposé à l'air libre et à l'abri du soleil.

- le premier est constitué uniquement de feuilles ;
- le deuxième lot est composé de tiges.
- Le troisième lot représente la partie aérienne de la plante entière.

Les résultats obtenus sont représentés dans le graphe suivant :



**Figure IV- 6** : Influence de la durée de séchage sur le rendement

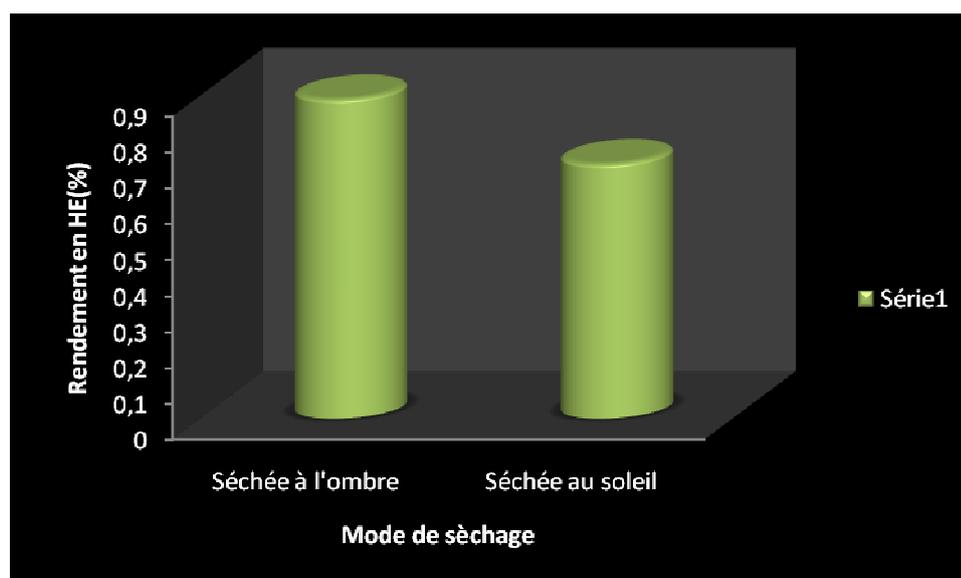
Selon les résultats obtenus, on aperçoit que l'évolution du rendement en huile essentielle varie en fonction du temps de séchage et aussi selon l'organe de la plante utilisé. On remarque que le séchage de la plante pour les trois lots à l'air libre durant la première semaine a permis d'augmenter le rendement.

- Le maximum est observé au 14<sup>ème</sup> jour pour la plante entière et pour les feuilles, tandis que pour les tiges, le maximum est observé au 7<sup>ème</sup> jour.

L'augmentation du rendement en huile essentielle pendant la première phase des courbes est expliquée par un phénomène biologique. La plante après sa récolte, continue de vivre et la biosynthèse des terpènes et dérivés s'accroît durant les premiers jours, c'est un comportement de lutte contre le stress hydrique donc cela explique la première phase. Mais après la mort définitive de la plante, l'activité de biosynthèse s'arrête et les pertes en huiles essentielles ne seront plus compensées d'où la diminution de la deuxième phase [3].

#### IV-1-e-Influence du mode de séchage de la plante sur le rendement en huile essentielle :

Au cours de cette étude, nous avons procédé à l'extraction de l'huile essentielle, en utilisant la plante séchée à l'ombre et séchée au soleil. Cette étape a été réalisée après que la masse de la matière végétale soit complètement stabilisée et on a obtenu l'histogramme suivant :



**Figure IV-7:** variation du rendement en huile essentielle de l'*A.campestris* L. en fonction du mode de séchage.

Notre travail est confirmé par une autre étude qui a été déjà réalisée [4] sur l'influence du séchage sur le rendement en huile essentielle. Deux espèces de romarin (*Rosmarinus eriocalix* et *Rosmarinus officinalis*) sont soumises au séchage à l'air libre et a permis d'augmenter le rendement en HE. Ils ont remarqué que le rendement maximum est obtenu au 6ème jour de séchage pour *R. eriocalix* (2,2%) et au 8ème jour pour *R. officinalis* (2,1%). Ils ont constaté aussi que l'évolution du rendement en HE diffère selon que le séchage est effectué à l'air libre ou au soleil : dans le cas de *R. officinalis*, le séchage solaire s'accompagne d'une augmentation de la teneur en huile essentielle, qui reste toujours inférieure à celle obtenue lors du séchage à l'ombre. Il a remarqué aussi que le rendement maximum est également obtenu plus rapidement (soit 1,2% au 6ème jour au soleil, contre 2,1% au 8ème jour à l'ombre).

## IV-1-1- : Caractérisation de l'huile essentielle de l'*artemisia campestris* L.

Dans cette partie, nous avons déterminé les caractères organoleptiques, les propriétés physico-chimiques. Ces propriétés constituent un moyen de vérification et de contrôle de qualité de l'huile essentielle ;

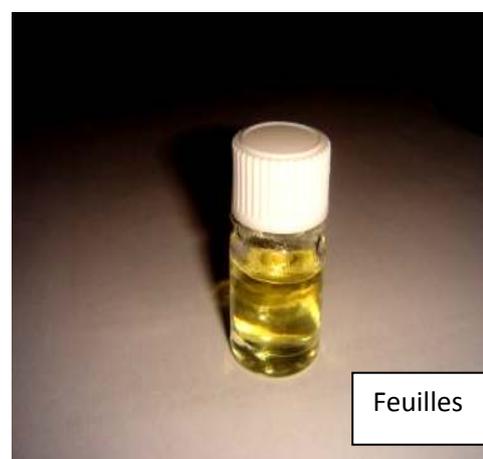
### IV-1-1-a- Caractéristiques organoleptiques :

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* ont été notées à l'issue de sa récupération.

**Tableau IV-2** : propriétés organoleptiques de l'HE de l'*artemisia campestris* extraite par HD

	HE (plante entière)	HE des feuilles	HE des tiges
<b>Aspect</b>	Liquide limpide	Liquide limpide	Liquide limpide
<b>Couleur</b>	Jaune	Jaune	Jaune
<b>Odeur</b>	Aromatique caractéristique de la plante et intense	Aromatique caractéristique de la plante et intense	Aromatique caractéristique de la plante et très intense

Il est important de noter que l'HE des différentes parties étudiées présente les mêmes caractéristiques organoleptiques.





**Figure IV-8:** Huile essentielle de l'armoise champêtre

#### **IV-1-1-b-Caractéristiques physiques de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* L.**

Les résultats obtenus sont les suivants :

**Tableau IV-3 : propriétés physiques de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris***

	<b>Partie aérienne</b>	<b>Feuilles</b>	<b>Tiges</b>
<b>Densité relative <math>d_{20}</math></b>	0,8852	0,8863	0,8831
<b>Indice de réfraction <math>\eta_D^T</math></b>	1,5568	1,5554	1,5547

#### **IV-1-1-c-Caractéristiques chimiques de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* L. :**

Les Caractéristiques chimiques de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* sont données par : l'indice d'acide( $I_A$ ), l'indice d'ester( $I_E$ ) et l'indice de saponification ( $I_s$ ). (voir l'appendice A)

**Tableau IV-4** : propriétés chimiques de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris*

	<b>Partie aérienne</b>	<b>Feuilles</b>	<b>Tiges</b>
<b>I<sub>A</sub></b>	1,683	1,683	1,112
<b>I<sub>S</sub></b>	224,4	280,5	252,45
<b>I<sub>E</sub></b>	222,717	278,817	251,328

- l'indice d'acide il nous donne un aperçu sur la qualité de l'huile essentielle, en effet, il représente la concentration totale en acide gras libres et donc plus l'indice acide est élevé moins bonne sera l'huile essentielle.
- L'indice de saponification nous révèle la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras, il caractérise le poids moyen de la matière grasse auquel il est inversement proportionnel : plus le poids moléculaire est élevé, plus l'indice de saponification est faible.
- D'après les résultats obtenus, l'indice de saponification de l'HE de l'*A.campestris* est très élevé et la différence entre ce dernier et l'indice d'acide ( $I_S - I_A$ ) nous donne la valeur de l'indice d'ester qui nous indique la présence d'une forte proportion en acide gras sous forme de triglycérides.

#### **IV-1-2- Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse :**

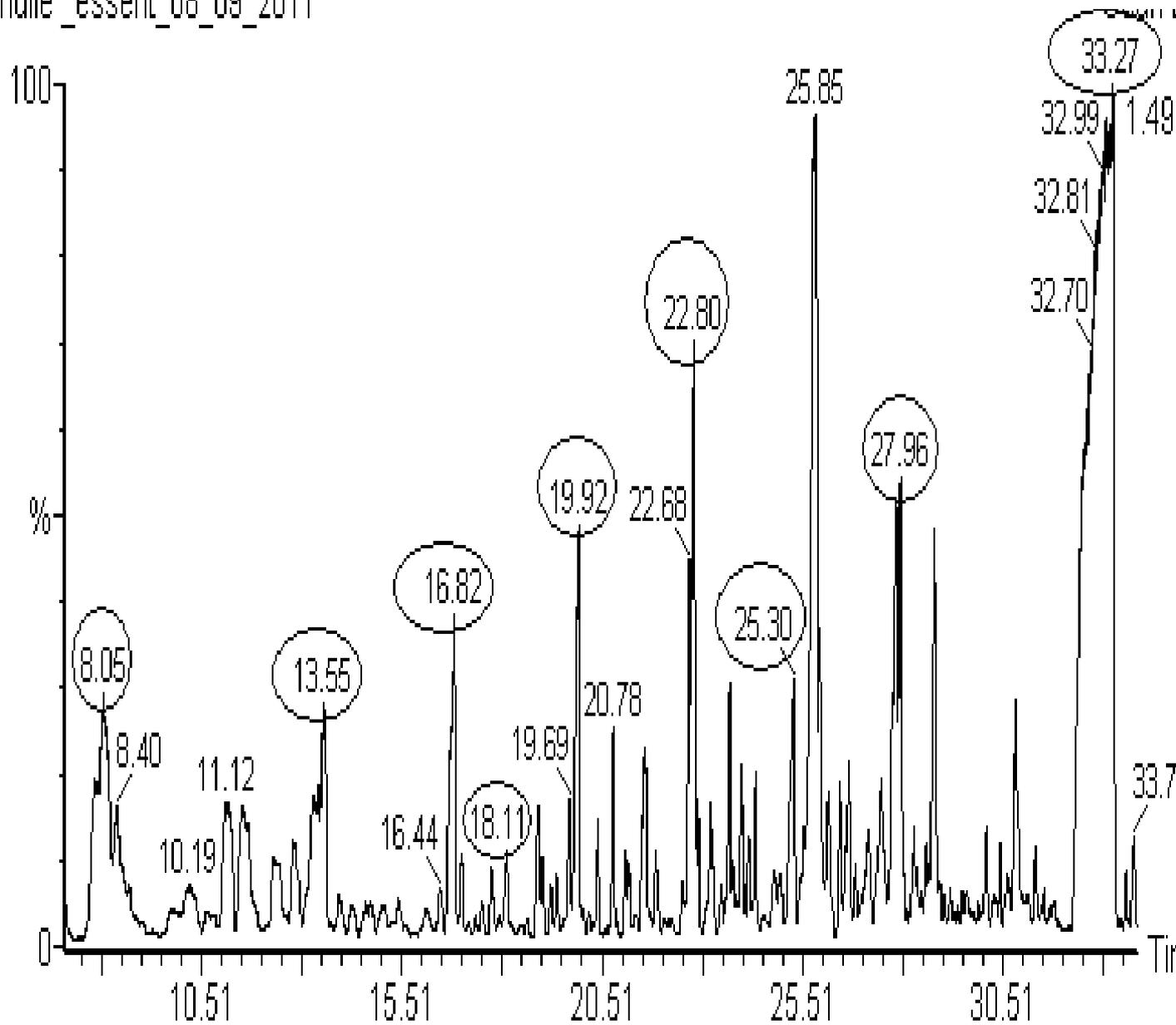
Le chromatogramme de l'huile essentielle obtenue par GC/MS est donné dans la figure IV-9. Le tableau IV-5 regroupe la composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle. L'identification des composés est confirmée par comparaison de leurs spectre de masse ion fragment caractéristiques obtenus expérimentalement à ceux inventoriés dans la banque de bibliothèques spectrales (Chemstation (Nist 98)).

Les spectres de masse des constituants identifiés sont données en annexe 3.

**Tableau IV-5 :** Constituants majoritaires de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. analysée par GC/MS.

N°	Temps de rétention (min)	Teneur relative (%)	Nom des Composés
1	08.05	2,75	$\alpha$ -pinène
2	13.55	3,04	Myrtenal
3	16.82	4,27	1-oxaspiro[2,5]oct-5-ène,8,8-diméthyl-4-méthylène
4	18.11	0,78	$\Omega$ -elemène
5	19.92	3,82	Lavandulyl acétate
6	22 .80	6,27	D-Germacrène
7	25.30	3,01	D-Nerolidol
8	27.96	5,44	T-Muurolol
9	33.27	59,82	5(6H)-Benzocyclooctènène,7-8-dihydro-8,8-diméthyl

huile\_essent\_08\_09\_2011

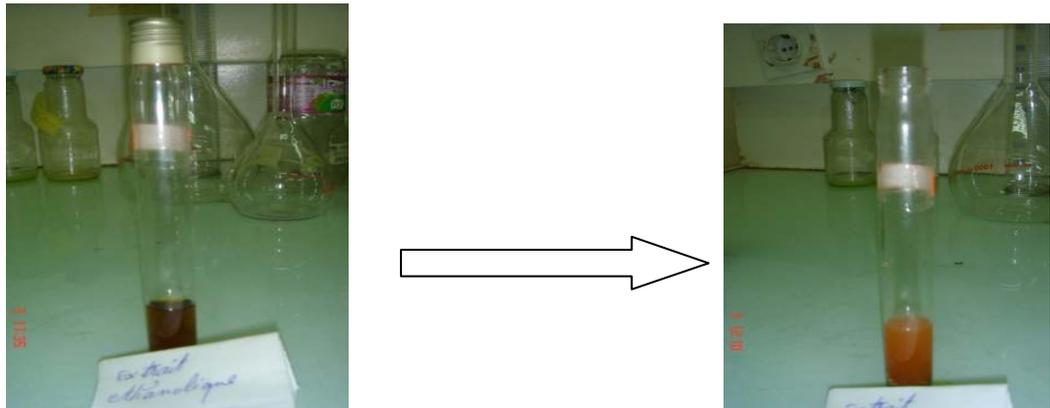


**Figure IV-9** : Identification des constituants de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. par GC/MS

## IV-2-Extraction des flavonoïdes

### IV-2-1--Mise en évidence des flavonoïdes

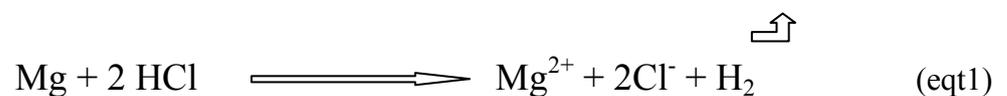
On observe un virage de couleur à l'orange, cette coloration implique la présence des flavonoïdes.



**Figure IV-10** : virage de couleur

Le virage de la couleur s'explique par les réactions suivantes :

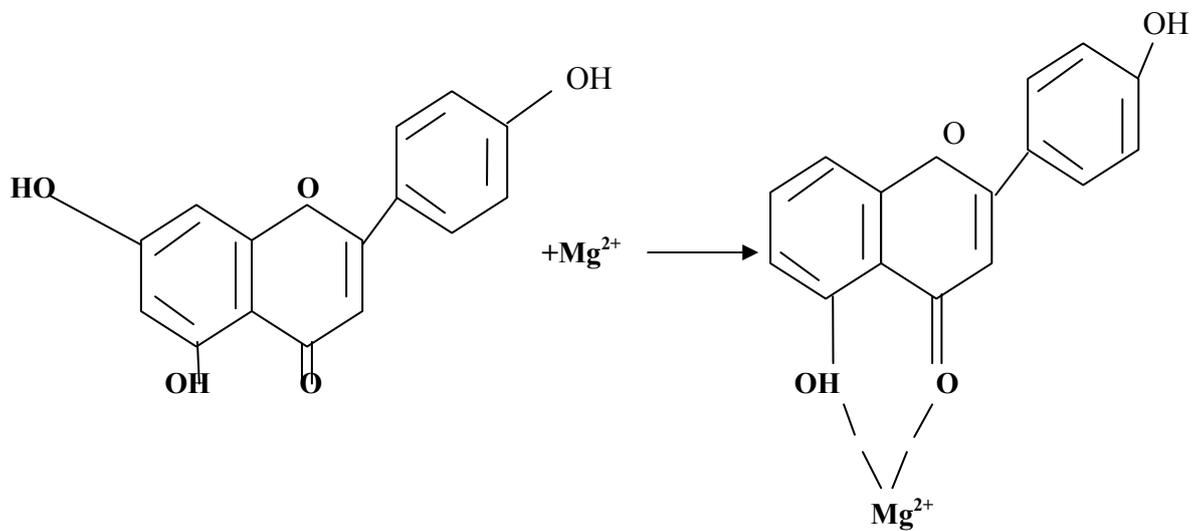
Les tournures de magnésium réagissent avec l'acide chlorhydrique en dégageant de l'hydrogène qui apparaît sous forme de barbotage et cela selon la réaction suivante :



Après quelques secondes, une coloration orange apparaît, cela démontre que l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  a formé un complexe avec les flavonoïdes contenus dans l'A.campestris L.

Grâce à leurs structures chimiques, les flavonoïdes peuvent facilement chélater l'ion  $\text{Mg}^{2+}$  en créant un composé complexe inactif.

Cette coloration illustre la formation du complexe entre le flavone et l'ion  $Mg^{2+}$ .



#### IV-2-2-Extraction des flavonoïdes :

L'extraction de la partie aérienne de l'*Artemisia campestris L.* par macération dans le mélange éthanol/eau (50/50 : v/v) et la partition entre les deux solvants nous ont permis d'obtenir les phases suivantes :

- Phase acétate d'éthyle.
- Phase n-butanol.

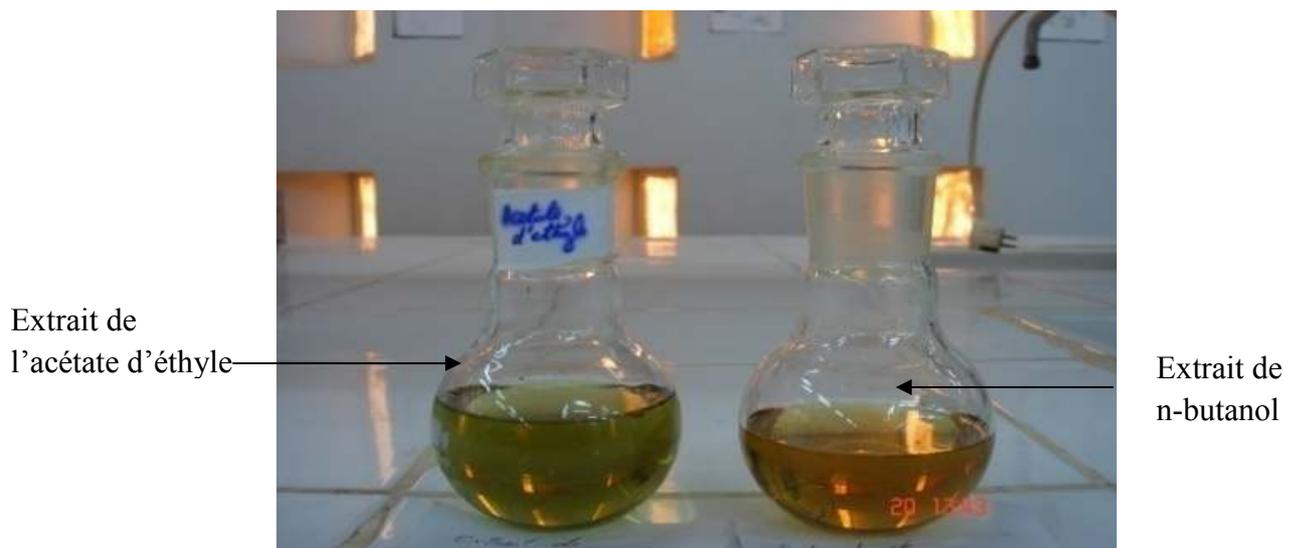
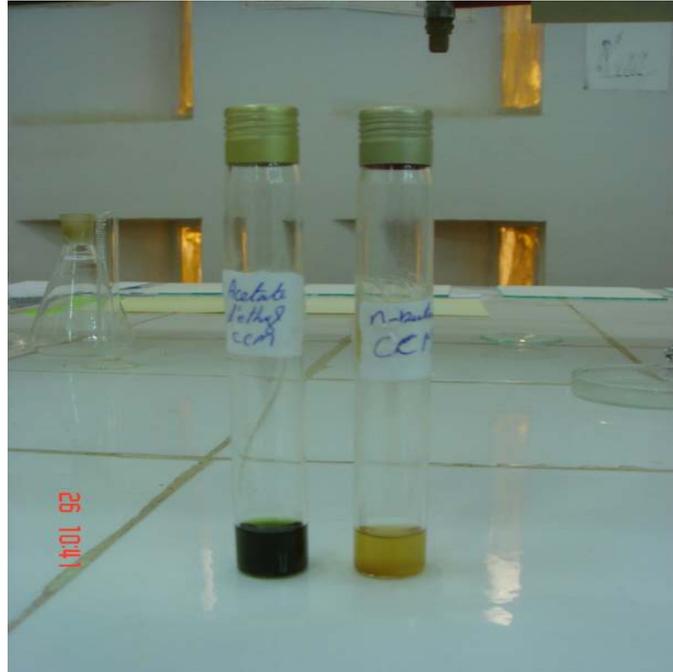


Figure IV-11: extrait de l'acétate d'éthyle et de n-butanol

Les deux extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol sont soumis au séchage à l'aide d'un évaporateur rotatif. Un résidu sec est récupéré ensuite il est repris avec du méthanol. Cette solution obtenue est un extrait du contenu flavonique qui a été obtenu après affrontement avec l'acétate d'éthyle et avec le n-butanol. Ces deux extraits flavoniques seront utilisés pour des fins analytiques.



**Figure IV-12** : extraits des contenus flavoniques utilisés pour CCM

### **IV-2-3- Chromatographie sur couche mince (CCM) :**

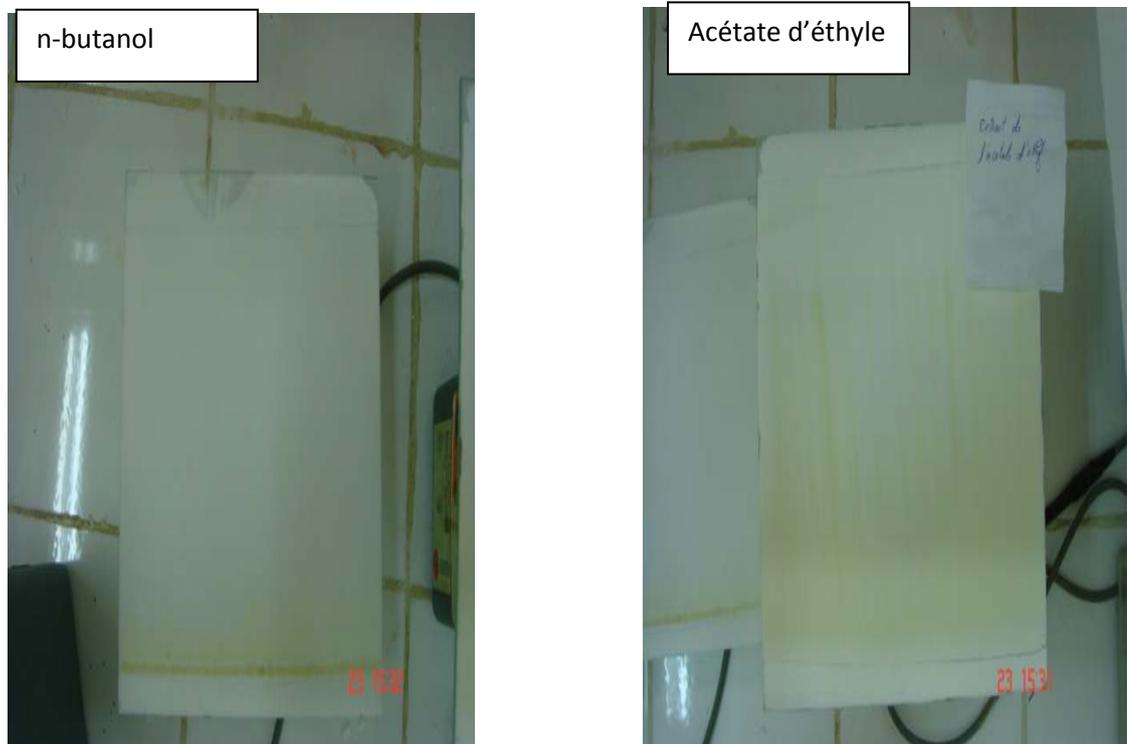
Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée. Deux méthodes de révélations sont utilisées : révélation chimique et révélation sous UV

La migration (verticale) est fonction de la polarité des substances, de la polarité de l'éluant (phase mobile) et du pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire [5].

- **Révélation chimique :** Dans cette étude nous avons utilisé deux types de plaques : gel de silice et polyamide . Les résultats sont représentés dans les chromatogrammes suivante :

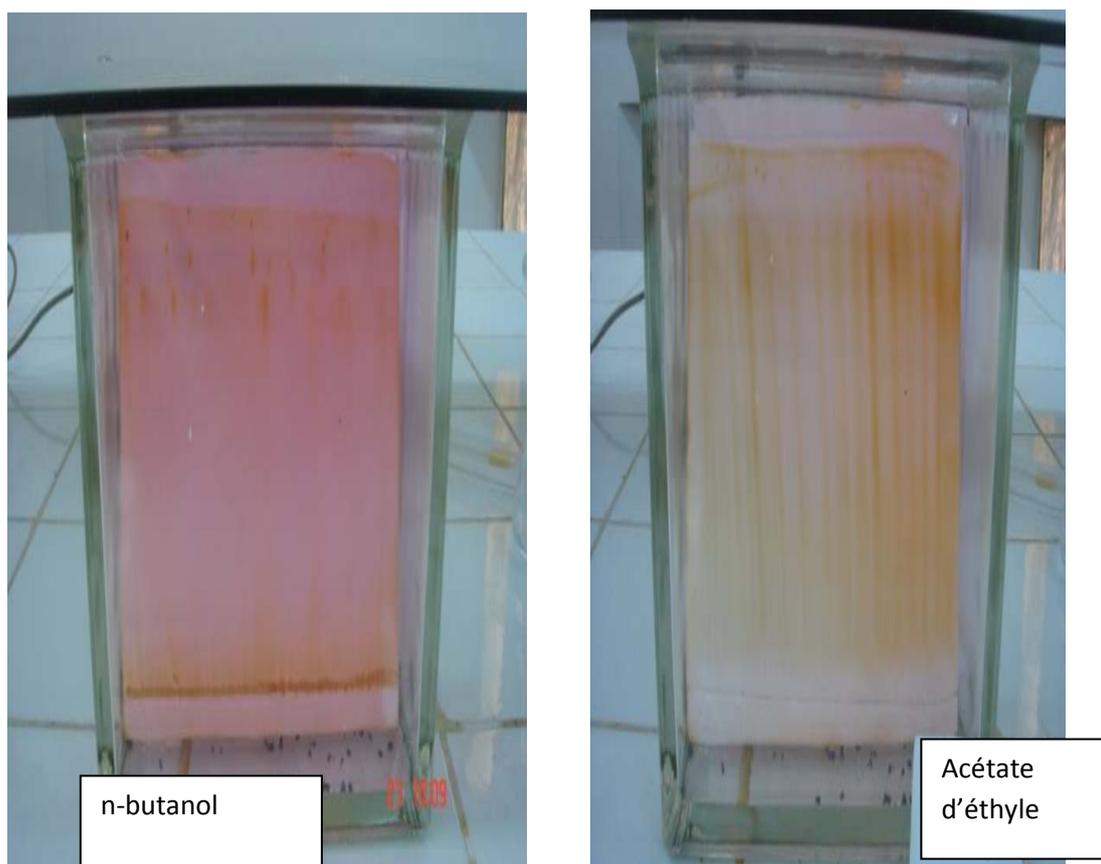
- **Pour les plaques du gel de silice :**

Les extraits flavoniques sont soumis à une chromatographie analytique sur couche minces de gel de silice sur des plaques en verre (le mode opératoire a été décrit dans le chapitre III). La migration s'est faite sur gel de silice en utilisant le système solvant: toluène/méthanol/éthanol (4/3/3 : V/V/V) pour les phases n-butanol et acétate d'éthyle.



**Figure IV-13 :** Plaques de gel de silice après migration et avant la révélation chimique (extraits flavoniques de l'acétate d'éthyle e et de n-butanol).

La révélation chimique sera réalisée en utilisant de l'iode.



**Figure IV-14 :** Plaques de gel de silice après migration et après la révélation chimique par l'iode (extraits flavoniques de l'acétate d'éthyle et de n-butanol).

La migration d'une tache sur un chromatogramme est qualifiée par son rapport frontal  $R_f$ .

Les valeurs sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau IV-6 :** résultats de CCM des extraits flavoniques de butanol et de l'acétate d'éthyle sur gel de silice :

<b>Rf (B)</b>	0,9509	0,9693	0,9018	0,8282	0,7975	0,9202
<b>Rf(A)</b>	0,889	0,901	0,9302	0,9535	0,907	

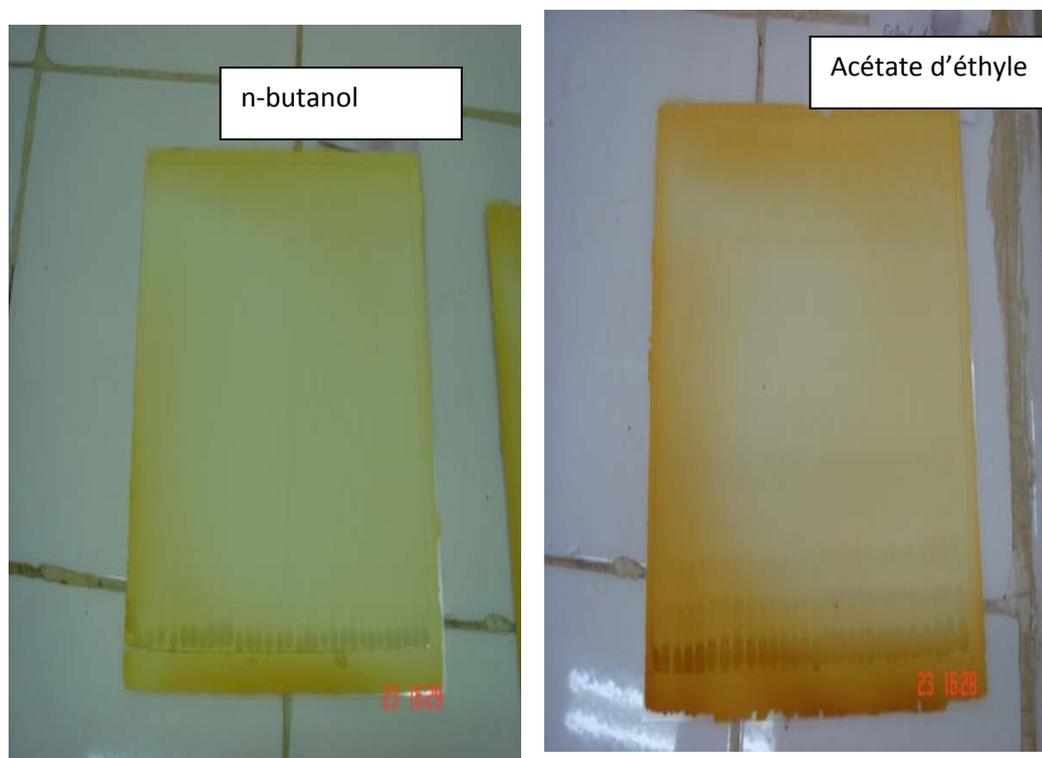
Où :

$R_f(A)$  représente le coefficient  $R_f$  de l'extrait flavonique de la phase acétate d'éthyle

$R_f(B)$  représente le coefficient  $R_f$  de l'extrait flavonique de la phase n-butanol.

- **Plaques de polyamide :**

Concernant la chromatographie sur couches minces de polyamide. La révélation par la méthode chimique a donné les résultats suivants.



**FigureIV-15 :** Plaques de polyamide après migration et après la révélation chimique par l'iode (extraits flavoniques de n-butanol et de l'acétate d'éthyle)

**Tableau IV-7 :** résultats de CCM des extraits flavoniques de butanol et de l'acétate d'éthyle sur gel de silice :

Rf(A)	0,0710	0,1331	0,2662	0,3552	0,7650	0,9399
Rf(B)	0,1257	0,2176	0,3661	0,7923	0,9508	

Où :

Rf(A) représente le rapport frontal lié à l'extrait flavonique de la phase acétate d'éthyle

Rf(B) représente le rapport frontal lié à l'extrait flavonique de la phase n-butanol.

Les empreintes ont été révélées par la méthode chimique qui consiste à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler.

- L'examen de ces chromatogrammes révèle la présence d'un nombre d'empreintes pour les deux extraits ; avec la CCM de gel de silice le nombre d'empreintes obtenu par l'extrait de butanol est relativement plus élevé que celui obtenu avec l'extrait de l'acétate d'éthyle alors que avec la CCM de polyamide on a remarqué l'inverse , cela peut être dû à la nature de la phase stationnaire.

-La relation entre le Rf (rapport frontal) et la structure des molécules apporte aussi des renseignements sur la structure des composés séparés par la CCM.

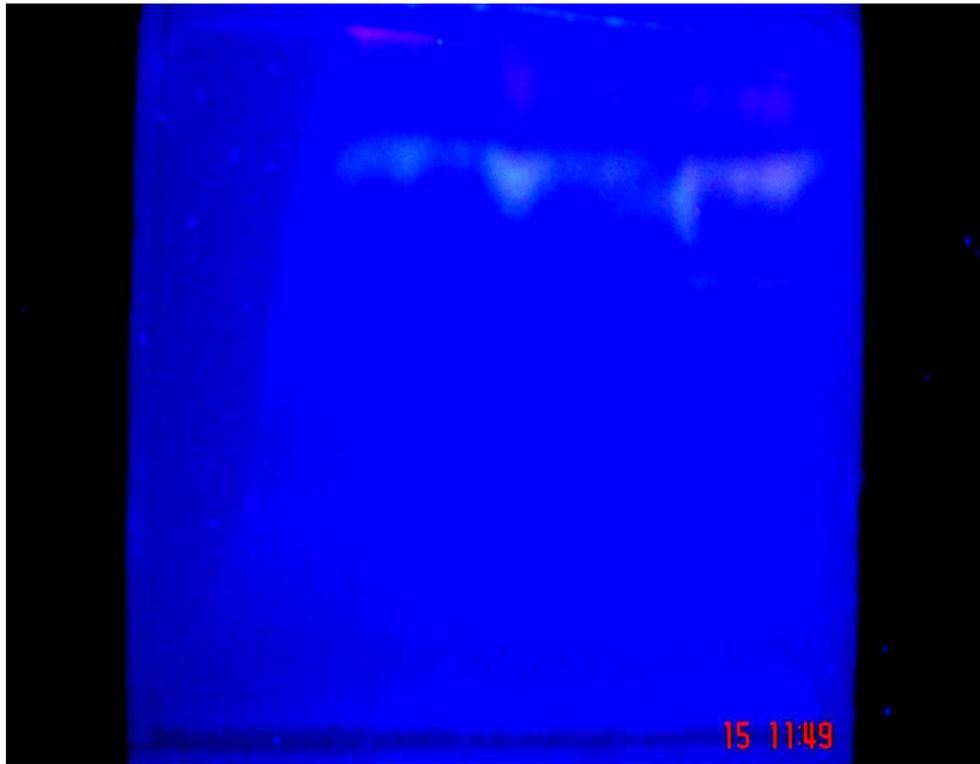
-Le dépôt des constituants a été caractérisé par son Rf dont les valeurs sont données dans les tableaux précédents. On remarque que les valeurs de Rf obtenus pour les extraits flavonoïques avec l'acétate d'éthyle et le n-butanol soumis à la CCM de gel de silice et de polyamide sont différentes ce qui nous permet de dire que leurs compositions sont différentes.

L'analyse par chromatographie sur couches minces (CCM) nous a permis tout d'abord d'avoir des empreintes flavoniques et de constater que les différentes phases : acétate et n-butanol obtenues de notre extrait de la plante n'avaient pas la même composition.

#### ➤ Révélation sous UV à 365 nm

Les extraits flavoniques sont soumis à une chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice sur des plaques en verre de 20 x 20 cm.

Après développement dans la cuve en verre et séchage , les plaques ont été observées sous lampe UV à 365nm. Les couleurs des bandes et les Rf ont été enregistrés



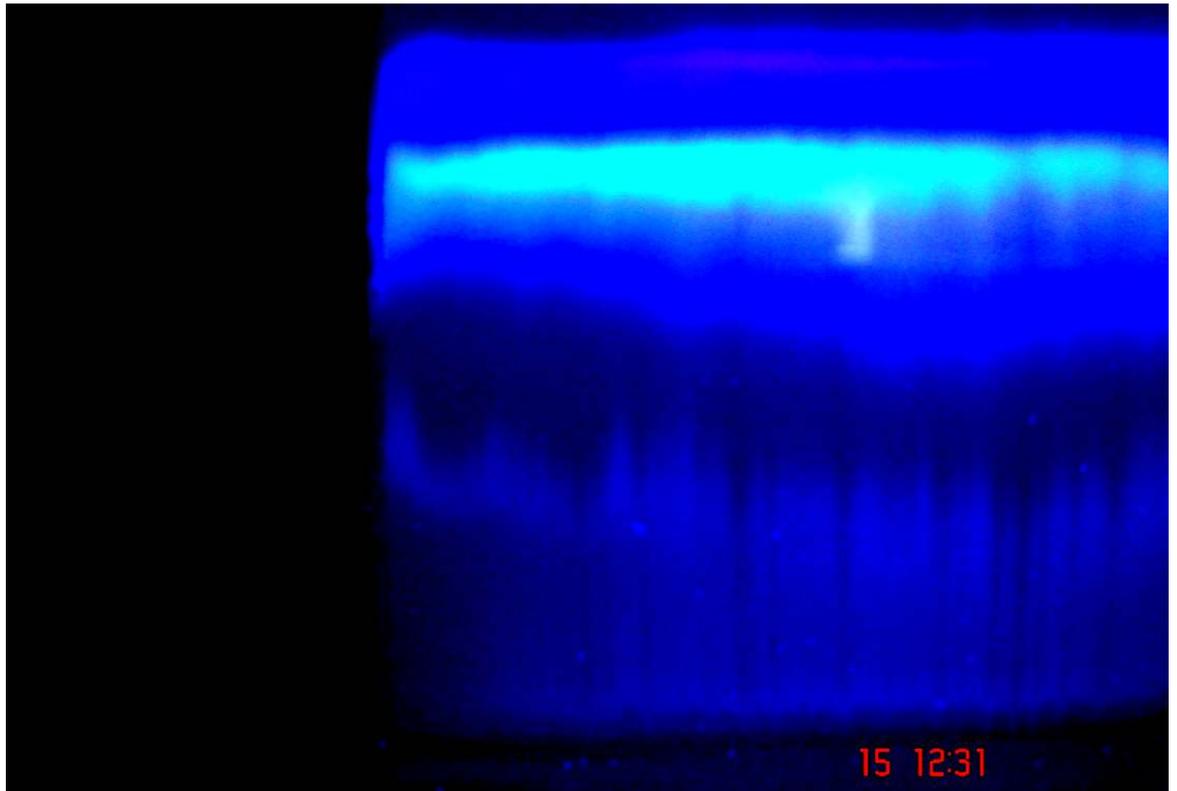
**Figure IV-16** : Chromatogramme du contenu flavonique récupéré à partir de l'extrait de n-butanol observé sous UV

Les spots flavoniques représentant les constituants du dépôt ont été caractérisés par leur fluorescence (couleur) sous lampe UV et leur rapports frontaux.

Comme illustré sur la figure ci-dessus, nous avons remarqué deux bandes de couleurs bien distinctes ; bleue et violette. Nous avons déterminé le Rf de chacune d'elles et les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

**Tableau IV-8** : Résultat de la CCM du contenu flavonique de l'extrait de n-butanol

Couleur	Longueur d'onde (nm)	Rf
Bleu	365	0,72
Violet	365	0,87



**Figure IV-17** : Chromatogramme du contenu flavonique récupéré à partir de l'extrait de l'acétate d'éthyle observé sous UV

La CCM du contenu flavonique de l'extrait de l'acétate d'éthyle nous montre l'apparition de cinq couleurs différentes (jaune clair, rouge sombre, bleu clair, bleu fluorescent, violet vif) et les valeurs de Rf sont les suivants :

**Tableau IV-9** : Résultat de la CCM du contenu flavonique de l'extrait de l'acétate d'éthyle

Couleurs	Longueur d'onde (nm)	Rf
Jaune clair	365	0,3
pourpre sombre	365	0,48
Bleu fluorescent	365	0,7
Bleu foncé	365	0,8
Violet vif	365	0,85

L'un des résultats les plus visibles est la présence d'une bande présentant une fluorescence bleu dans les deux chromatogrammes, et son intensité a été remarquée dans celui de l'acétate d'éthyle.

L'examen sous lumière UV fournit des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. En effet, le chromatogramme du contenu flavonique de l'extrait de l'acétate d'éthyle s'est distingué par l'apparition de plusieurs bandes de couleur (jaune, pourpre sombre, bleu, violet), mais en absence des témoins authentiques, il nous est impossible à ce stade, de confirmer l'identité de ces flavonoides.

Par ailleurs, et sur la base des études antérieures, il a été démontré qu'il existe une relation entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV. Ces résultats [6(Markham,1982)] sont résumés dans le tableau suivant.

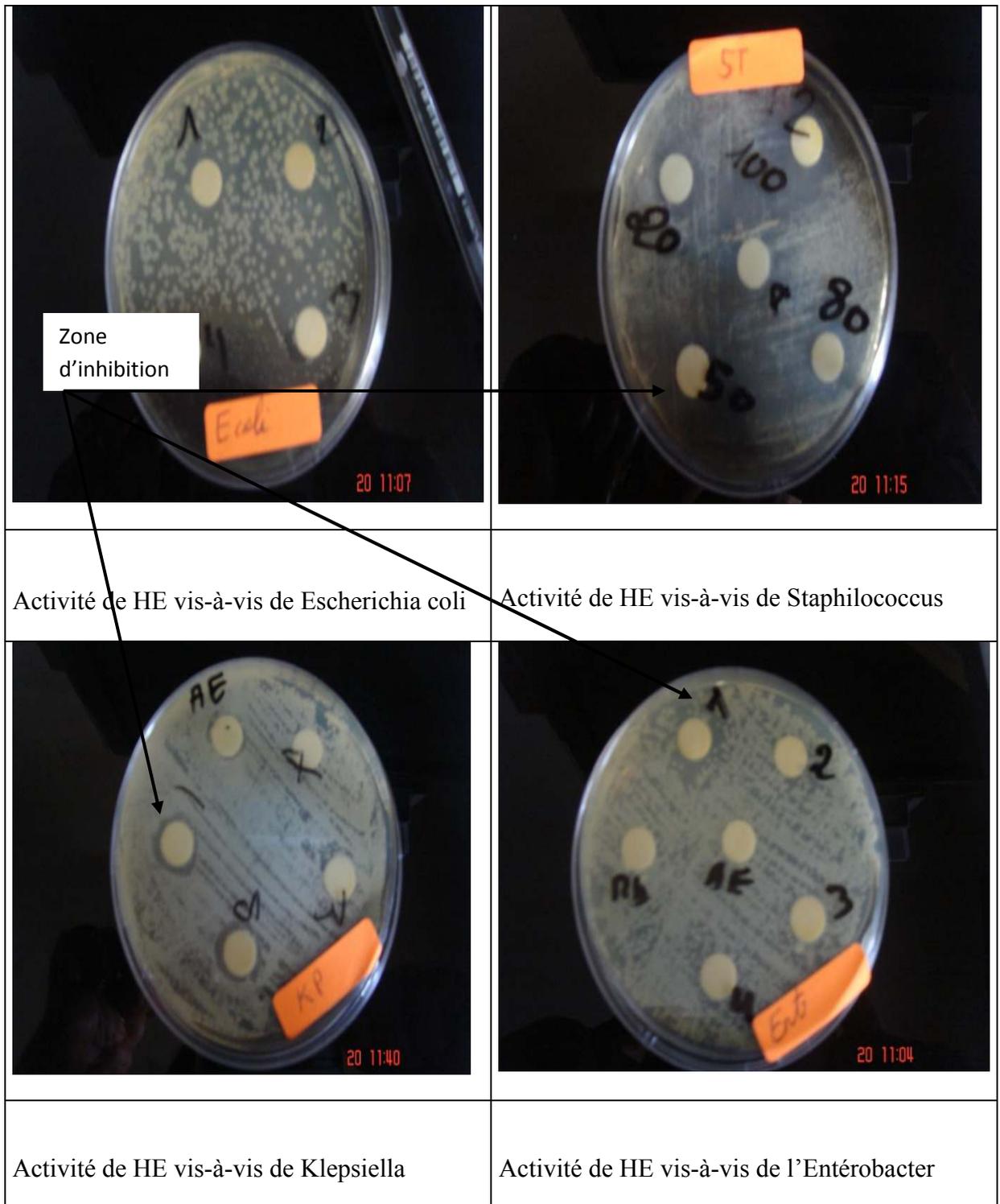
**Tableau IV-10** : La relation entre la fluorescence et les flavonoides

<b>Couleur observée sous UV 365nm</b>	<b>Type de flavonoïde possibles</b>
Jaune	Flavonols
Bleu claire	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH
Bleu fluorescent	Flavonols, flavones, isoflavones, flavonones
Pourpre sombre	Flavonols, flavones, chalcones, isoflavones, flavanones
Violet	Flavone

### **IV-3-Etude de l'activité antibactérienne de l'HE et des extraits flavoniques de l'*Artemisia campestris* L.**

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée selon la méthode de diffusion en milieu gélosés. Des disques de papier Wathman stériles (9 mm de diamètre) sont imprégnés de chaque dilution de l'HE et d'extrait flavonique. Ces mêmes disques sont appliqués sur la surface du milieu gélosé Mueller Hinton. Après incubation 18 heures à 37°C, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque.

### IV-3-1-Résultats des tests antibactériens de l'HE de l'Artemisia campestris L .



**FigureIV-18** : résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de l'Artemisia campestris.

**Tableau IV-11:** Résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle sur les souches pathogènes :

Souches	Diamètres d'inhibition en mm			
	Staphylococcus aureus	Klebsiella pneumonase	Enterobacter aerogenes	Escherichia coli
100%	21	15	15	00
80%	17	11	00	00
50%	15	00	00	00
20%	13	00	00	00

Une échelle de mesure de l'activité antibactérienne est mise par Duraffourd et coll.[7]. classant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne en quatre classes :

- L'huile essentielle est fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à **20 mm**.
- Moyennement inhibitrice lorsque : **14mm < D<sub>z</sub> < 20 mm**.
- Légèrement inhibitrice lorsque : **8 mm < D<sub>z</sub> < 14 mm**.
- Non inhibitrice lorsque : **D<sub>z</sub> < 8 mm**.

Après l'incubation, on remarque l'apparition des zones d'inhibition qui entourent le disque imprégnés d'huile essentielle ; cela s'explique par le fait que les souches bactériennes : Saphylococcus aureus, Klebsiella pneumonase, Enterobacter aerogenes sont sensibles vis-à-vis cette huile essentielle.

- La bactérie *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus sensible à l'HE, elle a donné les zones d'inhibitions les plus importantes avec toutes les dilutions. Le diamètre de la zone d'inhibition de l'HE pure est de 21mm et pour les autres dilutions (80%,50%,20%) sont de 17mm, 15mm et 13 mm respectivement. Cette souche bactérienne est très sensible à l'HE de l'A.campestris L qui a donné une zone d'inhibition supérieure à 20mm.
- Suivie de *Klebsiella pneumoniae* qui a donné une zone d'inhibition de 15mm pour l'HE pure et 11mm pour la dilution de 80%. Cette souche bactérienne est moyennement sensible à l'HE de l'A.campestris qui a donné une zone d'inhibition comprise entre 14 et 20 mm.
- L'*Enterobacter aerogenes* a donné une zone de 15mm de diamètre et n'a montré aucun pouvoir inhibiteur vis-à-vis des dilutions. Cette souche bactérienne est moyennement sensible à l'HE de l'A.campestris qui a donné une zone d'inhibition comprise entre 14 et 20 mm.
- Enfin vient l'*Escherichia coli* qui a montré une grande résistance à l'HE avec une absence totale de zones d'inhibitions. Cette souche bactérienne ne présente aucune sensibilité vis-à-vis l'HE de l'A.campestris.

En comparant nos résultats avec une autre étude réalisée sur de l'activité antibactérienne réalisée sur l'HE de la même espèce provenant de Tunisie, il a été démontré que l'*Escherichia coli* est la souche la plus sensible suivie de *Klebsiella pneumoniae* et de *Staphylococcus aureus* avec une légère sensibilité alors que l'*Enterobacter aerogenes* est résistante. Ces résultats ne sont pas en concordance avec ceux de notre étude et cela est dû probablement à la différence de la composition chimique des HE [8].

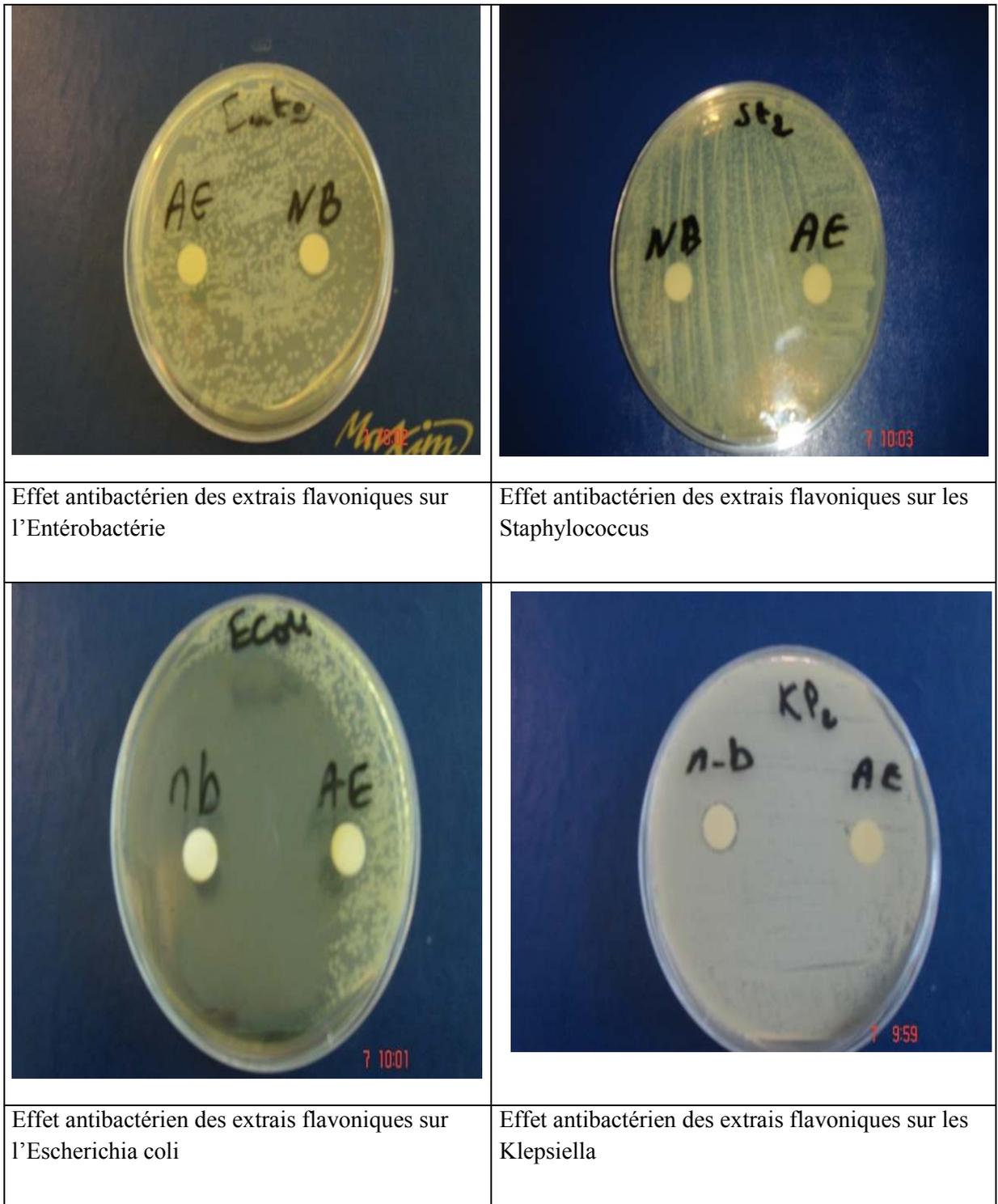
Les souches utilisées dans cette étude sont des souches références, elles ont été soumises aux différents antibiotiques et nous avons noté les différents diamètres d'inhibition de chacun de ces derniers afin de comparer le pouvoir inhibiteur de l'HE à celui de l'antibiotique. Nous avons constaté ce qui suit :

- La souche de *Klebsiella* a été résistante à TIM85 et CAZ30 elle n'a donné aucune zone d'inhibition, par ailleurs, elle a montré une sensibilité vis-à-vis de l'HE et des deux extraits flavoniques.

- L'enterobacter a donné un diamètre d'inhibition de 30mm avec le IPM, 16mm avec CL50, 26mm avec Fox 30 et 0 mm avec Na30.

En comparant la sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis ces antibiotiques et vis-à-vis l'huile essentielle, nous pouvons dire que l'HE pure de l'*A. campestris* L. possède un effet inhibiteur voisin à celui de CL50 et supérieur à celui de Na30.

**IV-3-2-Résultats de l'activité antibactérienne des extraits flavoniques de l'acétate d'éthyle et de n-butanol :** Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure suivante :



**Figure IV-19 :** Résultats de l'activité antibactérienne des extraits flavoniques de l'*Artemisia campestris* L.

**Tableau IV-12:** Résultats de l'activité antibactérienne des extraits flavoniques sur les souches pathogènes :

Souches	Diamètres des zones d'inhibition en mm			
	Escherichia coli	Klebsiella pneumonase	Staphylococcus aureus	Enterobacter aerogenes
Extrait de l'acétate d'éthyle	0	10	0	0
Extrait de n-butanol	12	12	0	13

D'après les résultats obtenus nous avons remarqué que les deux extraits flavoniques possèdent un effet inhibiteur plus ou moins différent :

\*Cette activité antibactérienne des extraits flavoniques est essentiellement liée à leurs structures chimiques. Les flavonoïdes en raison de leur richesse en groupes phénoliques sont capables de se fixer sur certaines protéines et enzymes modifiant ainsi les équilibres enzymatiques [8]

\*Cependant, le contenu flavonique de la phase n- butanol montre une meilleure activité par rapport à celui de la phase de l'acétate d'éthyle.

\*Parmi les souches testées, l'Enterobacter est la plus sensible à l'extrait de n-butanol avec un diamètre de 13mm, suivie de Klebsiella ( qui a donné des zones d'inhibition avec les deux extraits) et l'escherichia coli qui a montré une résistance à l'extrait de l'acétate d'éthyle et une sensibilité à l'extrait de n-butanol avec un diamètre de 12mm et en fin, le Staphylococcus qui n'a montré aucune sensibilité( vis-à-vis des deux extraits).

\* Ces résultats démontrent que les souches se comportent différemment vis-à-vis de l'extrait flavonique utilisé. Cela confirme la relation qui existe entre l'activité antibactérienne et la structure des flavonoïdes [9].

## Conclusion :

Cette étude a été réalisée à fin de mieux connaître une des plantes les plus utilisées dans la pharmacopée traditionnelle Maghrébine, c'est l'*Artemisia campestris* L.. Nous nous sommes intéressés à l'extraction, l'analyse et l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et des flavonoïdes de cette plante.

- L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par le procédé de l'hydrodistillation. L'étude de certains paramètres affectant le rendement nous a permis de déterminer :
  - Que les tiges contiennent de l'huile essentielle mais en quantité relativement faible par rapport à celle des feuilles.
  - Le temps de l'extraction qui varie de 240 min à 220min selon la partie de la plante traitée (240min pour les parties aériennes, 240 min pour les feuilles et 220min pour les tiges mais la récupération de cette HE des tiges ne se fait qu'à partir de la 60<sup>ème</sup> min)
  - La durée de séchage idéale qui varie selon la partie de la plante ( 14 jours pour les parties aériennes et les feuilles et 7 jours pour les tiges)
  - La masse de la matière végétale adéquate est celle qui permet une bonne diffusion de la vapeur d'eau dans la plante
  - Le mode de séchage adéquat pour l'obtention d'un meilleur rendement qui est le séchage à l'ombre

Une étude analytique a permis de caractériser l'huile essentielle par ses indices physico-chimiques. Du point de vue qualitatif, la composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée par l'analyse CG/SM qui a révélé l'existence de différents composés parmi lesquels les majoritaires tels que : 5(6H)-Benzocyclooctènone, 7-8-dihydro-8,8-diméthyl, T-Muurolol, Germacrène- D, 1-oxaspiro[2,5]oct-5-ène, 8,8-diméthyl-4-méthylène, Gamma-élémentène

- L'extraction des flavonoïdes de cette plante s'est basée sur leur solubilité dans l'éthanol. Le contenu flavonique des deux extraits (acétate d'éthyle et butanol) a été analysé par CCM. La révélation chimique a permis d'avoir des empreintes flavoniques et de déterminer les différents R<sub>f</sub> et de constater que la composition des contenus flavoniques des deux extraits est différente l'une de l'autre vue leur

migration dans les mêmes conditions. Cependant, la révélation sous UV à 365nm a permis d'avoir des bandes colorées qui, en se référant à des études ultérieures, pourraient signifier l'existence de certains flavonoïdes (flavonol, flavones et peut être même de chalcones )

- Les tests antibactériens effectués sur certaines souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ) ont montré que l'huile essentielle et les flavonoïdes possèdent un pouvoir inhibiteur plus ou moins important et différent vis-à-vis des souches citées préalablement. L'huile essentielle a montré un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* mais *Escherichia coli* a montré une grande résistance, les contenus flavoniques ont montré une activité faible.

Ces résultats constituent une étape préliminaire d'une étude plus approfondie et primordiale qui s'ouvre sur plusieurs axes de recherche qui sont :

- L'étude de la variabilité du rendement en huile essentielle en fonction du cycle végétatif.
- L'étude de la variabilité du rendement en huile essentielle en fonction du procédé de l'extraction
- L'étude de la variabilité de la composition chimique des différentes parties de la plante à savoir les racines.
- L'étude de l'activité biologique des flavonoïdes et de l'huile essentielle.
- Analyse plus performante des flavonoïdes et leurs variabilités en fonction du cycle végétatif.

## APPENDICE A

### Caractérisation de l'huile essentielle

#### 1-Caractéristiques physiques de l'huile essentielle :

- **Densité relative :**

La densité relative  $d_{20}$  d'une substance est le rapport entre la masse d'un certain volume de cette substance à 20°C et la masse d'un volume égale d'eau à la même température.

La masse volumique  $\rho_{20}$  d'un corps est le quotient de sa masse par son volume à 20°C, elle est exprimée en Kg/m<sup>3</sup>.

La relation numérique entre la densité relative et la masse volumique exprimée en Kg/m<sup>3</sup> est la suivante [50] :

$$\rho_{20(s)} = \rho_{20(eau)} * d_{20}$$

#### **Mode opératoire :**

Au moyen d'une balance de précision, on pèse 1 ml d'HE de l'*Artemisia campestris* puis on pèse le même volume (1ml) d'eau distillée.

#### **Méthode de calcul :**

La densité relative d'HE de l'*A.campestris* est donnée par la formule suivante :

$$d_{20} = \rho_{20(HE)} / \rho_{20(eau)}$$

Où :

$\rho_{20(HE)}$  : La masse volumique de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* à 20°C

$\rho_{20(eau)}$  : La masse volumique de l'eau distillée à 20°C

$d_{20}$  : La densité relative de l'huile essentielle de l'*A.campestris* à 20°C.

- **Détermination de l'indice de réfraction :**

L'indice de réfraction  $n_D^T$  d'un milieu homogène, transparent, peut être défini comme le pouvoir que possède ce milieu pour dévier un rayon arrivant sur la surface selon British pharmacopeia. La détermination de l'indice de réfraction se fait à l'aide d'un réfractomètre.

**Mode opératoire :**

On met de l'HE dans la cellule de mesure en moyennant une micropipette, puis on referme le couvercle. Au bout de quinze secondes (le temps nécessaire pour que l'appareil soit stabilisé à 20°C) on règle l'appareil jusqu'à la localisation du trait au centre de la cellule, on lit alors la valeur de l'indice de réfraction  $n_D^T$

## 2- Caractéristiques chimiques de l'huile essentielle

### a- Détermination de l'indice d'acide

L'indice d'acide  $I_A$  est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans un gramme de l'huile essentielle.

**Principe :**

Neutralisation des acides libres par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium titrée.

**Réactifs :**

Au cours de l'analyse on utilise uniquement des réactifs de qualité connue et de l'eau distillée, éthanol à 95% à 20°C, solution éthanolique titrée,  $C(\text{KOH})=0,1\text{mol/l}$ .

**Mode Opératoire**

On introduit 0,5 g de la substance à examiner (HE) dans 25 ml d'éthanol et 5 gouttes de phénolphaléine comme indicateur coloré, et on neutralise la solution avec l'hydroxyde de potassium contenue dans la burette.

### Méthode de calcul

L'indice d'acide est exprimé selon la formule suivante :

$$I_A = \frac{5.61V}{m}$$

Où :

$I_A$  : L'indice d'acide

V : Le volume de KOH (0.1M) consommé en ml.

m : La masse de la substance à examiner en g

### b-Détermination de l'indice de saponification

L'indice de saponification  $I_S$  est le nombre qui exprime en milligramme la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres et la saponification des esters présents dans 1 g de la substance à examiner.

#### Mode Opératoire

Dans une fiole de 250ml de verre de borosilicate munie d'un réfrigérant à reflux, nous introduisons la prise d'essai (l'huile essentielle) en mg. Nous ajoutons 25ml d'hydroxyde de potassium alcoolique 0.5M et quelques billes de verre. Nous adaptons le réfrigérant et nous chauffons à reflux pendant 40 minutes, puis nous ajoutons 1 ml de l'indicateur coloré de phénolphaléine et nous titrons immédiatement par l'acide chlorhydrique 0.5M. Nous effectuons un essai à blanc dans les mêmes conditions

### Méthode de calcul

L'indice de saponification est exprimé par la formule suivante :

$$I_S = \frac{28.05(V_2 - V_1)}{m}$$

Où :

m : La masse de la substance en g

V<sub>1</sub> : Le volume de HCl consommé par l'échantillon en ml

V<sub>2</sub> : Le volume de HCl consommé à blanc en ml

### c-Détermination de l'indice d'ester

L'indice d'ester I<sub>E</sub> est le nombre qui exprime en milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la saponification des esters présents dans 1g de substance, il est calculé à partir de l'indice d'acide I<sub>A</sub> et l'indice de saponification I<sub>S</sub>.

### Méthode de calcul

$$I_E = I_S - I_A$$

Où

I<sub>E</sub> : indice d'ester ;

I<sub>S</sub> : indice de saponification ;

I<sub>A</sub> : indice d'acide.

## APPENDICE B

### Tableaux des résultats

**Tableau 1** : Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle des des feuilles et des tiges de l'Artemisia campestris

t(min)	0	20	30	40	60	90	120	150	180	210	240	260	280	300
mHE(g)	0	0,06	0,1	0,35	0,55	0,74	0,9	1,09	1,22	1,37	1,421	1,419	1,42	1,42
R(%)	0	0,09	0,14	0,48	0,79	1,05	1,28	1,56	1,74	1,96	2,028	2,027	2,03	2,03

**Tableau 2** : Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle des feuilles de l'Artemisia campestris :

t(min)	0	20	30	40	60	80	100	120	140	160	180	210	240	280	300
mHE(g)	0	0,06	0,12	0,39	0,59	0,73	0,92	1,13	1,33	1,4	1,47	1,55	1,65	1,64	1,7
R(%)	0	0,09	0,25	0,56	0,84	1,04	1,31	1,61	1,9	2	2,1	2,21	2,36	2,34	2,4

**Tableau 3** : Influence du temps d'extraction sur le rendement en huile essentielle des tiges de l'Artemisia campestris :

t(min)	0	60	100	180	220	260	280	300
mHE(g)	0	0,11	0,19	0,3	0,41	0,406	0,41	0,4
R(%)	0	0,21	0,37	0,59	0,81	0,812	0,81	0,81

**Tableau 4** : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle des parties aériennes de l'Artemisia campestris :

m <sub>MV</sub> (g)	10	30	50	70	100	120
m <sub>HE</sub> (g)	0,09	0,134	0,455	1,386	1,247	1,0812
R <sub>ri</sub> (%)	0,19	0,45	0,91	1,98	1,25	0,901

**Tableau 5** : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle des feuilles de l'Artemisia campestris :

$m_{MV}(g)$	10	30	50	70	100	120
$m_{HE}(g)$	0,0253	0,187	0,562	1,4491	1,6853	1,1868
$R_f(\%)$	0,253	0,62	1,12	2,07	1,685	0,989

**Tableau 6** : Influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle des tiges de l'Artemisia campestris :

$m_{MV}(g)$	10	30	50	70	100
$m_{HE}(g)$	0,009	0,0704	0,4455	0,4971	0,691
$R_t(\%)$	0,093	0,23	0,891	0,71	0,691

**Tableau 7**: influence du temps de séchage sur le rendement en huile essentielle des parties aériennes (feuilles et tiges) de l'Artemisia campestris :

$D(j)$	1	7	14	21	24	28	32	38
$m_{HEft}$	0,134	0,214	0,512	0,4953	0,4834	0,2146	0,20747	0,219
$R_{ft}(\%)$	0,45	0,713	1,707	1,651	1,61	0,71	0,691	0,73

**Tableau 8** : influence du temps de séchage sur le rendement en huile essentielle des feuilles de l'Artemisia campestris :

$D(j)$	1	7	14	21	24	28	32
$m_{HEf}(g)$	0,156	0,249	0,609	0,3271	0,2165	0,2253	0,2102
$R(\%)$	0,52	0,83	1,78	1,09	0,722	0,751	0,7

**Tableau 9** : influence du temps de séchage sur le rendement en huile essentielle des tiges de l'Artemisia campestris :

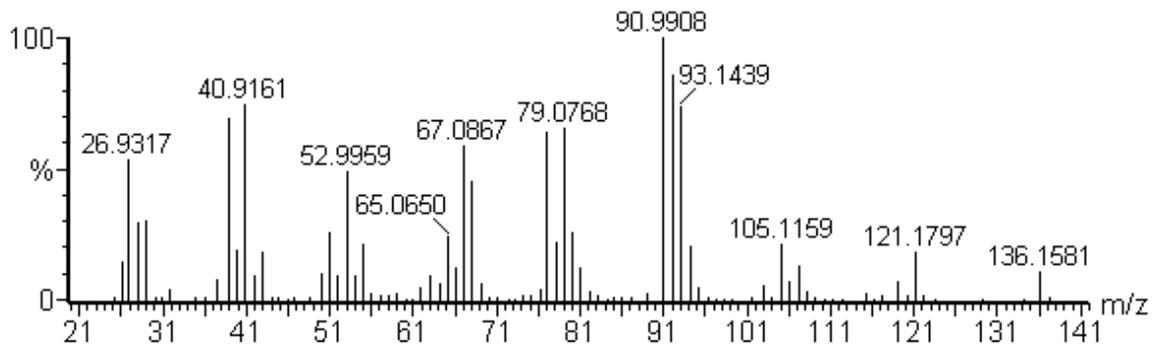
$D(j)$	1	7	14	21	28
$m_{HEt}(g)$	0,2551	0,406	0,075	0,0703	0,0665
$R(\%)t$	0,51	0,81	0,15	0,14	0,133

## APPENDICE C

### Spectres de masse

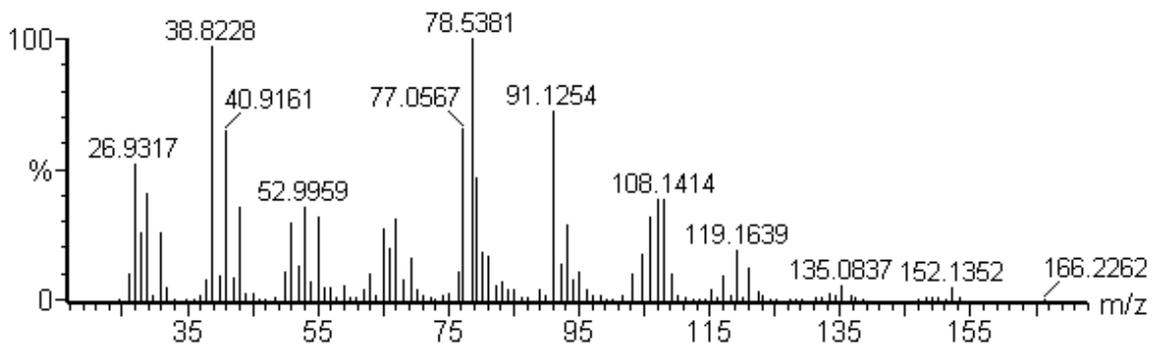
**t=8.05 min**  
**Spectre de masses**

huile\_essent\_08\_09\_2011



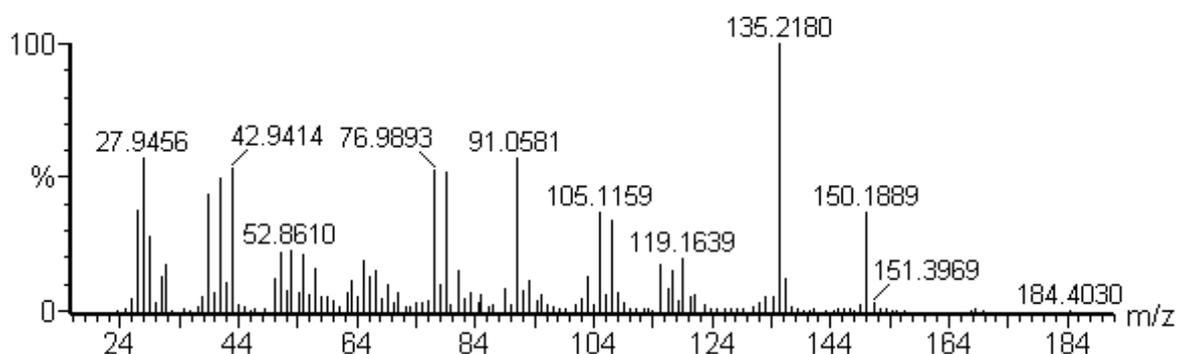
**t=13.55 min**  
**Spectre de masses**

huile\_essent\_08\_09\_2011



**t=16.82 min**  
**Spectre de masses**

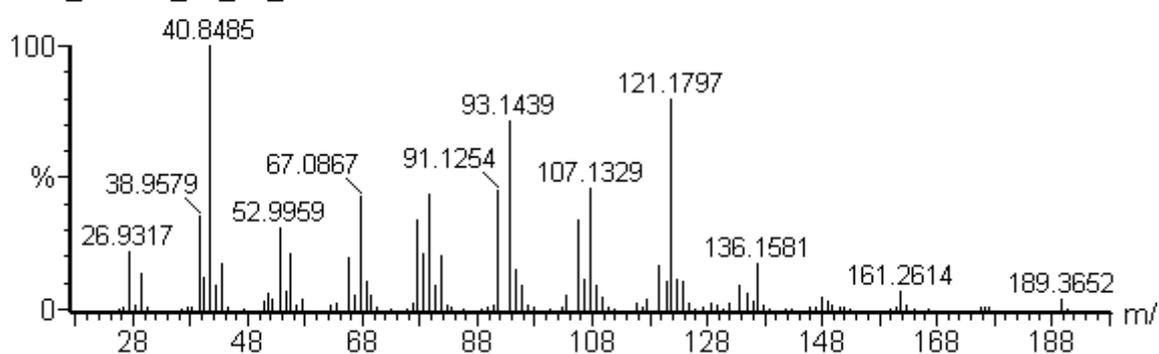
huile\_essent\_08\_09\_2011



**t=18.11 min**

**Spectre de masses**

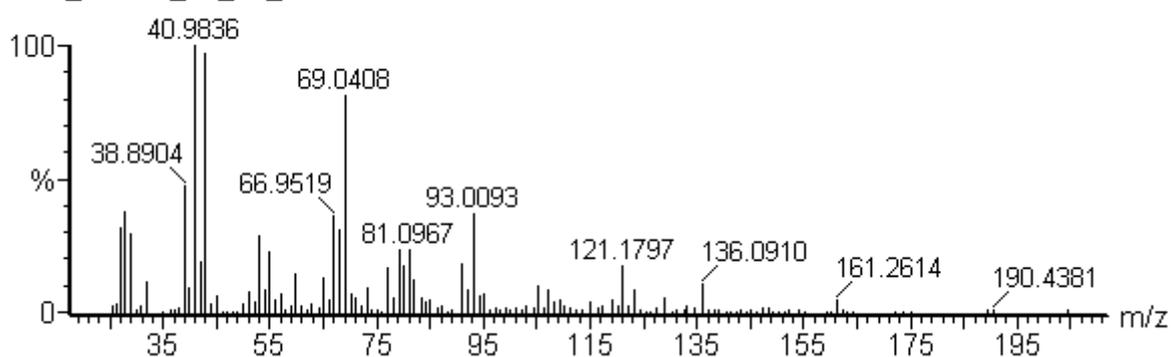
huile\_essent\_08\_09\_2011



**t=19.92 min**

**Spectre de masses**

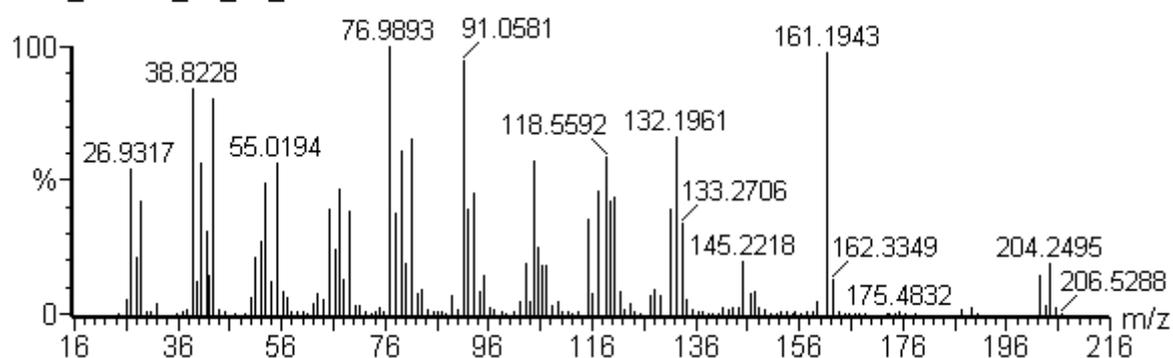
huile\_essent\_08\_09\_2011



**t=22.80 min**

**Spectre de masses**

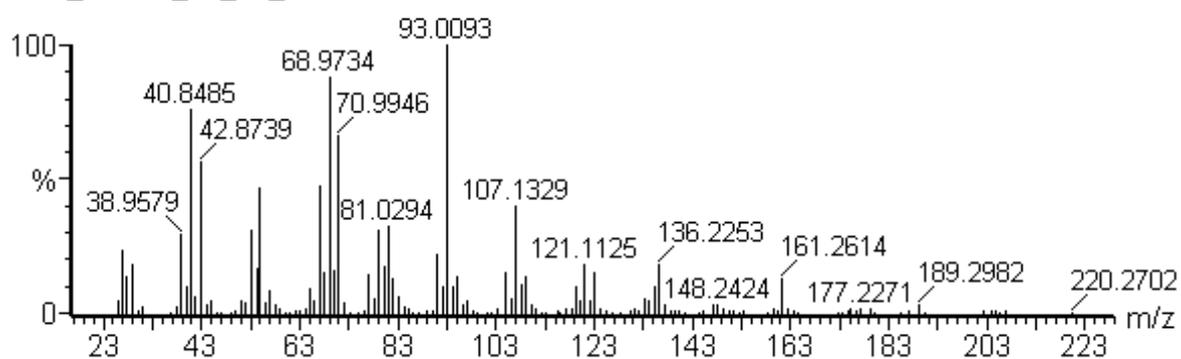
huile\_essent\_08\_09\_2011



**t=25.30 min**

**Spectre de masses**

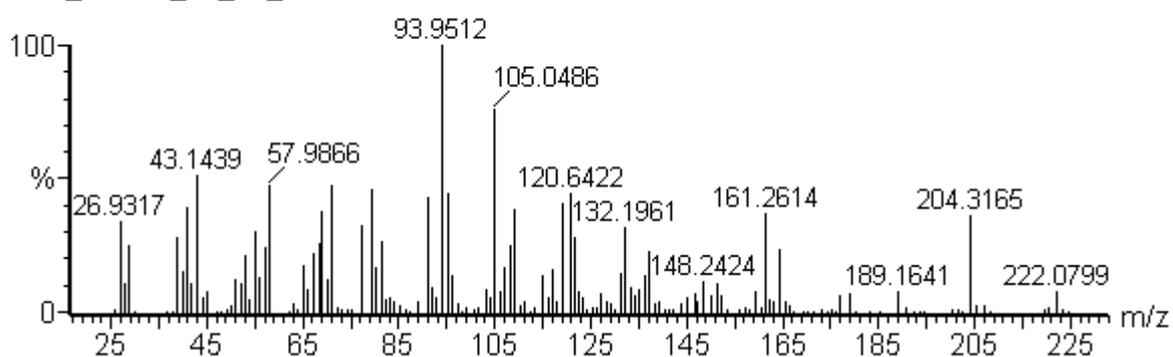
huile\_essent\_08\_09\_2011



**t=27.96 min**

**Spectre de masses**

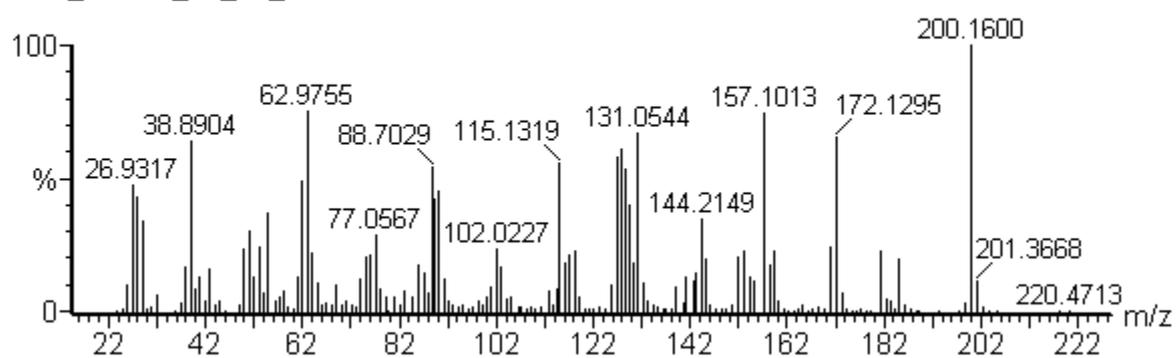
huile\_essent\_08\_09\_2011



**t=33.27 min**

**Spectre de masses**

huile\_essent\_08\_09\_2011



## APPENDICE D

### Préparation des dilutions :

La dilution de l'huile essentielle consiste à préparer une série de tubes contenant des concentrations variant de 20 à 100% .

L'huile essentielle est dissoute dans de l'eau physiologique additionnée de Tween 80 à raison de 1% et ce, pour permettre une meilleure dissolution de cette première.

On va avoir :

Huile essentielle brute HE à 100%

HE à 80% : 200 µl d'eau physiologique + 800 µl d'HE

HE à 50% : 500 µl d'eau physiologique + 500 µl d'HE

HE à 20% : 800 µl d'eau physiologique + 800 µl d'HE

**Liste des produits :**

- Sulfate de sodium anhydre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 99,99%
- Ether diéthylique 99,5% stabilisé avec 6ppm de BHT PRS
- n-butanol 99,5%
- Acétate d'éthyle 99,5%
- Éthanol 99,99%
- Acide chlorhydrique HCl à 37%
- Tournures de magnésium
- Hydroxyde de potassium KCl
- Tween 80
- Chlorures de sodium NaCl 99,0%
- Eau physiologique
- Iodine 99,5%
- Gélose nutritive Mueller Hinton
- Gel de silice HF 254



# CHAPITRE I :

GENERALITES SUR LES  
HUILES ESSENTIELLES  
ET LES FLAVONOIDES

# CHAPITRE II :

MATIERE VEGETALE ;

*Artemisia campestris* L.

# CHAPITRE III :

MATERIELS

&

METHODES

III-1-Extraction de l'huile essentielle.

III-2-Extraction des flavonoïdes

III-3-Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et des flavonoïdes.

# CHAPITRE IV:

RESULTATS

&

DISCUSSIONS

CONCLUSION

# INTRODUCTION

Première partie :

SYNTHESE  
BIBLIOGRAPHIQUE

Deuxième partie :

ETUDE

EXPIREMENTALE

## **Bibliographie : Chapitre I :**

- [1] L. Lagunez Rivera .Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe. Thèse de Doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse . France.2006.
- [2] N. Tabti. Contribution à l'étude de l'extraction des huiles essentielles de myrtus communis L. Mémoire de Magister de l'U.S.D. Blida. Algérie. 2011.
- [3] J. Bruneton, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème éditions, TEC & DOC. Lavoisier, Paris. 1999.
- [4] A. Farhat. La vapo-diffusion assistée par micro-ondes : Conception, optimisation et application. Thèse de doctorat en cotutelle de l'école national d'Ingénieur de Gabes. Tunisie. & l'Université d'Avignon et des pays de Vaucluse. France .2010.
- [5] P.J. Teisseire. Chimie des substances odorantes. Tec & Doc. Lavoisier. Paris. 1991.
- [6] N. Benayad. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales du Maroc : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, projet de recherche faculté des sciences de Rabat. Page 20-22. Nov 2008.
- [7] R. Seghiri. Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*. Thèse de Doctorat d'état en phytochimie de l'Université Mentouri de Constantine.
- [8] L. R. HERNANDEZ OCHOA. Substitution de solvant et matières actives de synthèse par un combine « SOLVANT/ACTIF » d'origine végétale. Thèse de Doctorat en agroressources de l'institut national polytechnique de Toulouse. France. 2005.
- [9] F. Haddouchi, A. Benmansour, Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques. Les technologies de Laboratoire, 8, 20-27, 2008.
- [10] H.LECLERC. Microbiologie générale .Doin editeur. page369. Paris. 1983.
- [11] D. SCIMECA. M. TATAU. Votre santé par les huiles essentielles ; Ed :Alpen 95 p.2005.
- [12] J.FLURETTE J.FRENEY . M.E.REVERDY. Anttserssie et désinfection.ESKA, 639p. Paris.1995.
- [13] J-L Sallé. Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie,

- [14] J. Raynaud. Prescription et conseil en Aromathérapie, éditions TEC & DOC. Lavoisier, Paris. 2006.
- [15] M.E. Lucchesie , Extraction sans solvant assistée par micro-ondes : Conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat de l'Université de la Réunion, 142p, 2005.
- [16] Natural essential oils : extraction processes and applications to some major oils. B. Meyer-Warnod, Perfumer & Flavorist. 9, 93-103, 1984.
- [17] M.A. Ferhat, B.Y. Meklati, F. Chemat, Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. Flavour and Fragrance journal, 22, 494-504, 2007.
- [18] L. Wang and C. L. Waller, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, Trends in Food Science & Technology, 17 .300 – 312.2006.
- [19] K. Ganzler, A .Salgo, J. Valko, Microwave extraction- a novel sample preparation method for chromatography. Journal of Chromatography,371, 299-306,1986.
- [20] K. Ghedira. Les flavonoides. Structure, propriétés biologiques, rôle thérapeutique et emplois en thérapeutique.Phytothérapie.4,162-169, 2005.
- [21] L.Chebil. Acylation des flavonoides par les lipases de candida antarctica et de Pseudomonas cepacia : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de doctorat de l'institut National polytechnique de Lorraine. France. Décembre 2006.
- [22] W. Bylka, I. Matlawska, PhD, NA Pilewski, PhD\* Bylka W., I. Matlawska, PhD, NA Pilewski, PhD \* Les flavonoïdes naturels comme des agents antimicrobiens Department of Pharmacognosy, K. Marcinkowski University of Medicinal Sciences 10 Sieroca, 61-771 Poznan, Poland, Pologne Department of Pharmacology/Toxicology, Mylan School of Pharmacy, Duquesne University, Pittsburgh, Pennsylvania
- [23] N.Zeghad. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister en biotechnologie végétale de l'Université Mentouri de Constantine. 2008/2009.

- [24] A. Madi. Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Mémoire de Magister en biotechnologie végétale de l'Université Mentouri de Constantine. 2009/2010.
- [25] M. Adjadj. Propriétés antioxydantes et activité inhibitrice de la plante médicinale *Ajuga reptans* (L.) Schreber. Mémoire de magisters en biologie cellulaire et moléculaire, université Mentouri de Constantine, 2009.
- [26] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* .13 ; 572–584 ;2002.
- [27] O. Touafek. Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud Algériens. Thèse de Doctorat en phytochimie de l'Université Mentouri de Constantine. 2010.
- [28] S. Akroum. Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat en phyto-toxicologie de l'Université Mentouri de Constantine. 2010/2011.
- [29] J.-C. Stoclet .V. Schini-Kerth . Dietary flavonoids and human health . *Annales Pharmaceutiques Françaises* Volume 69, Pages 78-90, March 2011.
- [30] B. Stavric. et T. I. Matula. Flavonoids in Food. Their significance for nutrition and health. *Biochemistry and clinical applications*. P. 274-294. ONG 1992.
- [31] H.C. Das, J.H. Wang et E.J. Lien. Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids :A structure-system-activity relation ship (SSAR) analysis.p .133-136 In: Jucker E ed .*Progress in drug Research*. Base Birkhauser Verlag]
- [32] J. Wang et G. Mazza. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264-7 Macrophages. *J. Agric. Food Chem* 50, 4183-4189. 2002
- [33] D. Bidet, J.C. Gagnault, P. Girard et F. Trotin . Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hesperides à la cascade de l'acide arachidonique: les flavonoïdes . *L'actualité chimique*. 89-97. (1987)

- [34] M.Tordera, M.L. Ferrandiz and M.J. Alcaraz. Influence of anti-inflammatory flavonoids on degranulation and arachidonic acid release in rat neutrophils. *Z. Naturforsch.* 49,235-240. (1994).
- [35] G. N.Di Carlo Mascolo, A.A.Izzo and F. Capasso Flavonoids: old and new aspect of natural therapeutic drug, *Life Sci.* 65,337-353. (1999).
- [36] J.R. Meddleton. C.Kandaswami and T.C. Theoharides .The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* 52,673-751.(2000).
- [37] E .J. Middleton and G .Drzewiecki . Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agent. *Biochem. Biopharm.* 33,3333-3338. (1984).
- [38] Mbaveng A.T.etal(2008).Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 116,483-489.
- [39] M.Ben Sghaier, I.Skandrani, N. Nasr, M.G. Dijoux Franca, L. C.Ghedira, K; Ghedira. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environmental toxicology and pharmacology*. Article in press. 2011.
- [40] Lijun Sun, Jianbao Zhang, Xiaoyun Lu, Liyu Zhang, Yali Zhang Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 49 ;2689–2696; 2011
- [41] K.G. Ryana,, E. E. Swinnya, K. R. Markhama, C. Winefieldb. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry*. 59 ; 23–32; 2002.
- [42]F. Bonina, M. Lanza, L. Montenegro, C. Puglisi, A. Tomaino, D Trombetta, F. Castelli, A Saija. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *International Journal of Pharmaceutics* .145, 87-94 ,1996.
- [43]C. Saliou, M.Kitazawa, L.McLaughlin, J-P. Yang, J.K.Lodge, T. Tetsuka, K.Iwasaki, J. Cillard, T. Okamoto, L. Packer. Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radical Biology and Medicine*. 26, 174-183 ,1999.

## **Bibliographie :Chapitre II:**

- [1] Benoit Bock Tela Botanica,base de données Nomenclature de la Flore de France BDNFF,4.02 18.06.2011.
- [2] K. Maiza.R.A.Brac de la Priere.V.Hammiche :,Pharmacopée traditionnelle Saharienne :Sahara septentrional. Medicament et aliments :l'approche ethnopharmacologique . 169
- [3] A. Chier , F. Juteau, J.M. Bessiere, V. Masottiv, J. Viano. Impact du séchage sur la composition de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* var. *glutinosa*. Société Française de chimie. Section PACA. XVe Journée de la Chimie - 18-19 avril 2002.
- [4] Paul ozenda .Flore du Sahara, , édition du cnrs, 441-416)
- [5] A. Akrouit . Contribution à l'étude chimique et activités biologiques de la plante *Artemisia campestris* L. Thèse de Doctorat en chimie . Tunisie. 2005.
- [6] K.M. Valant-Vetschera, R. Fischer , E. Wollenweber , Exudate flavonoids in species of *Artemisia*(Asteraceae—Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation *Biochemical Systematics and Ecology* 31 (2003) 487–498
- [7] Catalogue des espèces et Habitats des sites Natura 2000 de la région Wallonne Edité par la DGARNE/DNF.fiche rédigée sur la base des dossiers scientifiques réalisés par le DEMNA, la FUSAGx, l'UCL et avec la collaboration de Notagora. Natura 2000]
- [8] E. Schnell. La flore et la végétation de l'Afrique tropicale. Vol. 4, 2ème partie, Ed.Gauthier-Villars, 25.1976.
- [9] F. Baba Aissa . Les plantes médicinales en Algérie. Coédition Bouchene et Addiwane,Alger. Algérie. 1991.
- [10] A. Akrouit1, H. El Jani, S. Amouri, M. Neffati. SCREENING OF ANTIRADICAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS OF *ARTEMISIA CAMPESTRIS* L., *ARTEMISIA HERBA ALBA* ASSO, & *THYMUS CAPITATUS* HOFF.

ET LINK. GROWING WILD IN THE SOUTHERN OF TUNISIA. *Recent Research in Science and Technology*.2(1): 29–39 ; 2010.

[11] Ould El Hadj M.Didi,Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara septentrional Est), COURRIER du savoir n°03Janvier 2003, pp47-51

[12] Ahmed Akrouit a,) Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 342–347

[13] Ahmed Akrouit , Hajer El Jani, Sondes Amouri, Mohamed Neffati :Screen of *Artemisia campestris*,*Artemisia herba alba* .Asso and *Thymus capitatus* Hoff Et Link.grown wild in southern of Tunisia *Recent Research in Science and Technology*2010,2(1):29-39,

[14] Annie Léger, Biodiversité des plantes médicinales Québécoises et dispositifs de protection de la biodiversité et l'environnement, Université du Québec à Monreale, Mémoire de la maîtrise en sciences de l'environnement,2008

[15]A. Akrouit, R.Chemli, , I. Chreïf , M. Hammami. Analysis of the essential oil of *Artemisia campestris* L. Flavour. *Frag. J.*, 16(5): 337-339, 2001.

[16] B. Bellomaria, G. Valentini . Chemotaxonomy of *Artemisia variabilis* Ten. and *A. campestris* L. ssp. *glutinosa* (Ten) Briq. et Cavill. (Asteraceae) from Italy. *J. Essent. Oil Res.*,13, 90-94.2001.

[17] F. Juteau , V. Masotti a, J-M. Bessiere, J.Viano.Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*.*Biochemical Systematics and Ecology*. 30 ;1065–1070; 2002.

[18] R.Belhattab Essential oil composition from *A.C*grown in Algeria, *Advances in environnement Biology* 5(2) 429-432,2011

[19] Chalchat,Jean Claud,Cabassu, SP.Maksimovic: Composition of essential oil of *artemisia campestris* fromSerbia,*journal of essential oil Reseach* :JEOR(jul/aug2003)

[20] M. Hurabielle, J.Eberle, M.Paris. Flavonoids of artemisia campestris,spp.glutinosa.Planta Med. 46(10) ; 124-125 ; 1982.

[21] **J. De Pascual Teresa, M. S. González, M. R. Muriel and I. S. Bellido** .Phenolic derivatives from *Artemisia campestris* Ssp Glutinosa. Phytochemistry, 23 (8), 1819-1821,1984.

[22] A.Akrout, M. Neffati, R. Chemli, M. Aouni, R. Jerraya, M. Dammak, A. Dar. Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle d'artemisia campestris L. Revue des régions arides. 231-240. 2007.

## **Bibliographie :Matériels et méthodes**

- [1] Normes AFNOR. Recueil des normes françaises, huiles essentielles. AFNOR. Paris.1992.
- [2] H.LAGREB ,Extraction , caractérisation des huiles essentielles de soccocalyse satuireioides et Thymus faontanesu, analyse par GC/MS et activité biologique, PFE, université de Blida, 2006.
- [3] R. Merghem, M.Jay , M.R. Viricel , C.Bayet et B.Voirin . Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry.*, 38 (3) : 637-640. 1995.
- [4] M.Chavanne, A.Jullien, G.J.Beaudoin, E.Flamand. Chimie organique expérimentale . Modulo éditeur. 1986.
- [5] S. Akroum. Etude analytique et biologiques des flavonoides naturels.Thèse de Doctorat en phyto-toxicologie. Université Mentouri de Constantine. 2010/2011.
- [6] N.Zeghad. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister en biotechnologie végétale de l'Université Mentouri de Constantine. 2008/2009.
- [7] D.Bijondi , P.Cianci , C.Geraci et G. Ruberto , " Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants ", Flavour and fragrance journal, Vol 8, (1993), pp 331-377
- [8]F.ALLOU et F.NADJARI: Etude des bactéries causant la GEI, institut de biologie de Blida 47p ,2002
- [9]F.DENIS , M.C. POLY, E.BINGEN et Q. ROLAND: Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Edit Elsevier Masson paris, P : 252.301.334 ,2007
- [10]J.AVRIL ,etJ. FAUCHERE:Bactériologie générale et médicale, Ed Ellipses Marketing. P 214. 227. 307 ,2002
- [11]R.DEDIER : Dictionnaire des maladies infectieuses : diagnostic, épidémiologie, répartition géographique, taxonomie, symptomaologie. Ed, Elsevier Masson ; 1162p ,1998
- [12]G.HUCHON : Pneumologie pour la partition. Ed, Elsevier Masson 383p , 2001

## **Bibliographie : Résultats et discussions :**

- [1] A. Akrouf . Contribution à l'étude chimique et activités biologiques de la plante *Artemisia campestris* L. Thèse de Doctorat en chimie . Tunisie. 2005.
- [2] [170] E. Gueorguiev. Produits aromatiques naturels et synthétiques. Edition de l'institut de technologie alimentaire. Plovdiv. Bulgarie. 1980.
- [3] B. Bendjilali : Le matériel végétal et l'extraction , département des sciences alimentaires et nutritionnelles , Institut agronomique et vétérinaire (IAV) Hassan II , Rabat, Maroc, 23/03/2005.
- [4] A. Elamrani , S. Zrira , M. Ismaili-Alaoui , A. Bélanger , M. Berrada M et B. Benjilali . Effet du séchage sur les rendements et la composition chimique de l'huile essentielle de romarin du Maroc (*Rosmarinus officinalis* L.). Actes du congrès international organisé par l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Maroc : Plantes aromatiques et médicinales et leurs huiles essentielles, édités par Benjilali B., Ettalbi M., Alaoui I.M. et Zrira S., Actes éditions, 161-168. 1997.
- [5] C. Duraffourd, phytothérapie clinique, examen de laboratoire galénique , éléments thérapeutiques, Tom I , 2ème édition, Ed. Masson, Paris . 1990.
- [6] B. IMELOUANE, H.A. MHAMDI, W.J.P. ATHELET, M. ANKIT. K. KHEDID et A. EL BACHIRI. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*) du Maroc oriental. art. Jor . agriculture & biologie. (4)
- [7] A. Akrouf, H. El Jani, S. Amouri, M. Neffati. SCREENING OF ANTIRADICAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OILS OF *ARTEMISIA CAMPESTRIS* L., *ARTEMISIA HERBA ALBA* ASSO, & *THYMUS CAPITATUS* HOFF. ET LINK. GROWING WILD IN THE SOUTHERN OF TUNISIA. *Recent Research in Science and Technology*. 2(1): 29–39 ; 2010.
- [8] Ozawa T., Lilley TH, et Haslam E., "Polyphenol interactions: Astringency and the loss of astringency in ripening fruit ", *Photochemistry*, Vol. 26. n° 11. pp. 2937-2942. 1987.
- [9] D. Bijondi, P. Cianci , C. Geraci et G. Ruberto, " Antimicrobial and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants ", *Flavour and fragrance journal*, Vol 8, pp 331-377. 1993.