

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université BLIDA 1  
Faculté des Sciences  
Département de Chimie



Mémoire présenté par

**BENALI Nassima**  
En vue d'obtenir le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière  
Filière : Chimie  
Option : Chimie des Substances Naturelles

Titre

**Extraction Assistée par l'enzyme de l'huile essentielle  
et de la fraction volatile de l'Artemisia campestris L.  
Evaluation de son activité antibactérienne  
et antioxydante**

Soutenu publiquement en octobre 2013 devant le jury composé de :

M. El Hattab	Pr	Président	Université de Blida
S. Kasmi	MCA	Examinatrice	Université de Blida
Z. Chemat	MCB	Examinatrice	Université de Blida
K. Boutemak	MCB	Promotrice	Université de Blida
Y. Daghbouche	Pr	Membre de CP	Université de Blida
A. Badis	Pr	Membre de CP	Université de Blida
H. Boutoumi	MCA	Membre de CP	Université de Blida
N. Bouzidi	MCB	Membre de CP	Université de Blida
O. Touafak	MCB	Membre de CP	Université de Blida
N. Ayachi	MAA	Membre de CP	Université de Blida

Promotion 2012-2013

# *Dédicaces*



*Je dédie cet humble travail de mémoire au préalable:*

*A ma mère*

*A mon père*

*A mes frères Imad et Moncef*

*A tous ceux qui me sont chers*

*Nassima*

# Remerciements

*Avant tout je remercie mes chers parents qui m'ont entouré de leur amour, leurs sacrifices, leur protection et de leur générosité durant toute la durée de mes études « Que dieu les protège »*

*Mes sincères remerciements à ma promotrice M<sup>me</sup> K. BOUTEMAK pour les enseignements qu'elle m'a prodigué, pour son encadrement et les conseils apportés tout au long de ce travail ainsi que pour la confiance qu'elle m'a témoignée au cours des manipulations.*

*Je remercie également le Pr. M. ELHATTAB de m'avoir offert la possibilité de travailler dans un domaine qui me passionne.*

*Je désire aussi remercier Mme S. KASMI pour toute sa disponibilité et son aide et son soutien sur le plan scientifique et humain*

*Un merci spécial pour tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.*

*Je n'oublie surement pas mes collègues et amies qui ont contribué par leur soutien et amitié, chacun par sa façon à la progression de mon travail dans une ambiance toujours amicale et stimulante.*

*Un très grand merci pour tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Enfin je remercie vivement tous les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.*

## Liste des abréviations

**A .c** : Artemisia campestris L.

**A.F.N.O.R.** : Association Française de Normalisation.

**ATCC**: American Type Culture Collection.

**BBD** :Box Behenken Design

**CG-M S** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse

**°C** : Degré Celsius

**D** : La densité

**EV** : entrainement à la vapeur d'eau

**FRAP**: Ferric reducing antioxidant power

**FV**: fraction volatile

**g** : gramme

**HE** : Huile essentielle mg CAE/g

**I<sub>A</sub>** : Indice d'acide

**I<sub>E</sub>** : Indice d'ester

**I<sub>S</sub>** : Indice de saponification

**Meb** : microscope electronique a balayage

**M<sub>HE</sub>** : Masse d'huile essentielle

**M<sub>MV</sub>** : Masse de la matière végétale

**R** : Rendement en huile essentielle

**SE-SD** : solvant extraction –steam distilation

**T** : Temps

**v.c.r.** : Variables centrées réduites

## Liste des figures

### CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Figure 1:</b> planche d' <i>Artemisia campestris</i> L.....	4
<b>Figure 2:</b> <i>Artemisia campestris</i> L.....	5
<b>Figure 3 :</b> les monoterpènes identifiés dans l'HE d' <i>Artemisia campestris</i> L.....	11
<b>Figure 4 :</b> les sesquiterpènes identifiés dans l'HE d' <i>Artemisia campestris</i> L.....	12

### CHAPITRE II

#### MATERIELS ET METHODES

<b>Figure 5 :</b> Le schéma directeur des différentes étapes de notre étude.....	19
<b>Figure 6 :</b> Situation géographique de la région de récolte.....	20
<b>Figure 7:</b> planche d' <i>Artemisia campestris</i> .L.....	21
<b>Figure 8 :</b> montage entraînement à la vapeur d'eau .....	22
<b>Figure 9 :</b> montage à reflux.....	24
<b>Figure 10 :</b> microscope électronique à balayage.....	32
<b>Figure 11 :</b> Aromatogramme sur boîte de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle.....	34

### CHAPITRE III

#### RESULTATS ET DISCUSSION

<b>Figure 12 :</b> influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle.....	40
<b>Figure 13:</b> cinétique de l'extraction de l'HE par entraînement à la vapeur.....	41
<b>Figure 14:</b> Huile essentielle de l'armoise champêtre.....	42
<b>Figure 15:</b> effet du solvant sur le rendement en extrait.....	44
<b>Figure 16 :</b> l'effet du rapport ml/g sur le rendement de l'extrait.....	44

<b>Figure 17</b> : Effet du temps sur le R(%).....	45
<b>Figure 18</b> : Effet du nombre d'extraction sur le R(%).....	45
<b>Figure 19</b> : diagramme des effets standardisés sur le rendement.....	49
<b>Figure 20</b> : effet simples des paramètres opératoires sur le rendement.....	50
<b>Figure 21</b> : effets d'interaction des paramètres opératoires sur le rendement.....	51
<b>Figure 22</b> : Surface de réponses correspondant au couple temps d'extraction- nombre d'extraction pour un rapport liquide/solide = 5,75 .....	53
<b>Figure 23</b> : Surface de réponses correspondant au couple temps d'extraction- rapport liquide/solide pour un nombre d'extraction= 3,00.....	54
<b>Figure 24</b> : Surface de réponses correspondant au couple nombre d'extraction- rapport liquide/solide pour un temps d'extraction= 2,5H.....	54
<b>Figure 25</b> : extrait de <i>l'Artemisia campestris. L</i> .....	55
<b>Figure 26</b> : la fraction volatile d' <i>Artemisia campestris L</i> .....	56
<b>Figure 27</b> : La structure de la feuille d' <i>artemisia campestris</i> observée au microscope électronique à balayage avant extraction.....	57
<b>Figure 28</b> : La structure de la feuille d' <i>artemisia campestris</i> observée au microscope électronique à balayage après extraction par EV.....	58
<b>Figure 29</b> : La structure de la feuille d' <i>artemisia campestris</i> observée au microscope électronique à balayage après extraction par EV avec prétraitement enzymatique.....	58
<b>Figure 30</b> : La structure de la feuille d' <i>artemisia campestris</i> observée au microscope électronique à balayage après extraction par solvant (A) et par extraction par solvant avec prétraitement enzymatique(B).....	59
<b>Figure 31</b> : composition chimique d' <i>Artemisia campestris L</i> .....	63
<b>Figure 32</b> : profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle d' <i>artemisia campestris. L</i> par entraînement à la vapeur d'eau.....	64

<b>Figure 33:</b> composition chimique de l'HE d'Artemisia traité par l'enzyme.....	70
<b>Figure34 :</b> profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle d'Artemisia campestris L. traité par l'enzyme.....	71
<b>Figure 35 .</b> Aromatogramme de <i>E. Coli</i> avec les 3 échantillons.....	72
<b>Figure36.</b> Aromatogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> avec les 3 échantillons.....	73
<b>Figure 37</b> Aromatogramme de <i>Streptococ</i> avec les 3 échantillons.....	73
<b>Figure38 :</b> Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries.....	74
<b>Figure 39 :</b> virement de la couleur jaune de fer ferrique en couleur bleu vert du fer ferreux...	75
<b>Figure 40:</b> activité antioxydante d'Artemisia campestris L.....	76

## Liste des tableaux

### CHAPITRE I

#### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Tableau 1 :</b> Teneur en polyphénols, en flavonoides et en tannins de la partie aérienne <i>d'Artemisia campestris.L</i> .....	7
<b>Tableau 2 :</b> composé majoritaire de l'Huile essentielle <i>d'Artemisia campestris.L</i> .....	9
<b>Tableau 3 :</b> composé majoritaire de l'Huile essentielle <i>d'Artemisia campestris.L</i> .....	10

### CHAPITRE II

#### MATERIELS ET METHODES

<b>Tableau 4 :</b> Plan d'expériences de Box-Benhken à 3 facteurs.....	27
<b>Tableau 5 :</b> Domaine d'étude des paramètres opératoires par le plan Box-Benhken (en coordonnées réelles et en coordonnées centrés réduites).....	28

### CHAPITRE III

#### RESULTATS ET DISCUSSION

<b>Tableau 6 :</b> Le rendement en huile essentielle en fonction de la partie utilisée.....	39
<b>Tableau 7 :</b> variation du rendement en fonction du temps d'extraction.....	40
<b>Tableau 8 :</b> Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle <i>d'Artemisia campestris.L</i> .....	42
<b>Tableau 9 :</b> Propriétés physico-chimique l'huile essentielle <i>d'Artemisia campestris.L</i> .....	43
<b>Tableau 10 :</b> expériences réalisées dans le plan expérimental et rendement obtenus.....	46
<b>Tableau 11 :</b> analyse de la variance du rendement en extrait.....	48
<b>Tableau 12 :</b> effets estimés de coefficients.....	52
<b>Tableau 13 :</b> les conditions optimales d'extraction par solvant.....	55
<b>Tableau 14 :</b> Comparaison du rendement des différentes techniques d'extraction sans et avec un prétraitement enzymatique.....	56

<b>Tableau 15 :</b> Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles d'artemisia campestris extraite par entraînement à la vapeur d'eau sans prétraitement.....	60
<b>Tableau 16 :</b> Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles d'Artemisia campestris L traité par l'enzyme.....	65
<b>Tableau 17:</b> diamètre des zone d'inhibition d'Artemisia campestris .L .....	72
<b>Tableau 18:</b> résultats expérimentaux de l'activité antioxydante .....	75

## SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE .....	1
-----------------------------	---

### PARTIE THEORIQUE

#### CHAPITRE I

#### SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction.....	4
I. Présentation de la plante <i>Artemisia campestris</i> .L.....	4
I.1. Classification.....	4
I.2. Noms vernaculaires.....	4
I.3. Description botanique de <i>l'Artemisia campestris</i> L.....	5
I.4. Répartition géographique.....	6
I.5. Parties Utilisée .....	6
I.6. Composition chimique <i>d'Artemisia campestris</i> L.....	6
I.6.1. Etude des extraits lipidiques <i>d'Artemisia campestris</i> L.....	6
I.6.2. Etude de la composition chimique des huiles essentielles d' <i>Artemisia campestris</i> L.....	8
I.7. L'utilisation traditionnelle d' <i>Artemisa campestris</i> .....	12
I.8. Activités biologiques.....	13
I.8.1. Activité antioxydante.....	13
I.8.2. Activité anti cancéreuse .....	14
I.8.3. activité antibactérienne et antifongique.....	14
I.8.4. Activité hypoglycémiante .....	15
I.8.5. Effets antipoison.....	15
I.8.6. Propriétés allélopathiques.....	15

II.5.1. Choix de l'enzyme.....	31
II.5.2. Mode opératoire.....	31
II.6. Analyse microscopique.....	31
II.6. Analyse de la composition chimique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS).....	32
II.8. Activités biologiques.....	33
II.8.1 Etude de l'activité antimicrobienne d'HE d' <i>artemisia campestris</i> .L.....	33
II.8.1.1. Technique en milieu solide : Méthode des aromagrammes.....	34
II.8.1.2. Microorganismes utilisés.....	34
II.8.1.3. Milieux de culture.....	35
II.8.1.4. Protocole expérimental.....	35
II.8.2. Activités antioxydantes.....	36
II.8.2.1. Méthode de la réduction du fer FRAP .....	36

### CHAPITRE III

#### RESULTATS ET DISCUSSION

III.1 Extraction de l'huile essentielle d' <i>Artemisia campestris</i> . L par entraînement à la vapeur d'eau.....	39
III.1.2. Les paramètres influençant le rendement en HE.....	39
III.1.2.1. Influence de La partie utilisée de la plante.....	39
III.1.2.2. Influence du temps d'extraction.....	40
III.1.2.3. Influence de la masse végétale.....	40
III.1.3. Evolution du rendement en HE selon la durée d'extraction (cinétique).....	41
III.1.4. Caractérisation de l'huile essentielle de l' <i>artemisia campestris</i> L.....	42
III.1.4.1. Propriétés organoleptiques.....	42

III.1.4.2. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle <i>d'Artemisia campestris L.</i> ....	43
III.2.Extraction par solvant .....	43
III.2.1. Effet des différents paramètres d'extraction sur le rendement en extrait.....	44
III.2.2. Optimisation des conditions expérimentales par la méthodologie des plans d'expériences.....	46
III.2.2.1.Expérimentation.....	46
III.2.2.2.Etude de l'influence des paramètres opératoires sur le rendement.....	47
III.2.2.2.1.Analyse de la variance.....	47
III.2.2.2.2. Analyse graphique des résultats.....	49
a) Diagramme de Pareto.....	49
b) Les effets simples.....	50
c) L'effet d'interaction .....	51
III.2.2.2.2.3 Détermination du modèle mathématique.....	52
III.2.2.2.4. Définition des conditions optimales.....	53
a) surfaces de réponse.....	53
b) Conditions optimal.....	55
III.3.Isolation de la fraction volatile à partir de l'extrait par solvant par entraînement à la vapeur d'eau (la technique de combinaison SE-SD).....	56
III.4. Evaluation des effets du prétraitement enzymatique de la matière végétale.....	56
III.5.Analyse par microscopie à balayage de la feuille d'A.C.L (MEB).....	57
III.7. Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	59
III.8.Activités biologiques.....	72
III.8.1.Evaluation de l'Activité antibactérienne.....	72

III.8.2.Evaluation de l'activité antioxydante.....75

Conclusion .....78

## المخلص

في اطار تقييم الانواع النباتية الجزائرية اجرينا هذه الدراسة على احد النباتات الطبية الدققت من عائلة الارتميزيا التي تعتبر من بين الانواع الاكثر استعمالا في الطب التقليدي من طرف سكان المغرب العربي الكبير.

لقد قمنا باستخراج الزيت الاساسي بطريقة التقطير بالبخار حيث اظهرت دراسة بعض العوامل التي تؤثر على محصول الزيت الاساسي أن الورقة هي التي تعطي أفضل مردود بنسبة % 0,82

قمنا ايضا بدراسة تأثير بعض العوامل على مردود الاستخلاص بالمذيبات عن طريق منهجية تصميم التجارب حيث اكدت لنا ان العوامل "وقت الاستخراج" و " عدد مرات الاستخراج " و " نسبة السائل / الصلب " لها تأثير على العائد

دراسة اخرى اظهرت لنا تأثير المعالجة الأنزيمية لورقة الدققت على مردود الزيت الاساسي حيث سجلنا تزايد هذا الاخير من 0,73% الى 0,41%. بالنسبة لطريقة التقطير بالبخار اما بالنسبة لطريقة الاستخلاص بالمذيبات فقد تزايد المردود من 0,52% الى 0,80%

كشف الفحص الكيميائي للزيت الاساسي بواسطة (الكروماتوغرافيا الغازية/الوصف الكمي ) المركبات الرئيسية التالية : الهيدروكاربونات (44,26%)، جاغماكان د(8,59%) و المركبات الاكسجينية ب معدل (22,95%)

تم إجراء تقييم لنشاط مضادات الميكروبات من خلال طريقة النشر على الوسط الصلب لسلاطات الجرثيم: ستافيلوكوكيس اوريبس ، الإشريشيا كولوي، التي اظهرت حساسية للزيت على عكس ستغيبوتوكوك التي اظهرت مقاومة للزيت الاساسي لنبات الدققت.

اما بالنسبة لتقييم نشاط مضاد الاكسدة فقد قمنا به عن طريق ارجاع الحديد و اظهرت ان نبات الدققت لها نشاط قليل مقارنة بالفيتامين د.

**كلمات البحث:** الدققت ، الزيوت الأساسية ، التقطير بالبخار، منهجية تصميم التجارب ، المعالجة الأنزيمية ، التركيب الكيميائي عن طريق (الكروماتوغرافيا الغازية/الوصف الكمي )، مضادة للجرثيم ، نشاط مضادات الأكسدة.

## Résumé

Le travail présente les résultats d'une étude menée sur l'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau en étudiant certains paramètres influençant le rendement en huile essentielle de cette espèce qui a donné un meilleur rendement de l'ordre de 0,82%.

L'utilisation de la méthodologie de plans d'expérience Box-Behenken pour étudier les effets des paramètres opératoires de l'extraction par solvant a révélé que l'effet simple du « temps d'extraction » et du « nombre d'extraction », l'effet quadratique du « temps d'extraction » et du « rapport liquide/solide » ainsi que l'effet d'interaction « temps d'extraction- rapport liquide /solide » avait une influence sur le rendement en extrait. L'adéquation du modèle obtenu par rapport à la mesure expérimentale a donnée un  $R^2$  égale à 97,52%.

L'évaluation de l'effet du prétraitement enzymatique de la matière végétale à vérifié une augmentation du rendement de 0,37% à 0,41% en huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau et une augmentation du rendement en fraction volatile du 0,52% à 0,80% extraite par la technique de combinaison SE-SD.

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. réalisée par CG/MS a montré qu'elle est principalement constituée des sesquiterpènes hydrocarbonés (44.26%) tel que Germacrene D (8.59%) suivi par les sesquiterpènes oxygénés (22,95%) tel que (+) spathuléol (1,24%). Les monoterpènes hydrocarbonés oxygénés occupent environ 9,83% de l'huile essentielle.

Les résultats des tests d'activité antibactérienne effectués par la méthode de diffusion sur gélose ont montré une forte activité contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* par contre *Streptocoque* a été la seule bactérie résistante.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de fer (FRAP) a montré que L'huile essentielle et la fraction volatile de l'*Artemisia campestris* L. présente un pouvoir antioxydant modéré par rapport à l'acide ascorbique.

**Mots clés :** *Artemisia campestris* L, Huile essentielle, Box Behenken, prétraitement enzymatique, CG-MS, activité antibactérienne, activité antioxydant

## Abstract

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

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 0,82%.

The optimization with a methodology of Box Behnken design to study the effects of operating parameters of the solvent extraction showed that the single effect of "extraction time" and "number of extraction" quadratic effect of "extraction time" and "liquid / solid ratio" as well as the interaction effect "time-liquid extraction ratio / solid" have an influence on the extract yield. The adequacy of the model obtained from the experimental measurement give an  $R^2$  equal to 97.52%.

The evaluation of the effect of enzymatic pretreatment of the plant material tested increase, the yield of essential oil from 0.37% to 0.41% extracted by steam distillation and increase the yield of the volatile fraction from 0.52% to 0.80% by the extracted combination technique SE-SD.

The chemical composition of the essential oil of *Artemisia campestris* L leaves, obtained by steam distillation, was investigated by GC-MS. The chemical composition showed a different classes of composition as: sesquiterpenes hydrocarbons (44.26%) such as germacrene D (8.59%) followed by oxygenated sesquiterpenes (22.95%) such as (+) spathulenol (1.24%). The hydrocarbon and oxygenated monoterpenes occupy about 9.83% of the essential oil.

The results of the antibacterial activity by the method of agar diffusion have showed a high activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus* was the only resistant bacteria.

The evaluation of antioxidant activity by the method of reduction of iron (FRAP) showed that essential oil and the volatile fraction of *Artemisia campestris* L. has a moderate antioxidant compared to ascorbic acid.

**Keywords:** *Artemisia campestris* L, essential oil, Box Behnken, enzymatic pretreatment, chemical composition by GC-MS, antibacterial, antioxidant activity;

---

# INTRODUCTION GENERALE

---

## INTRODUCTION

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant pour des applications dans de nombreux produits de consommation. Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps. Ces plantes représentent une source immense de molécules chimiques complexes exploitées par l'Homme dans l'industrie des parfums, agro-alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. La plupart des végétaux renferment des huiles essentielles ; ils sont alors appelés « plantes aromatiques ». Un grand nombre de plantes aromatiques possèdent des propriétés biologiques très intéressantes [1]. Cependant, l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plante d'utilisation rare ou moins fréquente ou non connues en médecine [2].

L'étude des huiles essentielles est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté et les développements exponentiels des biotechnologies végétales. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives [3,4], qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie mais le rendement en huile essentielle qui est très faible les rend non exploitable de ce fait, le développement d'un procédé est devenu nécessaire, actuellement et au cours des 50 dernières années des méthodes non-conventionnelles ont été développés pour améliorer le rendement global et la sélectivité des composants bioactifs à partir de la matière végétale, parmi lesquelles on cite le prétraitement enzymatique qui est une méthode alternative qui améliore le rendement sans modification des caractéristiques qualitatives des molécules bioactives [5].

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Artemisia*, ce dernier est largement distribué surtout dans les régions semi arides. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Artemisia campestris*. Cette plante largement utilisée pour traiter les troubles digestives, les ulcères, les brûlures, la diarrhée,...etc. a constitué le sujet de plusieurs études qui font déterminé leurs compositions chimiques [6].

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressé à étudier l'espèce *Artemisia campestris. L.*, une plante spontanée largement utilisée par les habitants des hauts plateaux algériens en médecine traditionnelle, dans le but de faire une extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau et l'approche des conditions optimales ainsi que la caractérisation de l'huile essentielle grâce à la détermination de sa composition chimique. Dans ce travail, nous avons aussi étudié et optimisé le procédé d'extraction par solvant.

Un prétraitement enzymatique de la matière végétale a été utilisé dans l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau et dans l'extraction par solvant dans le but d'étudier l'effet de ce prétraitement sur le rendement d'une part et sur la qualité de l'huile essentielle obtenu par le procédé entraînement à la vapeur d'eau d'autre part.

Ce travail vise aussi à étudier l'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris.L*

Ce manuscrit est composé de deux parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique dans laquelle, on présentera la matière végétale, son utilisation et les travaux dont elle a fait l'objet.
- La deuxième partie sera consacrée aux matériels et méthodes employés lors de cette étude. A partir de l'interprétation et des discussions des résultats expérimentaux, nous terminerons par une conclusion générale les différents travaux réalisés et les perspectives des actions à mener.

---

CHAPITRE: I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

## Introduction

Le genre *Artemisia* est l'un des plus importants de la famille des *Asteraceae*. Cette famille est l'un des groupements végétaux les plus volumineux, largement distribué avec environ 1530 genres et près de 23000 espèces différentes dispersées sur toute la terre [7,8]. Les astéracées sont parmi les taxons les plus importants du règne végétal principalement représentées par des espèces vivaces, utilisées pour des fins alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques [9].

*Artemisia* est l'un des plus importants genres de cette famille. Il comprend environ plus de 500 espèces réparties sur les cinq continents et onze espèces peuvent être trouvés dans la flore algérienne [10,11]. Parmi ces espèces, *Artemisia campestris* L. (dgouft) une plante aromatique et médicinale.

### I. Présentation de la plante *Artemisia campestris* L

#### I.1. Classification [12]

- Règne : *Plantae*.
- Embranchement : *Angiospermes*
- Classe : *Dicotylédones*
- Ordre : *Astrales*
- Famille : *Astéracées ou Composées*
- Sous-famille : *Anthémidées*
- Genre : *Artemisia*
- Espèce : *Campestris*.



Figure 1: planche d'*Artemisia campestris* L

#### I.2. Noms vernaculaires

- Nom vernaculaire [13]: "Degouft, Alala ou "Chaal"
- Nom arabe (Moyen orient) [13] : "Echchih el boustani"
- Nom français [14]: *Armoise champêtre ou Armoise des champs, Armoise rouge*
- Nom anglais [14]: field – wormwood.

### I.3. Description botanique de *l'Artemisia campestris L.*

*Artemisia campestris L.* est une plante vivace, de 10 à 80 cm, possède des capitules de fleurs jaunes, visible surtout par leur aspect luisant. Les feuilles sont vertes ou d'un vert brunâtre divisées en lanières étroites, les feuilles moyennes sont deux fois divisées, les supérieures sont sans pétiole, les inférieures sont avec un pétiole de plus en plus long à mesure qu'on s'approche de la base de la tige.

Les tiges sont ligneuses sur une assez grande longueur au moins dans leurs partie inférieures. Les capitules sont ovoïdes (plus rarement presque globuleux), portés chacun sur un petit rameau très court, nombreux, disposés en une inflorescence rameuse et entremêlée de feuilles [14, 15].

Le système racinaire est généralement puissant avec une racine principale pivotante pouvant atteindre un mètre de profondeur et présentant des racines secondaires horizontale.

Cette espèce présente deux périodes de croissance végétative : l'une vers le mois de Novembre et l'autre, est observée en plein printemps (mars-avril) avec un repos végétatif en hiver (janvier), saison durant laquelle la plante est assez apprêtée par les animaux. [16]



**Figure 2:** *Artemisia campestris L*

#### **I.4. Répartition géographique**

*Artemisia campestris L.* est répandue presque dans tout l'hémisphère nord. Au Mexique et dans la partie nord des Etats-Unis ; elle est classée parmi la végétation des roches siliceuses [17]. Elle se développe dans une bonne partie de l'Europe. En France, on la rencontre au sud de la Seine et du Jura et beaucoup plus rare au nord [18,19]. Elle se trouve à l'ouest de l'Asie et au Nord de l'Afrique. Elle est présente du Maroc au Libye (zone littorale de la Tripolitaine) et dans les rivages méditerranéens jusqu'au cœur du Sahara.

En Algérie, cette espèce est distribuée sur les hauts-plateaux, surtout dans les pâturages semi-arides. Elle est plus rare dans la région présaharienne et au Sahara septentrional. Elle apparaît dans les montagnes du Sahara central, assez répandue au Hoggar, plus rare au Tafdest et au Tassili des Ajjer [16,20].

#### **I.5. Parties Utilisées**

Les parties utilisées sont respectivement : les feuilles, les fleurs [21], les tiges [22] et les racines [23].

#### **I.6. Composition chimique d'*Artemisia campestris L.***

L'étude phytochimique des plantes du genre *Artemisia* a largement été étudiée ces dernières années. L'ensemble des composés isolés et identifiés est très hétérogène. Ainsi, les principaux métabolites secondaires les plus rencontrés sont les huiles essentielles, les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins, les saponines, les terpènes et les alcaloïdes. [24, 25]. Les différents travaux réalisés sur cette espèce sont les suivants :

##### **I.6.1. Etude des extraits lipidiques d'*Artemisia campestris L.***

Plusieurs travaux ont été effectués sur les extraits lipidiques des différentes parties de *Artemisia campestris L.* en utilisant différents solvants : éthanol, méthanol, hexane, et l'eau. Ces études ont mené à l'isolement de plusieurs molécules de différentes classes. Il s'agit notamment de flavanone, dihydroflavonol, flavone, acétophénone, chromone, hydroxyacétophénone, sesquiterpènes, acétylènes et chromène [26].

D'autres travaux ont été consacrés au dosage des polyphénols. Le contenu phénolique total, les flavonoïdes et les tannins des extraits lipidiques de la partie aérienne d'*ArtemisiaCampestris L.* ont été déterminés par des méthodes spectrophotométriques (Tableau1).

**Tableau 1 :** Teneur en polyphénols, en flavonoides et en tannins de la partie aérienne d'*Artemisia campestris.L*

Les extraits	polyPhénols totaux <sup>a</sup>	Flavonoïdes <sup>b</sup>	Tannins <sup>c</sup>	Réf
Extrait aqueux	31,33	131,89	15,49	21
Extrait éthanolique 50%	56, 3	463,2	/	27
Extrait aqueux	24	311,5	/	27
Extrait aqueux	56,67	/	/	22
Extrait méthanolique	164,7	118,2	/	28
Extrait méthanolique obtenue par ultrason	141,2	102,5	/	28
Extrait méthanolique obtenue par soxhlet	128,1	104,5	/	28

a: mg CAE/g , b : EQ(mg/g), c : CE(m/m).

### **I.6.2. Étude de la composition chimique des huiles essentielles *d'Artemisia campestris.L***

La composition chimique de l'huile essentielle varie selon le chimiotype considéré [3]. Elle varie également selon les conditions géographiques et climatiques (température, altitude, précipitation, hauteur, direction du vent, période de cueillette, etc.), et selon la phase de développement de la plante [29].

Plusieurs études ont identifié la composition chimique des huiles essentielles *d'Artemisia campestris L.* L'huile essentielle est analysée par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS). Les composés majoritaires, la méthode d'extraction, la partie utilisée, l'origine de la plante, de chaque étude sont représentés

dans le tableau suivant :

Tableau 2 : composé majoritaire de l'Huile essentielle d'*Artemisia campestris*.L

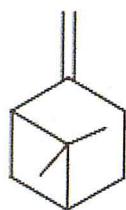
Partie utilisé	Méthode d'extraction	Nombre des composés identifiés	Composé majoritaire	Origine de la plante
Partie aérienne collecté en plein floraison	Hydrodistillation (3h)	58	$\alpha$ -terpinène 18,8%, $\alpha$ -pinène 18, 4% camphre (9,2%) le camphène (7,7%), le limonène et le bornéol (5,2% pour chacun).	Boussaada algérie [30]
Partie aérienne fraîche	Hydrodistillation (4h)	32	Les constituants : $\beta$ pinène (25,6), sabinène (17%), $\alpha$ - pinène (9,9%) limonène (6,6)	Djbel amour (sahara atlas) algérie [11]
Partie aérienne sèche	Hydrodistillation (3h)	18	$\beta$ -Pinène (20,75) Limonène, $\square$ terpinène (10%) Germacrène D (9,53%), Myrcène (7,9%), $\alpha$ - pinène (6,02%), (E)- $\beta$ - Ocimène (Z)- $\beta$ -Ocimène (4%), sabinène (2,86%)	Djelfa (algérie) [31]
Partie aérienne	-	-	$\beta$ -pinène (24,3-27,9%), p-cymène (17,4-22,3%), $\alpha$ -pinène (4,1-11,0%), camphre (0-10,3%), $\alpha$ -cubébène (0-6,6%), $\gamma$ -terpinène (0-5,0%), spathuléol (7,1-10,3%) et $\beta$ -eudesmol (4,4-6,5%).	Tunisie [26]

Tableau 3 : composé majoritaire de l'Huile essentielle d'Artemisia campestris.L

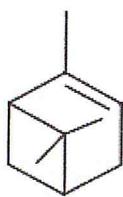
Partie utilisée	Méthode d'extraction	Nombre des composés identifiés	Composés majoritaires	Origine de la plante
Partie aérienne collectée en pleine floraison	Hydrodistillation (4h)	18	B -Pinène(45,8%), $\alpha$ -pinène(12,5%),Limonène(7,7%),p-Cymène(4,6%), $\square$ terpinène(3,6%),Myrcène(3,3%)	Tunisie [23]
Partie aérienne collectée en pleine floraison	Hydrodistillation (2h)	51	$\gamma$ -terpinène(46,5%), capillène(8,9%), 1-phenyl-penta2,4-diène(26%), methyl Eugenol, p-cymène et $\beta$ -pinène.(2,3%)	France [32]
Partie aérienne	-	-	$\gamma$ -terpinène(1,4-46,5%), capillène (8,9-33,1%), 5-Phényl-penta-1,3-diyne (16,2-29,7%), spathulénol (0-11,3%), o-méthyleugénol(4,5-6,6%), p-cymène (1,7-4,5%) et d-pinène (0-3,7%).	France [26]
Partie aérienne	Extraction par solvant avec le soxhlet (6h)	50	$\beta$ -Pinène (6, 31%), 1-phenyl-penta-2,4-diène(2,06%), méthyl eugenol(5,49%), 1,2-dihydro acenaphthylène(20,71%), spathulénol(6,47%), capilline(10,38%), tremétone(15,83%)	Turquie [8]

L'huile essentielle de la partie aérienne d'*Artemisia campestris.L* est constituée des monoterpènes et sesquiterpènes comme toutes les huiles essentielles [33] dont les principaux composés sont identifiés dans les figures 3 et 4. L'huile essentielle diffère seulement dans les teneurs de chaque composé et cela est dû à l'influence des facteurs environnementaux et écologiques.

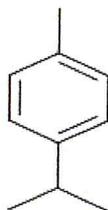
Hydrocarbures monoterpéniques :



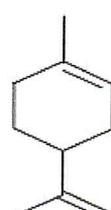
**$\beta$ -Pinène**



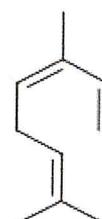
**$\alpha$ -Pinène**



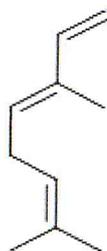
**p-Cymène**



**Limonène**



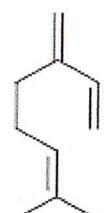
**(Z)- $\beta$ -Ocimène**



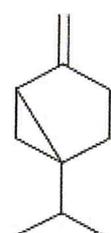
**(E)- $\beta$ -Ocimène**



**$\gamma$ -terpinène**



**Myrcène**

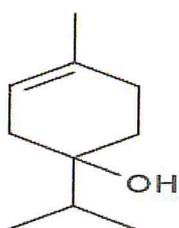


**Sabinène**

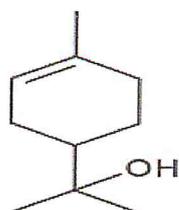


**$\beta$ -phellandrène**

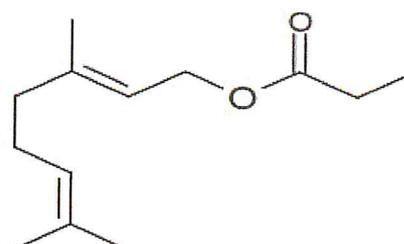
Monoterpènes oxygénés :



**Terpinen-4-ol**



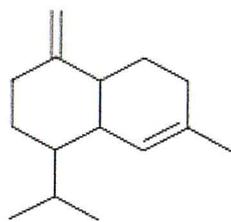
**$\alpha$ -Terpinéol**



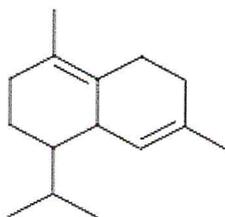
**n-Propanoate de géranyle**

**Figure 3 :** les monoterpènes identifiés dans l'HE d'*Artemisia campestris L.*[34]

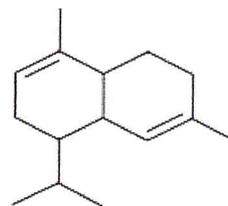
### Hydrocarbures sesquiterpéniques :



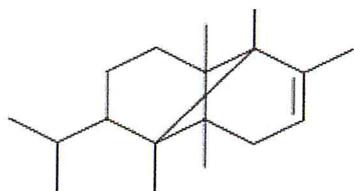
**☐Muurolène**



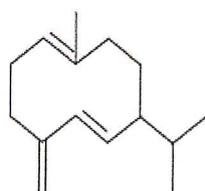
**δ-Cadinène**



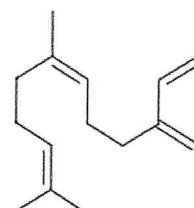
**α -Muurolène**



**α- copaène**

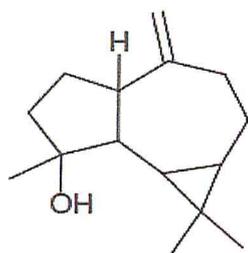


**Germacrène D**

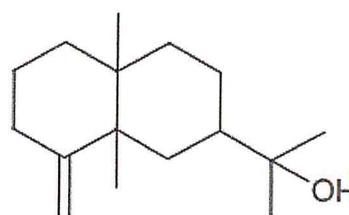


**(Z)-β-Farnésène**

### sesquiterpènes oxygénés :



**Spathuléol**



**β-Eudesmol**

**Figure 4** : les sesquiterpènes identifiés dans l'HE d'*Artemisia campestris* L.[34]

### **I.7. L'utilisation traditionnelle d'*Artemisa campestris***

*Artemisia campestris*.L est une plante utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle et très connue par les habitants du Maghreb. Elle est largement utilisée et réputée pour ses vertus thérapeutiques [35].

Les parties utilisées sont les feuilles et les sommités en infusion, en décoction, en macération ou en cataplasme [21].

Les parties aériennes de la plante sont utilisées Comme antihelminthique antiseptique, cholagogue, tonic, hypotensif et antivenin [23].

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 et elle possède des propriétés cicatrisantes et emménagogues.

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 serpents 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 [27].

Cette plante était utilisée aussi par les tribunes du nord de l'Amérique comme remède pour les difficultés de grossesse et aussi pour soigner le rhumatisme, l'eczéma, les ecchymoses et les plaies. L'infusion des racines était utilisée spécialement pour les enfants comme tonifiant des cheveux et pour le traitement des infections du cuir chevelu [23]. L'Armoise champêtre figure aussi dans la liste des plantes vasculaires médicinales indigènes du Québec [36].

## **I.8. Activités biologiques**

En plus de leurs utilisations traditionnelles, *Artemisia campestris L.* possède de nombreuses propriétés biologiques, parmi lesquelles on cite les plus importantes :

### **I.8.1. Activité antioxydante**

- ✓ Une étude faite par A.djeridane et all [37, 38] ont montré que l'extrait éthanolique d'*Artemisia campestris L.* d'Algérie contient des teneurs en composés phénolique tels que les flavonoides plus élevée que les autres plantes étudié et ils sont constaté qu'il y avait une corrélation entre la teneur en composé phénolique et son activité antioxydante .
- ✓ Une autre étude faite par Aniya et al (2000)[39] l'activité antioxydante de l'extrait aqueux d'*Artemisa campestris* a été testée par la méthode de DPPH (2,2-diphényl-1-

1-picrylhydrazyl), les résultats obtenus ont montré que l'extrait aqueux possède une activité antioxydante élevée.

- ✓ De leur côté Akrouf et al [27] ont étudié l'activité antioxydante de trois extraits de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* (huile essentielle, extrait aqueux, extrait éthanolique 50%) en utilisant trois méthodes différentes: la méthode de DPPH, la technique de décoloration du  $\beta$ -carotène et la méthode d'ABTS (2,2 azinobis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ils ont trouvé que l'huile d'*Artemisia campestris* possède une faible activité antioxydante, alors que les extraits aqueux et organique montrent une activité antioxydante importante en comparaison à celle de l'huile essentielle.

### **I.8.2. Activité anti cancéreuse [22]:**

Cette étude a été consacrée sur le pouvoir inhibition in vitro de la croissance du cancer des cellules de carcinome (HT-29) d'un colon humain par quelques extraits d'*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.

Des 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 l'huile essentielle de l'*A. campestris* avec un GI50 valeur de 46,82  $\mu$ g / ml.

### **I.8.3. activité antibactérienne et antifongique**

- ✓ *Artemisia campestris* L. est une plante médicinale utilisée dans le traitement de nombreuses infections telles que les infections urinaires. Naili et al (2010) ont testé l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia campestris*, ils ont trouvé que l'activité de cet extrait a été plus efficace contre les bactéries gram positif (*Staphylococcus aureus*) que les bactéries gram négatif (*Escherichia coli*) [25].
- ✓ En outre *Artemisia campestris* possède des propriétés antifongiques, Kyeong et ses collaborateurs (2007)[40] ont étudié l'effet antifongique de l'extrait aqueux des racines d'*Artemisia campestris* sur des champignons de mycorhize, les résultats obtenus montrent que l'extrait aqueux possède un potentiel antifongique.

#### **I.8.4. Activité hypoglycémiante [21]**

Sefi et al (2010) ont trouvé que l'extrait aqueux des feuilles d'*Artemisia campestris*, diminue le taux de glucose dans le plasma des rats chez lesquels le diabète est induit par l'alloxane monohydrate, ils ont trouvé également que la diminution de la concentration de glucose s'accompagne d'une part d'une diminution des taux de triglycérides et des lipoprotéines de faibles densité (LDL) et d'autre part d'une augmentation du niveau de l'insuline, ce qui peut prévenir les complications du diabète.

#### **I.8.5. Effets antipoison**

Les extraits d'acétate d'éthyle, éthanol, méthanol et de dichlorométhane, des feuilles d'*Artemisia campestris* ont été testés pour ses capacités de neutralisation de venin de scorpion et de vipère, les résultats obtenus ont montré que l'extrait éthanolique, inhibe l'activité de dégradation des globules rouges contre le venin du scorpion *Androctonus australis garzonii*. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'extrait de dichlorométhane pour la neutralisation de venin de la vipère *Macrovipera lebetina* [41].

#### **I.8.6. Propriétés allélopathiques**

Les plantes du genre *Artemisia* possèdent des propriétés allélopathiques par inhibition de la croissance et la germination de certaines plantes de l'entourage, Ces propriétés sont dues probablement à la présence d'acide phénolique, et d'autres composants polaires [40].

#### **I.8.7. Effets insecticide**

Une étude récente a été réalisée par Pavela (2009), [6] où l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Artemisia campestris* a été testé pour son activité répulsive contre les femelles adultes d'une espèce de moustique *Culex quinquefasciatus*. Cet extrait a montré un degré de répulsion très intéressant contre ces parasites vecteurs de plusieurs maladies comme la malaria.

---

# PARTIE EXPERIMENTALE

---

---

**CHAPITRE: II**

**MATERIELS ET METHODES**

---

## MATERIELS ET METHODES

### Introduction

Ce chapitre est consacré à

- L'extraction de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* L. par entraînement à la vapeur d'eau,
- L'extraction par solvant organique avec étude des effets des différents paramètres d'extraction sur l'extrait,
- Optimisation des conditions expérimentales de l'extraction par solvant par la méthode des plans d'expériences,
- Isolation de la fraction volatile de l'extrait par entraînement à la vapeur d'eau en appliquant la technologie de combinaison d'un solvant organique et l'entraînement à la vapeur d'eau (SE-SD),
- Evaluation des effets du prétraitement enzymatique de la matière végétale,
- Etude de la composition chimique de l'huile essentielle par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS),
- Activités biologiques.

Notre travail a été réalisé au niveau de quatre structures scientifiques :

- ❖ L'extraction de l'huile essentielle et la détermination des indices physico-chimiques et l'activité antioxydante ont été réalisées au laboratoire de chimie des substances naturelles du département de Chimie de l'Université Saad DAHLEB de Blida (USDB).
- ❖ L'observation microscopique a été effectuée au sein de département génie mécanique de l'Université Sciences et Technologie HOUARI BOUMEDIANE (USTHB).
- ❖ L'analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée au sein du centre de recherche d'analyse physico-chimique (CRAPC).
- ❖ Les tests d'activité antimicrobienne a été réalisé au niveau des laboratoires de SAIDAL -Filiale ANTIBIOTICAL- de Médéa.

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

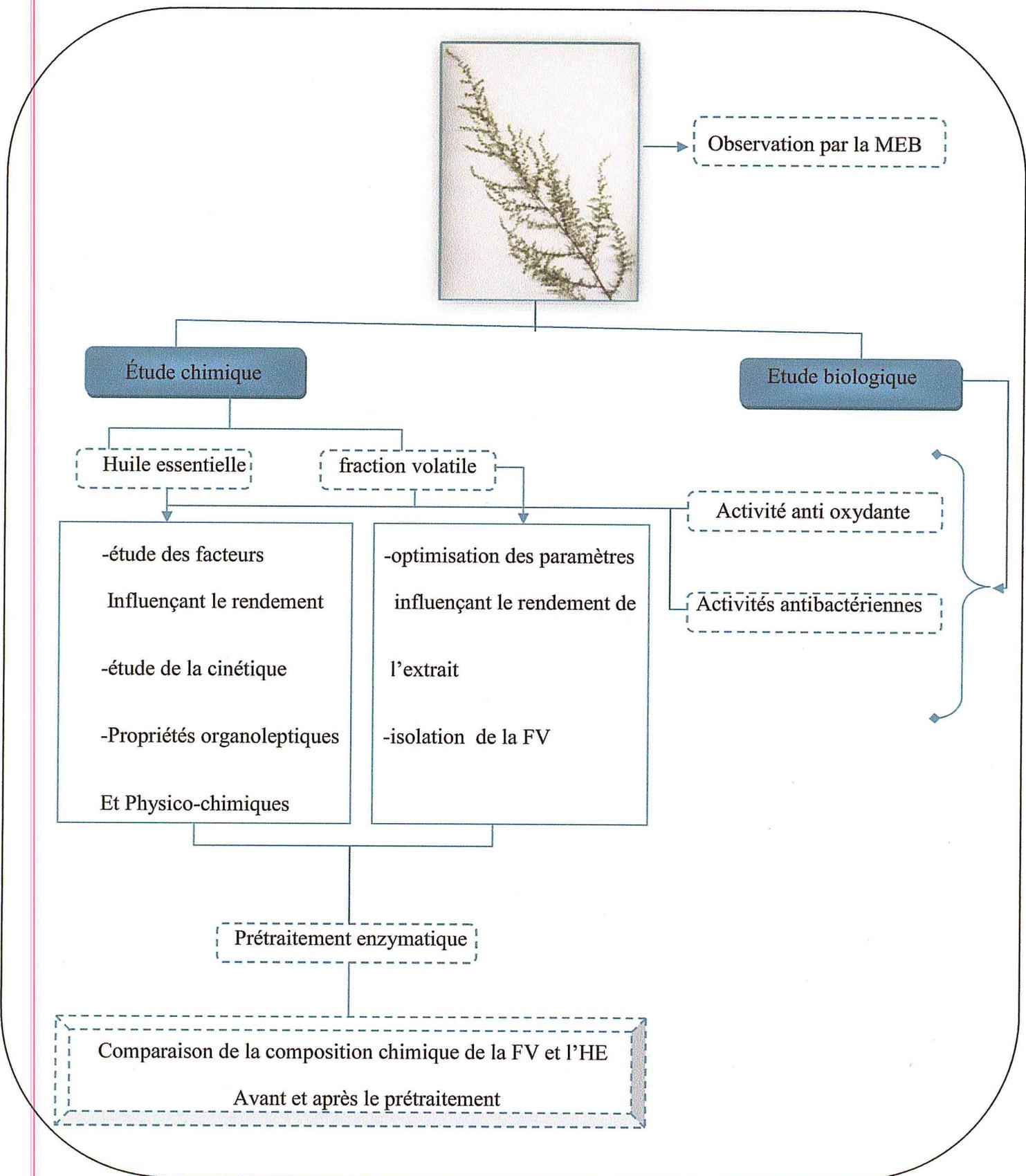
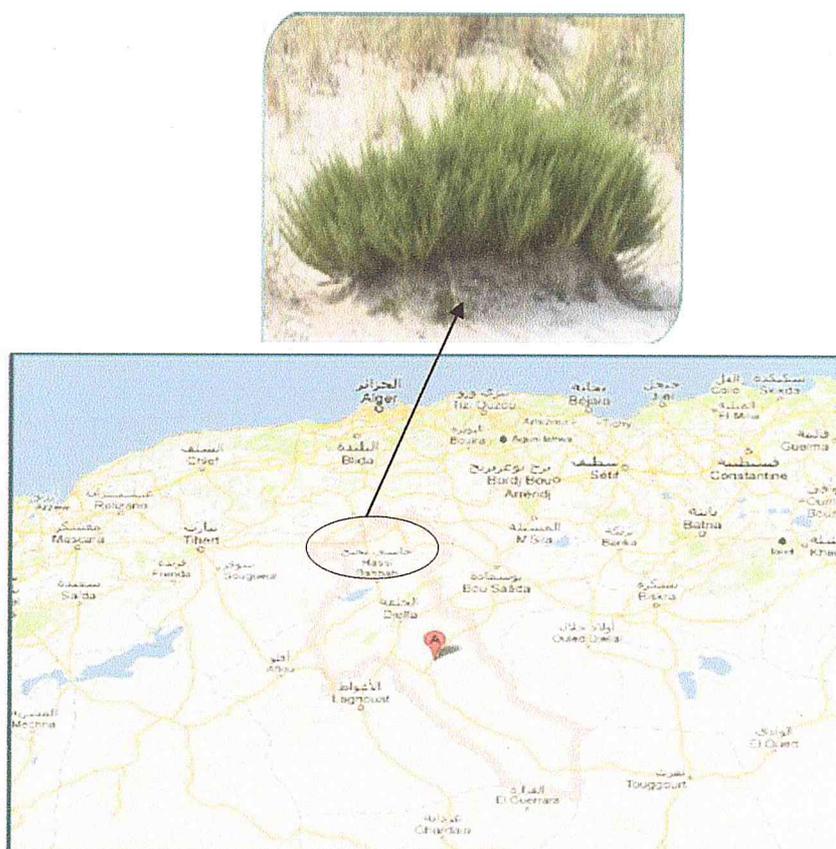


Figure 5 : Le schéma directeur des différentes étapes de notre étude

## II.1. Matière végétale

### II.1.1. Récolte, traitement et conservation

L'armoise champêtre (*Artemisia campestris* .L) utilisée a été récoltée en février 2013. La plante provient de la région de HASSI BAHBAH de la wilaya de Djelfa située à 250 km au sud d'Alger. Elle possède un climat continental, humide, froid en hiver et sec et chaud en été.



**Figure 6 :** Situation géographique de la région de récolte.

Les parties aériennes ont été séchées à température ambiante, à l'abri de la lumière et dans des endroits bien aérés (pour éviter les moisissures) et conservées dans des sacs.

### II.1.2. Identification botanique

L'identification et la systématique de la plante ont été confirmées au niveau du laboratoire de botanique du département d'Agronomie de l'Université Saad Dahlab et au niveau du laboratoire botanique du jardin d'essais d'El Hamma(Alger)



**Figure 7:** planche d'*Artemisia campestris*.L

## **II.2. Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau**

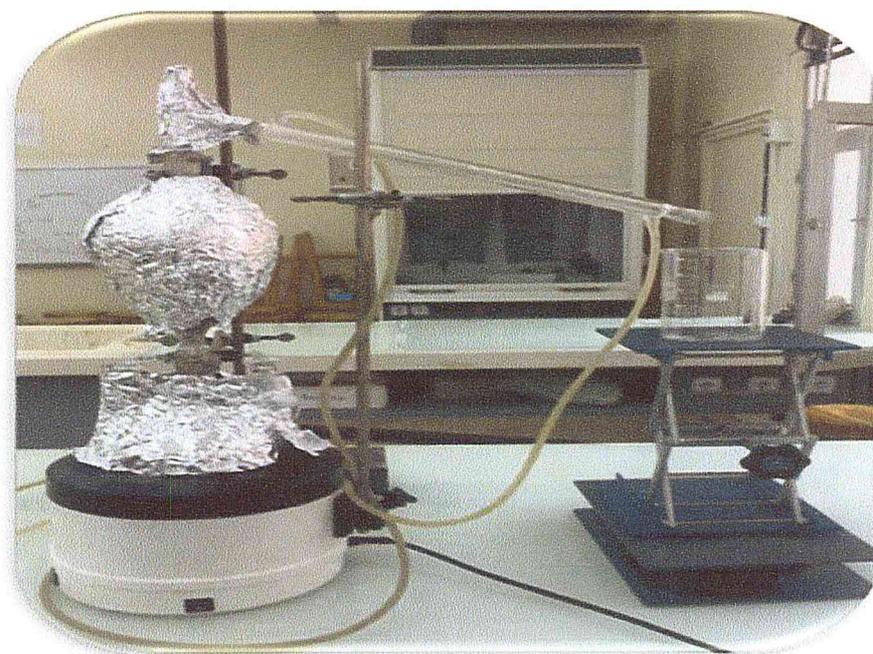
Le procédé d'extraction « entraînement à la vapeur » est l'une des méthodes officielles, ancienne et très répandue, pour l'extraction des huiles essentielles. Cette technique consiste à récupérer l'huile essentielle des végétaux en faisant passer à travers ces derniers un courant de vapeur d'eau, qui entraîne l'huile essentielle [42]. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau+ huile ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique contenant l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [43].

L'extraction de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* L. a été réalisée à l'échelle laboratoire en utilisant le procédé d'entraînement à la vapeur d'eau où nous avons étudié l'influence de certains paramètres sur le rendement en huile essentielle :

- ✓ Les parties utilisées de la plante (Partie aérienne, feuille et tige).
- ✓ Le temps d'extraction,
- ✓ La masse de la matière végétale.

### II.2.1. Protocole expérimental d'extraction de l'huile essentielle

On introduit de l'eau dans le ballon de capacité de 2 L au 2/3 qu'on porte à ébullition (figure 8) La matière végétale, préalablement pesée, est introduite dans l'ampoule à décanter. La vapeur originaire de l'ébullition de l'eau dans le ballon, traverse la matière végétale, entraînant ainsi l'huile essentielle. Les vapeurs sont condensées dans le réfrigérant pour obtenir un distillat qui est un liquide légèrement trouble où surnage l'huile essentielle récupérée dans un récipient à différents intervalles de temps pendant toute la durée de l'extraction. Cette opération dure 4 heures.



**Figure 8 :** montage entraînement à la vapeur d'eau

Après la récupération de l'hydrolat une extraction liquide- liquide est effectuée en ajoutant de l'éther diéthylique, on obtient alors deux phases : une phase aqueuse et une phase organique contenant l'huile essentielle. Cette opération est répétée deux fois afin de récupérer le maximum de l'huile essentielle. On récupère la phase étherée qui est placée préalablement sur un desséchant de type sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) afin d'éliminer toute trace éventuelle d'eau. L'huile essentielle est récupérée après l'évaporation de l'éther diéthylique dans un évaporateur rotatif. L'huile essentielle récupérée et 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.

### II.2.2. Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle de l'*Artemisia campestris* est calculé en rapport de masse : masse de l'huile essentielle sur la masse de la matière végétale, il est exprimé en pourcentage % et calculé par la formule suivante :

$$\eta(\%) = \frac{M(HE)}{M(MV)} \times 100$$

Où:

$\eta(\%)$  : Rendement en huile essentielle (%)

M(HE) : Masse de l'huile essentielle (g)

M(MV) : Masse de la matière végétale utilisée (g)

### II.2.3. Propriétés physico-chimiques et organoleptiques

Nous avons déterminé les propriétés organoleptiques et les propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle suivant la norme A.F.N.O.R. [44]. Les modes opératoires sont données en annexe.

### II.3. Extraction par solvant

L'extraction par solvant organique a été réalisée à l'échelle laboratoire. Cependant nous nous sommes orientés vers la maîtrise et l'optimisation des paramètres opératoires qui sont supposés influencer le rendement de l'extrait : Température, nombre d'extraction, temps d'extraction et le ratio liquide-solide.

En revanche, une approche des conditions optimales sera étudiée en faisant appel à la méthode d'optimisation par planification des expériences. Il s'agit d'évaluer l'influence des paramètres opératoires sur le rendement par l'intermédiaire du plan de Box-Behnken (BBD).

L'optimisation, et la définition des conditions opératoires qui en découlent constituent une partie très importante de la mise en œuvre d'un procédé. Une optimisation consiste à trouver les conditions expérimentales correspondantes à un optimum de la réponse étudiée. Elle doit permettre d'affirmer, avec un risque d'erreur raisonnable, qu'il n'existe pas d'autres conditions conduisant à une meilleure valeur de la réponse dans le domaine exploré [45].

### **II.3. 1. Protocole expérimental pour l'extraction par solvant**

Des extractions par les différents solvants (hexane, éther de pétrole, acétate d'éthyle et éthanol) a l'aide d'un montage à reflux (figure 9) ont été effectuées. Pour chaque extraction, des feuilles sèches et broyées sont mises dans un ballon de 500 ml en lui ajoutant 150 ml de solvant, le tout est porté sur un bain marie sous une agitation magnétique pendant une durée de 2h. L'opération est répétée 3 fois. Après l'extraction, les mélanges sont filtrés sous vide et les filtrats sont évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Des oléorésines obtenues ont été pesées pour calculer le rendement.



**Figure 9 : montage à reflux**

### **II.3. 2. Effet des différents paramètres d'extraction sur le rendement de l'extrait**

Une étude préliminaire composée de plusieurs expériences a été conduite et nous a permis de déterminer le domaine de variation des paramètres opératoires qui affectent le rendement. Il s'agit du temps d'extraction, le rapport liquide/solide et le nombre d'extraction. Afin de déterminer les conditions opératoires optimales d'extraction, nous avons procédé à l'optimisation de ces trois paramètres. A cet effet nous avons fait appel à la méthode par planification des expériences.

### **II.3.3. Optimisation des conditions expérimentales par la méthodologie des plans d'expériences**

Selon la définition donnée par Fisher, les plans d'expériences constituent « un essai technologique d'utilisation maximale de données ». L'efficacité d'un plan d'expériences en termes d'informations acquises et de fiabilité de ces informations est supérieure à celle de toute autre séquence d'essais non structurée de même volume. L'une des différences majeures entre les méthodes classiques de réalisation d'essais et la méthode des plans d'expériences réside dans le fait que dans la première, la recherche de l'effet des différents facteurs se fait de manière séquentielle et souvent non planifiée- en changeant la valeur ou le niveau, d'un seul facteur à la fois, d'un essai à un autre- alors que dans la seconde méthode, plusieurs facteurs à la fois changent de niveau. L'interprétation ne se fait plus résultat d'essai par résultat d'essai, mais à partir de l'ensemble des résultats [46]. La méthode des plans d'expériences permet de tirer d'un nombre d'essais donné un maximum d'informations crédibles concernant l'influence des facteurs. Elle permet l'étude des interactions entre facteurs, elle offre la possibilité de quantifier et de hiérarchiser les effets d'un grand nombre de facteurs de système étudié, et cela avec un nombre d'essais relativement faible, c'est-à-dire dans le minimum de temps et de coûts.

La valeur donnée à un facteur pour réaliser un essai est appelée niveau. Lorsqu'on étudie l'influence d'un facteur, en général, on limite ses variations entre deux bornes :

- La borne inférieure est le niveau bas, noté par -1
- La borne supérieure est le niveau haut, noté par +1

Lorsque l'on attribue la valeur -1 au niveau bas d'un facteur et la valeur +1 au niveau haut, on fait introduire des nouvelles variables que l'on appelle **variables centrées réduites (v.c.r.)** : centrées pour indiquer le changement d'origine et réduites pour signaler la nouvelle unité.

Le passage des variables d'origine A aux variables centrées réduites x, et inversement est donné par la formule suivante :  $x = (A - A_0) / \text{pas}$

$A_0$  est la valeur centrale en unités courantes ;

L'intérêt des v.c.r. est de pouvoir présenter les plans d'expériences de la même manière quels que soient les domaines d'étude retenus et quels que soient les facteurs. La théorie des plans d'expériences présente ainsi une grande généralité.

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur, ou tout simplement, le domaine du facteur.

La réunion des domaines de chaque facteur définit le « **domaine d'étude** » ; ce domaine d'étude est la partie de l'espace expérimentale retenue par l'expérimentateur pour faire ses essais [47].

#### **II.3.4. Présentation du plan de Box-Behnken (BBD)**

Le plan d'expériences est un plan de Box et Behnken utilisé pour la modélisation des surfaces de réponse, orienté vers l'optimisation de(s) réponse(s). Il permet de décrire l'évolution de la réponse pour un nombre limité de facteurs. Les facteurs doivent être tous quantitatifs et continus et le comportement de la réponse sera représenté par une surface de réponse. Le modèle peut permettre de localiser un extremum pour une réponse. Cette méthodologie de surface de réponse a déjà été utilisée avec succès pour l'étude et l'optimisation de l'extraction des huiles essentielles [48].

Le plan Box et Behnken a été proposé en 1960 [49]. Ces plans qui permettent d'établir directement des modèles du second degré. Tous les facteurs ont trois niveaux : -1, 0 et +1. Nous introduisons ainsi trois niveaux par facteurs, le nombre total d'essais devant être menés, N, va dépendre du nombre de facteurs K étudiés et du nombre de répétitions au centre du domaine,  $C_0$ .

Le nombre total d'expériences est donnée par l'expression suivante :  $N = 2k(k-1) + C_0$  [48].

Au niveau du plan expérimental et sur la base des résultats expérimentaux à facteur unique, trois paramètres ont été confirmés comme les principaux facteurs d'influence. Un BBD de trois facteurs et chaque facteur à trois niveaux a été effectué pour concevoir l'expérience optimisée.

Le tableau présente la matrice des essais du plan d'expériences de Box-Benhken ; 12 essais factoriels, 5 répétitions du point central ; soit au total 17 expériences à réaliser avec le procédé d'extraction par solvant.

**Tableau 4 : Plan d'expériences de Box-Benhken à 3 facteurs**

N°	Temps d'extraction	Nombre d'extraction	Rapport liquide/solide
1	-1	-1	0
2	-1	0	-1
3	-1	0	1
4	-1	1	0
5	1	-1	0
6	1	0	-1
7	1	0	1
8	1	1	0
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	1	-1
17	0	1	1

#### II.3.4.1. Choix du domaine d'étude

Le domaine d'étude de chaque facteur a été déterminé sur la base des expériences préliminaires. Les niveaux hauts et bas de chaque facteur sont définis comme l'indique le tableau suivant.

**Tableau 5 :** Domaine d'étude des paramètres opératoires par le plan Box-Benhken (en coordonnées réelles et en coordonnées centrés réduites)

Niveau	Temps d'extraction (H) X1	Nombre d'extraction X2	Rapport liquide/solide X3
-1	2	2	5
0	2,5	3	5,75
+1	3	4	6,5

#### II.3.4.2. Choix de (s) réponse(s)

- Pour chaque essai réalisé dans le plan d'expériences, on enregistre le rendement de l'extrait. C'est un paramètre quantitatif, Il est défini par la relation suivante:

$$R(\%) = \frac{\text{masse de l'extrait}(g)}{\text{masse de la matière végétale}} \times 100$$

#### II.3.5. Analyse statistique

L'exploitation des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel STATGRAPHICS Plus. Une série et une présentation de tests statistiques pourra juger la qualité du modèle.

Dans le cas de notre étude, on s'est intéressé à la relation qui relie la réponse (rendement) en fonction des paramètres étudiés lors de l'expérimentation (temps d'extraction, nombre d'extraction et le rapport liquide /solide) et variant dans le domaine d'étude choisi avec pour but final, de modéliser mathématiquement les réponses étudiées et de les optimiser. Ainsi, nous avons fait appel aux plans pour surfaces de réponse. Ces plans utilisent des modèles polynomiaux du second degré sous la forme :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + e$$

Où :

- Y: représente la réponse ou critère d'optimisation étudiée.
- $\beta_0$  : représente la moyenne des réponses obtenues.
- $\beta_i$  et  $\beta_{ij}$  sont des constantes représentant les coefficients de régression du modèle mathématique adopté ( $i, j= 1, 2, 3$ ).
- $X_i$  illustre les variables opératoires impliquées dans le modèle mathématique,  $X_i$  représente le niveau attribué au facteur  $i$  ( $i=1, 2, 3$ ) par l'expérimentateur afin de réaliser un essai.

Ce plan de Box-Behnken à trois variables et à trois niveaux à été adopté se prête bien au déroulement séquentiel d'une étude. Il permet d'évaluer les effets quadratiques et de tracer les surfaces de réponses en fonction des paramètres opératoires.

Le logiciel statistique concédera la réalisation de différentes opérations fondées sur l'analyse de la variance permettant de proposer un modèle polynomial comme présenté ci-dessus. Cette analyse de la variance concédera la détermination des divers coefficients de régression du modèle mathématique et permettra d'évaluer si une variable quantitative est significativement influente ou non.

Pour chacun des paramètres, la significativité des effets linéaires, quadratiques et des interactions intervenant entre les variables est ainsi testée puis représentée sur un diagramme de Pareto. Ces tests permettront de juger de la pertinence des variables et de modéliser au final la réponse étudiée sous la forme d'un modèle polynomial du 2nd degré [50,51]. L'adéquation du modèle par rapport aux mesures expérimentales pourra être exprimée à l'aide d'un coefficient de détermination  $R^2$  (le modèle sera d'autant plus adapté que la valeur de  $R^2$  sera proche de 1). Enfin, le modèle mathématique pourra être représenté graphiquement à l'aide de surfaces de réponses permettant de visualiser l'évolution de la variable réponse étudiée, ainsi que les zones où elle est maximale, en fonction des effets des facteurs.

#### **II.4. Isolation de l'huile essentielle à partir de l'extrait du solvant par entraînement à la vapeur d'eau (SE-SD)**

Dans cette partie nous avons utilisé une combinaison de deux méthodes : l'extraction par solvant et entraînement à la vapeur (SE-SD). Cette technologie de combinaison a été déjà utilisée dans l'extraction de l'huile essentielle de *Cuminum cyminum* et l'huile essentielle de *Tobacco* [52, 53]. Cette technique repose sur l'isolation de l'huile essentielle à partir de l'extrait par solvant par la technique entraînement à la vapeur d'eau. Cette technologie de combinaison a montré l'efficacité en termes de rendement et la sélectivité en termes de qualité de l'huile essentielle. De plus, elle offre d'autre avantage : une technologie simple.

#### **II.5. Prétraitement enzymatique**

Au cours des 50 dernières années, des méthodes non-conventionnelles sont utilisées afin d'améliorer le rendement sans modification des caractéristiques qualitatives des molécules bioactives. Récemment une méthode alternative a été développée principalement pour améliorer le rendement global et la sélectivité des composants bioactifs à partir de la matière végétale, c'est la méthode du prétraitement enzymatique.

Les enzymes ont été utilisées notamment pour le traitement de la matière végétale préalablement à des procédés classiques d'extraction. [54]. Ce sont des catalyseurs idéals pour aider à l'extraction, la modification ou la synthèse de complexes composés bioactifs d'origine naturelle. Diverses enzymes telles que des cellulases, pectinases et hemicellulase sont souvent nécessaires pour perturber et dégrader les parois cellulaires et les membranes, permettant ainsi une meilleure libération des composés bioactifs [55,56]. La réaction des enzymes (pectinase, cellulase) est souvent considérée comme une alternative à la destruction thermo-mécanique des parois cellulaires.

Des études récentes sur les effets du prétraitement enzymatique de thym et de romarin sur le rendement, la composition chimique et les activités antimicrobiennes [57] ont été réalisées pour l'extraction des huiles essentielles. Les résultats ont montré que le prétraitement enzymatique pourrait être utile pour améliorer le rendement et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et peuvent avoir un bon potentiel pour une utilisation dans les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Une étude récente [58] a été réalisée sur le prétraitement enzymatique pour l'extraction par n-hexane de l'huile à partir des graines de *Silybum marianum*. Les résultats ont montré que le prétraitement enzymatique n'avait pas affecté les compositions en acides gras mais pourrait causer la rupture de la structure des semences de *S. marianum* et accélérer une libération supplémentaire de l'huile ce qui augmente le rendement en huile de 10,46% par rapport à l'extraction sans prétraitement enzymatique pour une durée de 1,5H

D'autre étude [59] a montré que l'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau et par hydro-distillation de grains de céleri soumis à un prétraitement enzymatique avec des enzymes cellulolytiques, seules ou en mélange a donné un meilleur rendement et une légère différence dans les propriétés physico-chimiques et la composition chimique de l'huile essentielle

### **II.5.1. Choix de l'enzyme**

L'enzyme utilisé et qui nous a été disponible pour ce prétraitement est l'Hémicellulase. Il est utilisé comme enzyme de prétraitement des feuilles d'*Artemisia campestris*.L

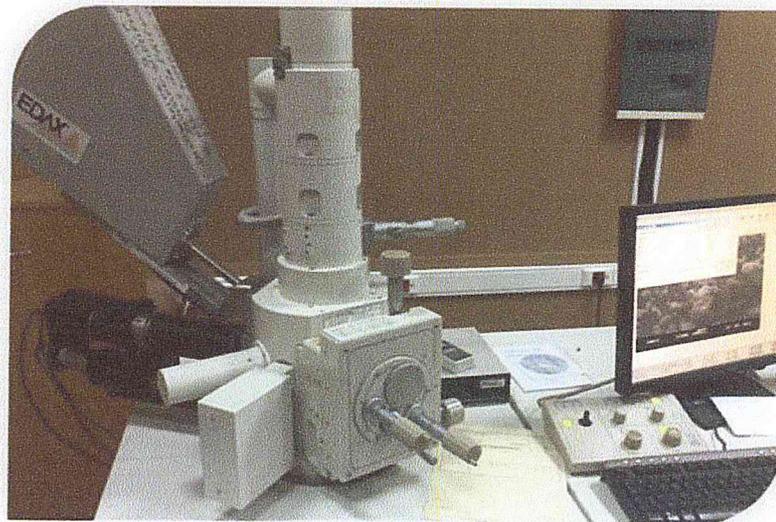
### **II.5.2. Mode opératoire [57,60]**

- On place 100g de feuilles séchées dans un bécher,
- On prépare une suspension enzymatique selon les proportions suivantes : 10mg d'hémicellulase, on lui ajoute 500 ml d'eau distillée, cette suspension est versée dans le bécher tout en agitant le mélange, ensuite on rajoute une à deux gouttes d'acide acétique pour maintenir le pH entre 4,5 et 5
- La préparation ainsi obtenue est placée dans l'étuve est portée à une température de 45C° pendant une heure qui par la suite sera sujette à un entraînement à la vapeur pour l'extraction de l'huile essentielle.

### **II.6. Analyse microscopique**

Dans le but d'une meilleure compréhension des phénomènes d'extraction et l'influence de l'enzyme sur l'extraction et afin d'observer le comportement des cellules sécrétrices de la feuille d'*Artemisia campestris*.L. Les échantillons ont été prélevés avec précaution, et préalablement collés sur une bande de ruban adhésif double face, puis métallisés avec une couche de carbone. Plusieurs photographies par microscope électronique à balayage ont été

réalisées sur un microscope XL 30 (EDAX) (figure) sous les conditions opératoires suivantes: sous vide d'air ; tension d'accélération 15 KV ; taille du spot : 5 ; distance de travail 15 mm. Cette étude a permis d'observer l'état des cellules avant et après l'extraction par les différentes techniques.



**Figure 10** : microscope électronique à balayage

#### **II.6. Analyse de la composition chimique par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS).**

L'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur avec et sans prétraitement ainsi la fraction volatile isolé à partir de l'extrait d'*Artemisia campestris*.L ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, en utilisant un chromatographe Hewlet packard série Agilent 6890 N, couplée à un spectromètre de masse Hewlet packard, série Agilent 5973 dans les conditions opératoires suivantes :

##### **Injecteur**

Température : 250°C

Mode d'injection : Split 20 :1

Volume injecté : 0.2  $\mu$ l

## Colonne

Type : hp-5ms

Dimensions : long 30m \* D int 250  $\mu\text{m}$  \* épaisseur film 0,25  $\mu\text{m}$

Phase stationnaire : diphényle (5%) – Diméthylarylènesiloxane

Température du four : 60°C pendant 8 min, 2°C/min jusqu'à 280°C, 10 min isoth

Gaz vecteur : Hélium pur 99,9998 %

Débit GV : 0.5 ml/min

## Détecteur de masse

Température de l'interface : 280 °c

Type d'ionisation : électronique

Intensité du filament : 70 év

Type de l'analyseur de masse : Quadripôle

Température du quadripôle : 150 °c

Température de la source : 230 °c

Vide : 40 torr

L'identification des composés a été réalisée en comparant les temps et les indices de rétention (indices de Kovats) déterminés avec une série de n- alcanes de C5-C14 et avec des composés standards injectés dans les mêmes conditions ou avec les résultats publiés dans la littérature. L'identification des composés est confirmée par comparaison de leur spectre de masse ions-fragments caractéristiques obtenus expérimentalement à ceux cités dans la littérature [61].

## II.8. Activités biologiques

### II.8.1 Etude de l'activité antimicrobienne d'HE d'*artemisia campestris.L*

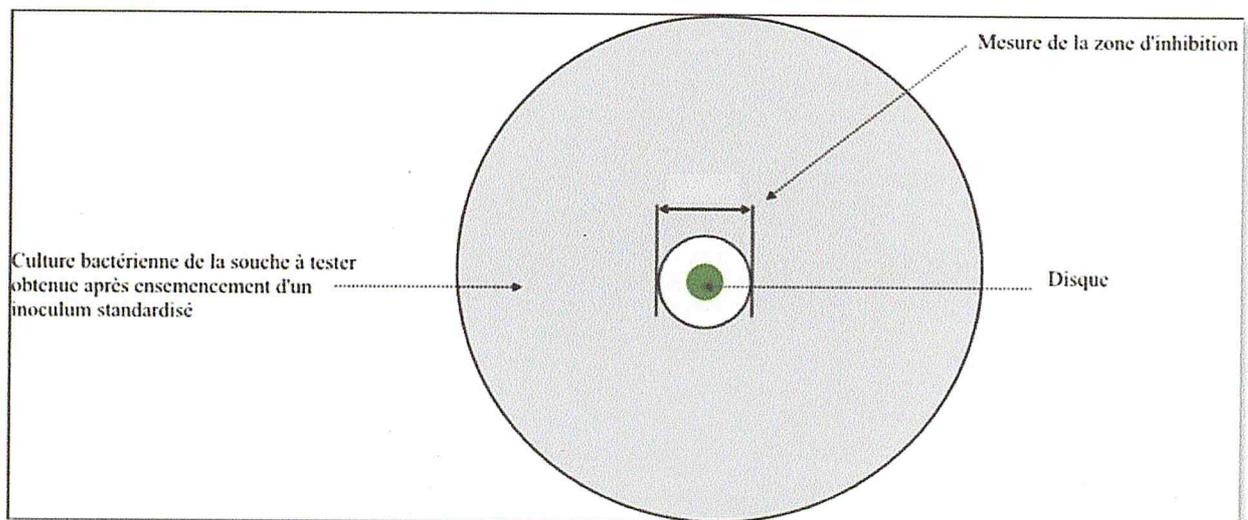
Dans cette partie nous avons procédé à une méthode qualitative en vue de mettre en évidence le pouvoir antiseptique de l'huile essentielle obtenue par les différentes méthodes d'extraction. Cette méthode est tirée du principe du titrage des antibiotiques « pharmacopées européenne 2002 », elle a été utilisée par plusieurs auteurs [62, 63, 63, 65]

### II.8.1.1. Technique en milieu solide : Méthode des aromatoigrammes

L'aromatogramme est basé sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme [66][67]. Elle a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des produits à tester et de s'appliquer à un grand nombre d'espèces bactériennes. [68][69]

Dans cette méthode, nous utilisons des disques de 9 mm de diamètre, imprégnés de 20  $\mu$ l d'HE. Nous déposons ces disques à la surface d'un milieu gélosé ensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne, L'incubation est faite dans une étuve à 35°C pendant 24h. L'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone circulaire claire indemne de colonies, appelée « zone d'inhibition » autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre. (figure 11) [70].

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'huile essentielle. Plus il est petit, plus la bactérie est résistante



**Figure 11 :** Aromatogramme sur boîte de pétri à diffusion linéaire à partir d'un disque imprégné d'huile essentielle

### II.8.1.2. Microorganismes utilisés

Les souches utilisées dans notre étude sont référencées ATCC (American Type Culture Collection) (voire tableau 6) et ont été choisis pour leurs contamination élevées sur les denrées alimentaires et leur pathogénicité.

Les testes sont réalisés sur trois bactéries (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, **streptocoque**) provenant du laboratoire de microbiologie de laboratoires de SAIDAL - Filiale ANTIBIOTICAL- de Médéa ces souches ont été reçues dans des tubes stériles contenant 10ml de gélose de conservation puis conservées à une température de 4°C.

**Tableau 6** : liste des souches microbiennes testées

Nom de la souche	Gram	Code
<i>Escherichia coli</i>	-	ATCC 10536
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	ATCC 6538
streptocoque	+	-

### II.8.1.3. Milieux de culture

Nous avons utilisé Muller Hinton comme milieux de culture pour les bactéries.

### II.8.1.4. Protocole expérimental

#### ➤ Préparation des milieux de culture

La gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boites de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2mm répartie uniformément dans les boites. Ces dernières doivent être séchées 33 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

#### ➤ Préparation de l'inoculum

A partir des cultures jeunes. On prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 10 ml d'eau physiologique stérile, on agite au vortex pendant quelques secondes. La standarisation de la suspension correspond à une concentration optimale de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm

➤ **Ensemencement:** des boites de pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la solution bactérienne, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries.

### ➤ Dépôts des disques

A l'aide d'une pince stérile, les disques stériles de papier de Wathman 9 mm du diamètre, contenant l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*.L sont déposés sur la surface gélosé. Après diffusion de l'HE dans la gélose pendant 30min à température ambiante, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

➤ **Lecture:** la lecture s'effectue après 24h d'incubation par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HE [71].

- Non sensible(-) ou résistante : diamètre < 8mm
- Sensible(+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm
- Extrememnt sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

## II.8.2. Activités antioxydantes

### II.8.2.1. Méthode de la réduction du fer FRAP

L'activité réductrice du fer de nos échantillons est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu [72], basée sur la réduction du  $Fe^{3+}$  présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en  $Fe^{2+}$

- Un millilitre de l'huile essentielle à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%.
- L'ensemble est incubé au bain marie à 50°C pendant 20 minutes ensuite 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction ;
- Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes ;
- 2,5ml du surnageant sont mélangés à 2,5ml d'eau distillée et 0,5ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparé à 0,1%.

- La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'huile essentielle par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre).
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

**Remarque :** Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir antioxydant.[73].

---

**CHAPITRE: III**

**RESULTATS ET DISCUSSION**

---

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

### III.1 Extraction de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*. L par entraînement à la vapeur d'eau

#### III.1.2. Les paramètres influençant le rendement en HE

L'étude de certains paramètres pouvant influencer le rendement en huile essentielle a été réalisée .

##### III.1.2.1. Influence de La partie utilisée de la plante

En premier temps, et dans le but de connaître si les différentes parties de la plante renferment de l'huile essentielle, nous avons effectué des essais préliminaires dans les mêmes conditions (la même masse et la même durée d'extraction) sur la plante entière (partie aérienne), sur les feuilles et les tiges séparément pour déterminer la partie la plus riche en cette substance. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant.

**Tableau 6:** Le rendement en huile essentielle en fonction de la partie utilisée.

La partie utilisée	Partie aérienne	feuilles	Tiges
Le rendement en HE(%)	0,2	0,53	0,02

Les résultats donnés dans le tableau 6 montrent que les huiles essentielles se trouvent dans les deux parties de la plante : feuilles et tiges avec un rendement plus important dans les feuilles (0,53%) que dans les tiges (0,02%)

Comparativement aux résultats donnés par Akrouf [26] sur l'espèce *Artemisia campestris* L. Il a trouvé que les huiles essentielles de cette plante sont localisées principalement dans les feuilles et que les tiges n'en contiennent pas.

### III.1.2.2. Influence du temps d'extraction

Pour cette étude nous avons pris la masse de la matière végétale comme constante et le temps d'extraction pour variable alors nous avons effectué cinq manipulations. Les résultats sont mentionnés sur le tableau suivant :

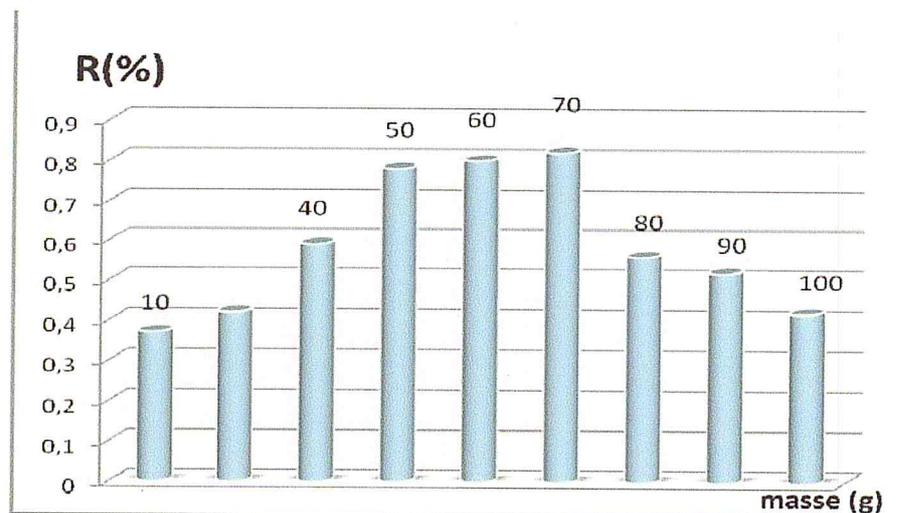
**Tableau 7 : variation du rendement en fonction du temps d'extraction**

Temps d'extraction (H)	R(%)
1	0,10
2	0,22
3	0,43
4	0,56
5	0,53

D'après ce tableau on remarque que le rendement augmente progressivement jusqu'à atteindre un taux de 0,56% au bout de 4h

### III.1.2.3. Influence de la masse végétale

Afin d'étudier l'influence de la masse végétale, nous avons effectué différents essais où le temps d'extraction pour chaque essai est considéré constant. Les résultats sont représentés par le graphe suivant :



**Figure 12 : influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle**

D'après les résultats, on constate que le rendement en HE varie en fonction de la masse de la matière végétale. Il atteint le maximum lorsque la masse est égale à 70g, au-delà il diminue. Ces variations du rendement sont probablement liées au degré de tassement de la matière, quand cette dernière est insuffisante ou en excès. 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.

### III.1.3. Evolution du rendement en HE selon la durée d'extraction (cinétique)

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 de la matière végétale (la partie utilisée : feuilles) par EV. Pour cette étude nous avons choisi les paramètres qui ont donné le rendement le plus élevé c'est à dire (70g de feuilles d'*Artemisia campestris*.L , et le temps d'extraction de 4h) la courbe ci dessous montre la cinétique d'entraînement a la vapeur de l'HE.

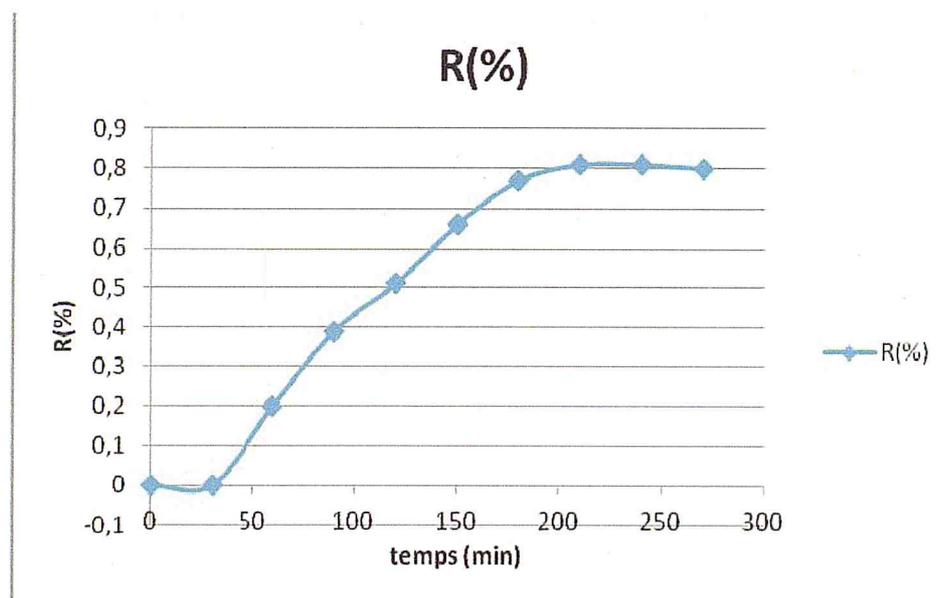


Figure 13: cinétique de l'extraction de l'HE par entraînement à la vapeur

L'étude de la cinétique d'extraction montre l'existence de trois étapes :

- L'étape 0 correspond au temps mort il est de l'ordre de 30 min, cette étape durant laquelle aucune extraction d'huile essentielle ne se produit
- La première étape rapide désigne par une ligne presque droite croissante, représentent une extraction plus ou moins rapide. Celle-ci correspondrait à l'extraction de l'HE superficielle (sites exogène).

La 3<sup>ème</sup> étape correspond à une ligne horizontale qui enregistra la fin d'extraction et au cours de cette étape la courbe tend vers un pallier qui correspond au rendement maximal possible de l'ordre de 0.82%. Cette valeur est supérieure à celle obtenue sur l'espèce de Boussaâda (0.66%) et celle provenant du la Turquie (0.7%) [8].

#### III.1.4. Caractérisation de l'huile essentielle de l'artemisia campestris L.

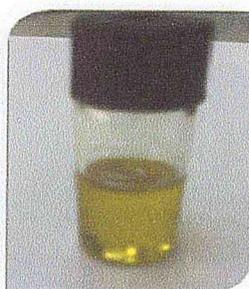
Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile essentielle.

##### III.1.4.1. Propriétés organoleptiques

L'huile essentielle des feuilles d'Artemisia campestris L obtenue par entraînement à la vapeur présente les caractères organoleptiques regroupés dans le tableau suivant.

**Tableau 8 :** Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle *d'Artemisia campestris.L*

<i>Aspect</i>	<i>Couleur</i>	<i>Odeur</i>
<i>Liquide</i>	<i>Jaunâtre</i>	Aromatique caractéristique de la plante



**Figure 14:** Huile essentielle de l'armoise champêtre

### III.1.4.2. Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle *d'Artemisia campestris L*

Les résultats des analyses physico-chimiques sont donnés par le tableau

**Tableau 9:** Propriétés physico-chimiques l'huile essentielle *d'Artemisia campestris.L*

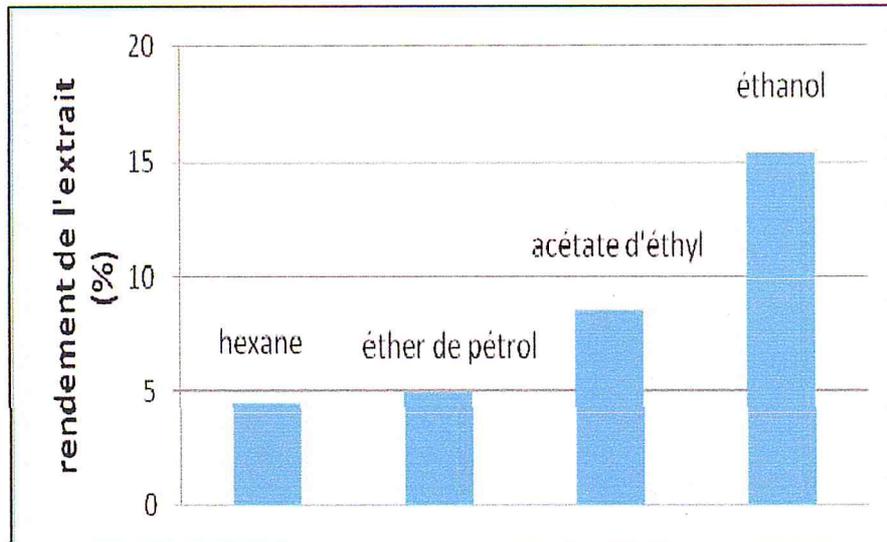
Densité	0.92
Indice de réfraction	1,55 à 29.7°C
Indice d'acide	1,79
Indice d'ester	20,65
Indice de saponification	22,44

- l'indice d'acide nous donne un aperçu sur la qualité de l'huile essentielle, en effet, il représente la concentration totale en acide gras libre. un IA inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acide libre) [74] . Donc plus l'indice d'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.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera primordial de déterminer le profil chromatographique de l'HE.

### III.2.Extraction par solvant

Dans le but de choisir le meilleur solvant d'extraction nous avons sélectionné quatre solvants à différentes polarités hexane, éther de pétrole, acétate d'éthyle et éthanol. La figure représente l'effet du solvant sur le rendement en extrait.

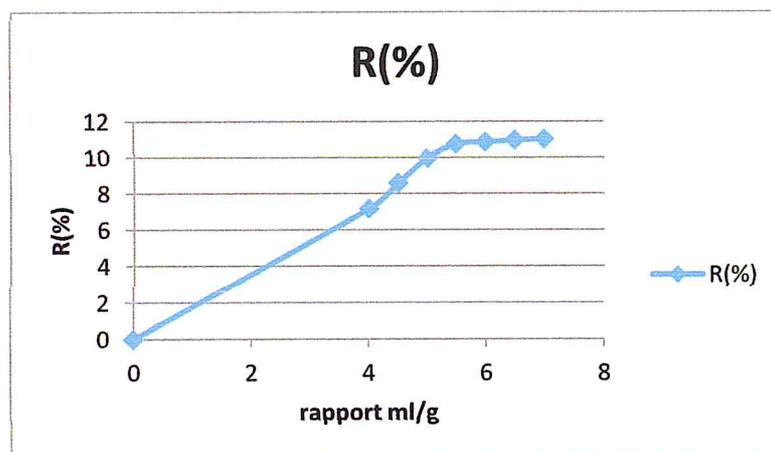


**Figure 15:** effet du solvant sur le rendement en extrait

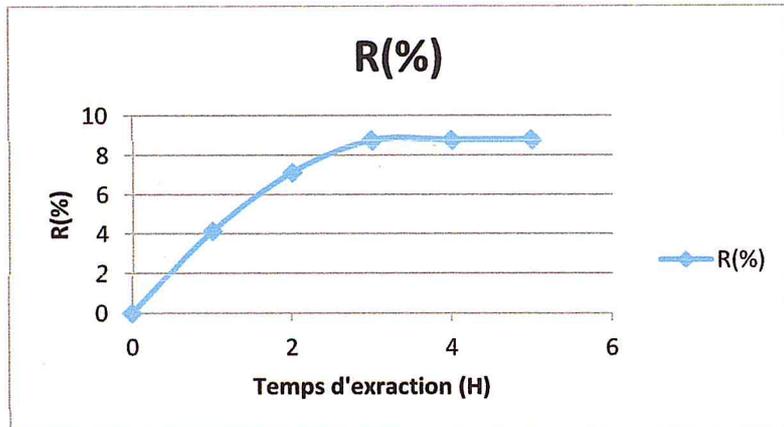
L'éthanol a été choisi comme le meilleur solvant d'extraction avec un rendement de l'ordre de 15,40 %.

### III.2.1. Effet des différents paramètres d'extraction sur le rendement en extrait

Dans cette partie nous avons étudié l'effet du temps d'extraction, nombre d'extraction et le rapport liquide/solide sur le rendement de l'extrait, les résultats sont représentés dans les graphes suivant.

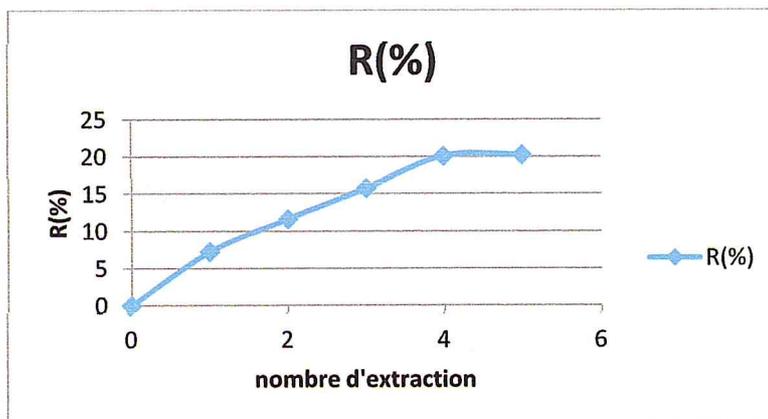


**Figure 16 :** l'effet du rapport ml/g sur le rendement de l'extrait



**Figure 17** : Effet du temps sur le R(%)

Le temps d'extraction a également eu une influence importante sur l'extraction. Comme on peut le voir dans la figure 17, il y avait une corrélation notable entre le temps d'extraction et le rendement d'extraction. Le rendement de l'extrait est passé de 4% à 8% lorsque le temps d'extraction augmente de 1 à 3 h.



**Figure 18** : Effet du nombre d'extraction sur le R(%)

L'observation de la figure 18 montre que le rendement est une fonction croissante avec le nombre d'extraction jusqu'à ce qu'il atteigne un équilibre au nombre égale à 4.

D'après les résultats obtenus nous avons déterminé le domaine de variation des paramètres opératoires expérimentalement et avons procédé à l'optimisation de ces trois paramètres par la méthodologie des plans d'expérience

### III.2.2. Optimisation des conditions expérimentales par la méthodologie des plans d'expériences

#### III.2.2.1. Expérimentation

Le tableau présente les différents niveaux des trois facteurs en coordonnées centrées réduites et les rendements en extrait de l'*Artemisia campestris* obtenus comme réponse pour chacune des vingt expériences du plan BBD.

**Tableau 10** : expériences réalisées dans le plan expérimental et rendement obtenus

N°	Temps d'extraction	Nombre d'extraction	Rapport liquide/solide	R(%)
1	-1	-1	0	15,10
2	-1	0	-1	19,59
3	-1	0	1	25,25
4	-1	1	0	22,38
5	1	-1	0	14,16
6	1	0	-1	20,81
7	1	0	1	15,21
8	1	1	0	20,35
9	0	-1	-1	15,30
10	0	-1	1	12,33
11	0	0	0	13,75
12	0	0	0	14,30
13	0	0	0	14,45
14	0	0	0	13,96
15	0	0	0	13,65
16	0	1	-1	20,22
17	0	1	1	20,35

L'examen du tableau montre que dans le domaine d'étude des paramètres opératoires choisis, les rendements en extrait varient de 12,33 à 25,2%.

## II.2.2.2. Etude de l'influence des paramètres opératoires sur le rendement

L'étude de l'influence des paramètres sélectionnés sur le rendement permet de déterminer la combinaison des facteurs qui permettraient d'améliorer le rendement. Les résultats du plan BBD ont été analysés par le logiciel statistique statgraphics. Cette analyse a pour but de déterminer les effets simples de chaque paramètre, leurs effets quadratiques, les interactions entre eux ainsi que l'élaboration du modèle empirique décrivant le comportement du système étudié.

### II.2.2.2.1. Analyse de la variance

Une analyse de la variance a été réalisée sur les résultats obtenus (Tableau 11). Cette analyse permet de tester la pertinence des variables impliquées dans le modèle étudié et de représenter graphiquement l'importance de chaque facteur sur la réponse étudiée, en l'occurrence le rendement en extrait.

L'analyse de la variance permet de tester et évaluer la signification statistique de chaque effet des paramètres étudiés, linéaires, quadratiques et interactions entre facteurs. Cette analyse permet aussi de déterminer si le modèle sélectionné est adéquat.

Les effets des paramètres sont estimés par le test de Fisher (F-ratio) ; où F représente le rapport des carrés moyens de chaque effet par rapport au carré moyen de l'erreur expérimentale.

$$F(\text{effet}) = (\text{carré moyen de l'effet}) / (\text{carré moyen des écarts expérimentaux})$$

A côté de la valeur du rapport F, le logiciel associe la valeur de probabilité P.

Les valeurs de P montrent qu'à un niveau de confiance de 95 %, les effets statistiquement significatifs sont ceux qui ont uniquement un  $P < 0.05$ . Ainsi, les effets inférieurs à 0.05 dans la colonne de P sont significatifs [75].

- Si  $\text{val-} P > 0.05$  : L'action sera déclarée comme non significative.
- Si  $\text{val-} P < 0.05$  : L'action sera déclarée comme significative.
- Si  $\text{val-} P < 0.01$  : L'action sera déclarée comme hautement significative.

## II.2.2.2. Analyse graphique des résultats

### a) Diagramme de Pareto

Le diagramme de Pareto présenté dans la figure est un diagramme à barres qui représente l'effet linéaire, quadratique et interaction entre facteurs. Dans ce diagramme, la longueur de la barre est proportionnelle à la valeur absolue des effets estimés avec un niveau de confiance de 95 %. Chaque effet qui traverse la ligne verticale avec un risque d'erreur de 5% est considéré significatif vis-à-vis de la réponse.

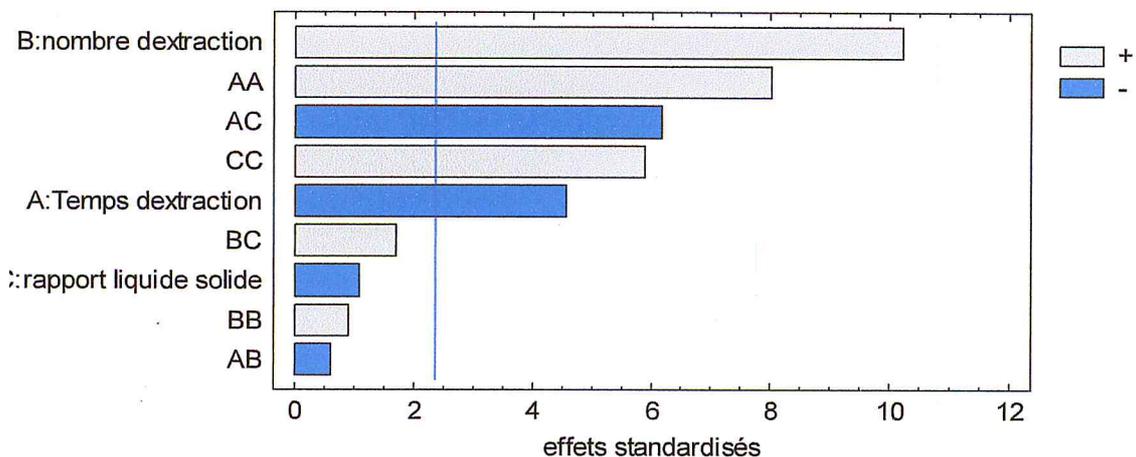


Figure 19 : diagramme des effets standardisés sur le rendement

Suite aux résultats obtenus de l'analyse de la variance et au diagramme des effets standardisés, on a pu rassembler les conclusions suivantes dans le domaine expérimental étudié :

- L'effet d'interaction du couple « temps d'extraction- rapport liquide /solide » est plus significatif sur le rendement.
- L'effet quadratique du « temps d'extraction » est plus significatif que l'effet quadratique du « nombre d'extraction » alors que l'effet quadratique du « nombre d'extraction » est très faible.

**Tableau11** : analyse de la variance du rendement en extrait

Source	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carrés moyens	Ratio- F	Valeur – P
A:Temps d'extraction	17,3755	1	17,3755	20,82	<b>0,0026</b>
B: nombre d'extraction	87,186	1	87,186	104,49	<b>0,0000</b>
C: rapport liquide /solide	0,96605	1	0,96605	1,16	0,3176
AA	53,6703	1	53,6703	64,32	<b>0,0001</b>
AB	0,297025	1	0,297025	0,36	0,5695
AC	31,6969	1	31,6969	37,99	<b>0,0005</b>
BB	0,691484	1	0,691484	0,83	0,3929
BC	2,4025	1	2,4025	2,88	0,1335
CC	28,9634	1	28,9634	34,71	<b>0,0006</b>
Erreur pur	5,84086	7	0,834408	-	-
Total	235,168	16	-	-	-

$$R^2 = 97,52\%$$

Les valeurs de P montrent qu'à un niveau de confiance de 95 %, les effets statistiquement significatifs sont ceux qui ont uniquement un  $P < 0.05$ . Ainsi, les effets inférieurs à 0.05 dans la colonne de P sont significatifs. Cela est confirmé par le digramme de Pareto dans la figure 19, lequel révèle cinq coefficients significatifs qui affectent (dans le domaine choisi), à savoir le temps d'extraction, le nombre d'extraction, l'interaction entre les facteurs (temps d'extraction, rapport liquide/solide) et l'effet quadratique des facteurs (temps d'extraction) et (rapport liquide/solide).

La valeur du coefficient de détermination  $R^2$  est 97,52%, cette valeur indique une meilleure relation entre l'expérimental et le modèle choisi. Il indique le degré d'ajustement du modèle  $Y=f(X)$  ; plus ce coefficient est proche de 100% plus le niveau de confiance vis-à-vis du modèle proposé est grand et le modèle sera de plus en plus satisfaisant (plus  $R^2$  est proche de 1, meilleur est l'ajustement).

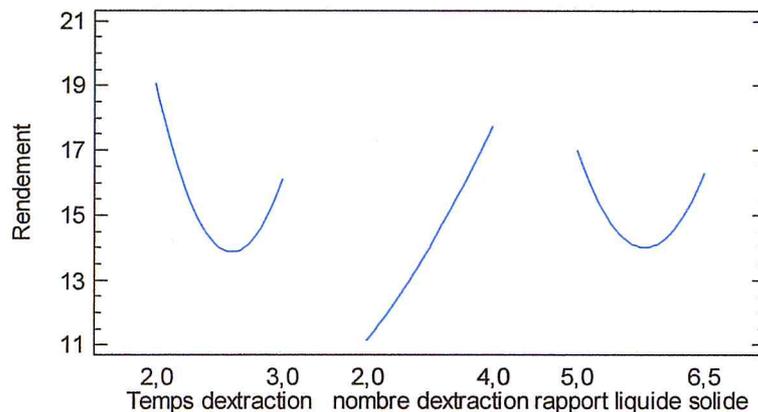


- L'effet simple de « nombre d'extraction » est la variable quantitative présentant l'influence la plus importante sur le rendement par rapport au « temps d'extraction » par contre celui de « rapport liquide/solide » est très faible.

Avec lequel il révèle cinq coefficients significatifs qui affectent dans le domaine choisi.

### b) Les effets simples

La figure illustre l'action des effets simples des paramètres sur le rendement en extrait (%). Les effets simples de chaque variable représenté permettent d'évaluer leur action lorsque le paramètre passe de son niveau bas à son niveau haut. Les deux autres paramètres étant fixés au centre de leur domaine expérimental (valeur centrée).



**Figure 20 :** effet simples des paramètres opératoires sur le rendement

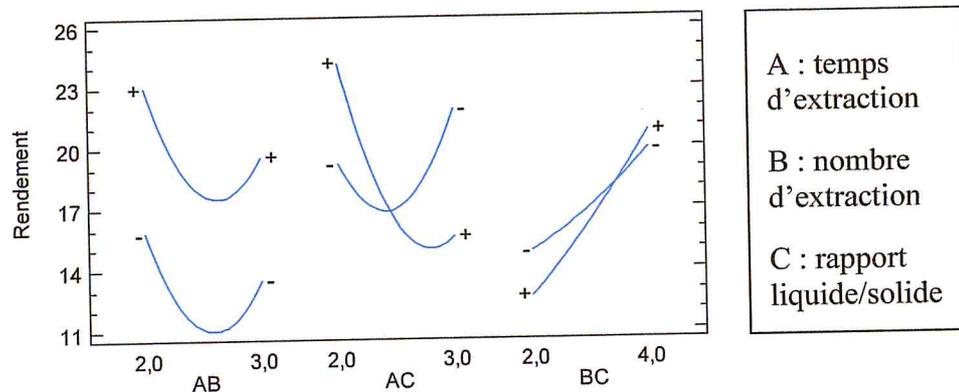
Selon cette figure :

- Le temps a une influence sur le rendement, il est maximal à  $T=120$  min ensuite il décroît de façon continue, il passe par un minimum dans l'intervalle [150, 160] puis il augmente légèrement pour un  $T=180$  min.
- Le rendement augmente de manière proportionnelle avec le nombre d'extraction avant de stabiliser, mettant ainsi en évidence un maximum lorsque le nombre est égale à 4.

- Concernant l'effet du rapport liquide/solide, le meilleur rendement est obtenu pour un rapport de 5 :1, il diminue pour un minimum 5,75 :1 puis il augmente pour un rapport 6,5 :1.

### c) L'effet d'interaction

Les effets d'interactions impliqués dans le modèle sont représentés sur la Figure suivante. Cette représentation permet de faire ressortir l'influence d'une variable, lorsqu'elle évolue de son niveau bas « -1 » à son niveau haut « +1 », sur une seconde variable (les signes « + » et « - » correspondent aux niveaux hauts et bas du second paramètre impliqué en abscisse) alors que le troisième paramètre est fixé à sa valeur centrale (niveau 0). On étudie ainsi les variations du rendement en fonction des interactions des paramètres impliqués. Graphiquement, les interactions sont définies comme significatives lorsqu'elles ne varient pas dans le même sens à leurs niveaux hauts et bas.



**Figure 21** : effets d'interaction des paramètres opératoires sur le rendement

L'examen de cette figure confirme la conclusion tirée lors de l'appréciation du diagramme Pareto. L'interaction entre le « temps d'extraction » et « nombre d'extraction » est non significatifs, l'effet d'interaction entre les variables « nombre d'extraction » et « rapport liquide/solide » est faible par contre en remarque que les deux courbes présentant les facteurs « temps d'extraction » et « rapport liquide/solide » se croisent et il ne varient pas dans le même sens à leurs deux niveaux haut et bas. Cet effet est jugé comme significatif .

### III.2.2.2.3 Détermination du modèle mathématique

L'extraction par solvant peut être représentée sous la forme d'une équation polynomiale du second degré dont les effets estimés de chaque coefficient sont représentés dans le tableau

**Tableau 12** : effets estimés de coefficients

Coefficients	Estimate
Constant	167,043
X <sub>1</sub> :Temps d'extraction	-29,554
X <sub>2</sub> :Nombre d'extraction	-3,709
X <sub>3</sub> :Rapport liquide/ solide	-38,417
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	14,281
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-0,545
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	-7,5066
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	0,405
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1,033
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	4,662

Les effets estimés nous permettent d'exprimer le rendement sous la forme d'une équation polynomiale du second degré relative au domaine expérimental défini et impliquant les trois facteurs étudiés.

Le modèle en variables codées s'écrit alors :

$$\text{Rendement} = 167,043 - 29,5542*X_1 - 3,70942*X_2 - 38,4173*X_3 + 14,281*X_1^2 - 0,545*X_1X_2 - 7,50667*X_1X_3 + 0,40525*X_2^2 + 1,03333*X_2X_3 + 4,66267*X_3^2$$

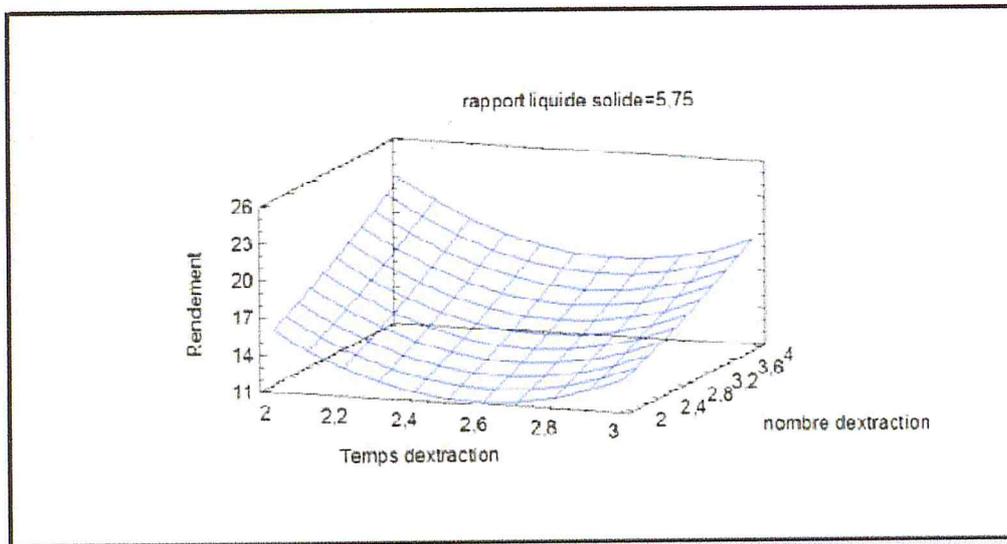
Où

- X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, sont respectivement les coefficients linéaires des variables quantitatives « temps d'extraction », « nombre d'extraction », « rapport liquide/solide ».
- X<sub>1</sub><sup>2</sup>, X<sub>2</sub><sup>2</sup>, X<sub>3</sub><sup>2</sup>, représentent les effets quadratiques des variables.
- X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>, X<sub>1</sub> X<sub>3</sub>, X<sub>2</sub> X<sub>3</sub>, représentent les interactions entre variables.

#### III.2.2.2.4. Définition des conditions optimales

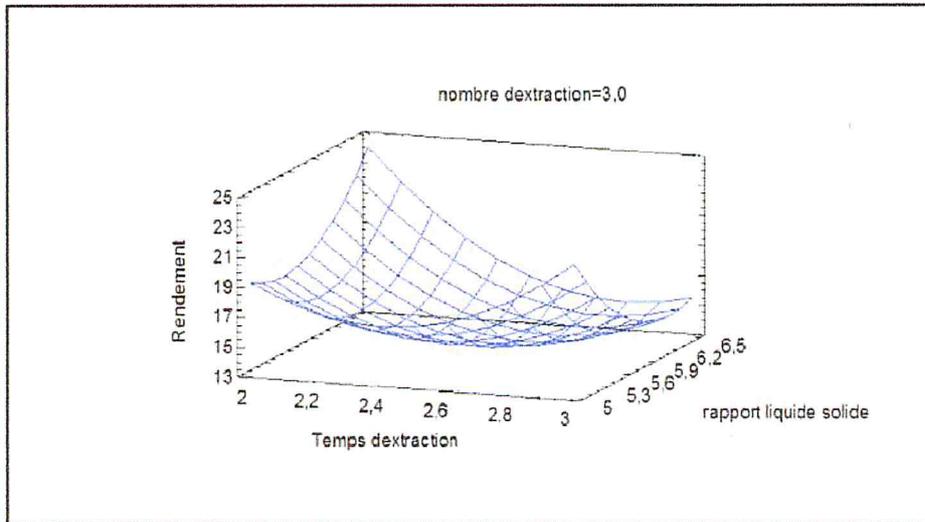
##### a) surfaces de réponse

Les surfaces de réponse sont des représentations graphiques en trois dimensions de la réponse du système étudié en fonction de deux paramètres opératoires, le troisième est pris à son niveau central. Le tracé de ces courbes de surfaces de réponse permet de rechercher des régions expérimentales pour laquelle la réponse est optimale.



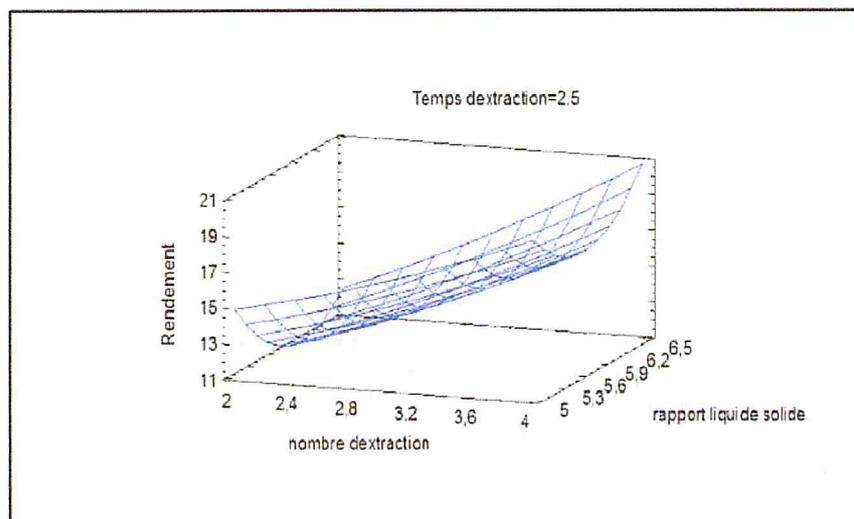
**Figure 22:** Surface de réponses correspondant au couple temps d'extraction- nombre d'extraction pour un rapport liquide/solide = 5,75

La figure 22 illustre la surface des réponses des effets combinés de « temps d'extraction » et du « nombre d'extraction » sur le rendement en extrait, alors que le rapport liquide/solide est fixé à son niveau central. La réponse diminue de façon légère lorsque le temps d'extraction évolue vers son niveau supérieur mais elle marque une augmentation lorsque le nombre d'extraction est au niveau supérieur +1.



**Figure 23 :** Surface de réponses correspondant au couple temps d'extraction- rapport liquide/solide pour un nombre d'extraction= 3,00

La Figure 23 illustre les surfaces de réponses des effets combinés du temps d'extraction et du rapport liquide/solide sur le rendement, alors que le nombre d'extraction est fixé à son niveau centré. Le rendement diminue lorsque le temps passe vers son niveau supérieur. On constate un rendement plus important lorsque les niveaux hauts des deux variables sont combinés.



**Figure24 :** Surface de réponses correspondant au couple nombre d'extraction- rapport liquide/solide pour un temps d'extraction= 2,5H

La courbe représentée sur la Figure 24 met en relation les effets combinés du « nombre d'extraction » et de « rapport liquide/solide » obtenues pour la réponse étudiée, alors que la variable « temps d'extraction » reste fixée au centre du domaine expérimental. L'effet linéaire du nombre d'extraction est clairement significatif comme explicité précédemment lors de l'étude du diagramme de Pareto. La réponse augmente de façon linéaire lorsque l'on passe de son niveau bas à son niveau haut. L'influence de la variable « rapport liquide/solide » est moins importante, on constate cependant un rendement plus important lorsque les niveaux hauts des deux variables sont combinés.

L'étude de ces différentes surfaces confirme les conclusions tirées des analyses de variance et du diagramme de Pareto. De ce fait, les différentes surfaces nous laissent prédire que le rendement en extrait présente un maximum lorsque les deux variables « nombre d'extraction » et « rapport liquide/solide » tendent vers le niveau supérieur 1 et la variable temps d'extraction soit au niveau bas -1. Le tableau 13 rassemble les conditions optimales d'extraction (en valeurs codées et réelles).

#### b) Conditions optimal

Les valeurs des paramètres opératoires optimisés sont présentés dans le tableau suivant (en valeur codée et réelle).

**Tableau 13** : les conditions optimales d'extraction par solvant

Facteurs	Valeur codée	Valeur réelle
Temps d'extraction	-1	2 h
Nombre d'extraction	1	4 fois
Rapport liquide/solide	1	6,5/1

Après avoir fixé les conditions optimales nous avons obtenue un rendement de 26,42% d'extrait



**Figure 25** : extrait de *l'Artemisia campestris. L*

### III.3. Isolation de la fraction volatile à partir de l'extrait par solvant par entraînement à la vapeur d'eau (la technique de combinaison SE-SD)

La fraction volatile isolée par la technique de combinaison SE-SD a donné un rendement de l'ordre de 0,52%. Elle présente les mêmes propriétés organoleptiques que celle de l'huile essentielle ; un liquide jaune d'une odeur caractéristique de la plante.

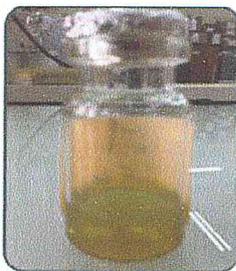


Figure 26 : la fraction volatile *d'Artemisia campestris L.*

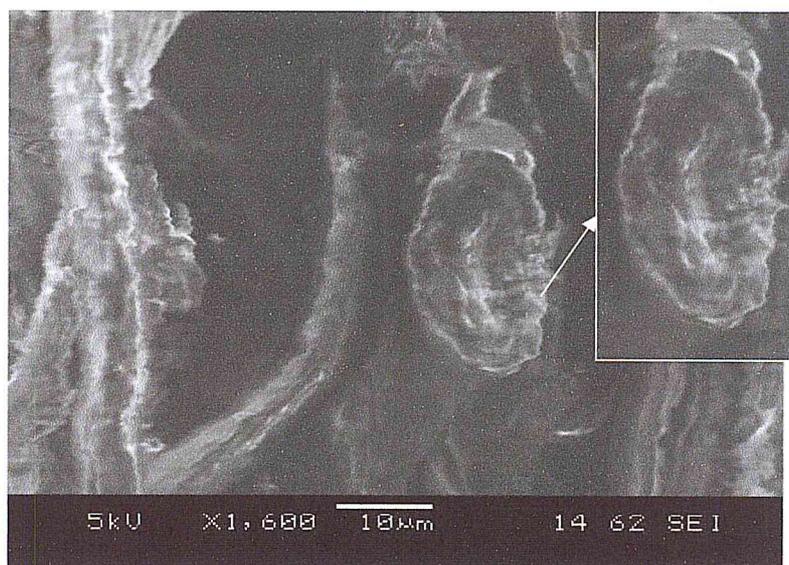
### III.4. Evaluation des effets du prétraitement enzymatique de la matière végétale

Afin de voir l'effet de l'enzyme sur la matière végétale, nous avons procédé à un prétraitement enzymatique de l'armoise champêtre pour l'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau et pour l'extraction par solvant. Les résultats obtenus ont vérifié une augmentation du rendement de 0,37% à 0,41% en huile essentielle et une augmentation en extrait de 0,52% à 0,80%. Le tableau suivant résume les différentes valeurs du rendement obtenu avec les différentes techniques d'extraction sans et avec un prétraitement enzymatique.

Tableau 14 : Comparaison du rendement des différentes techniques d'extraction sans et avec un prétraitement enzymatique.

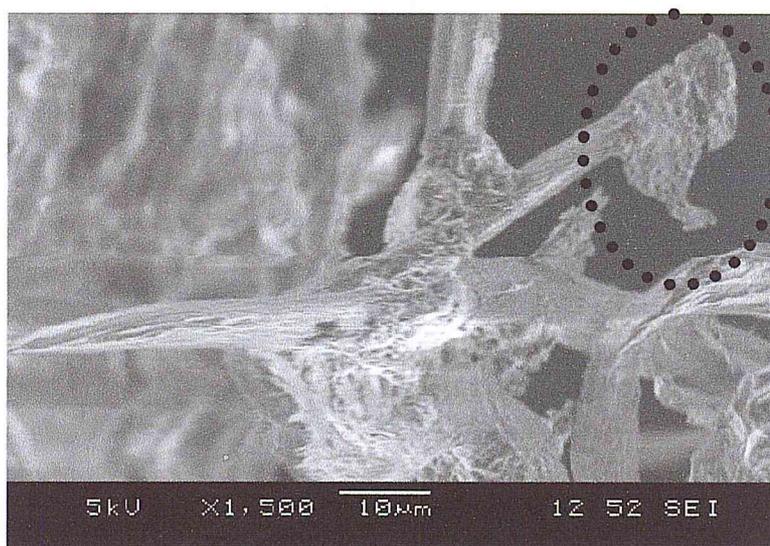
Technique d'extraction	R(%)
Entraînement à la vapeur d'eau	0,37
Entraînement à la vapeur avec prétraitement enzymatique	0,41
Extraction par solvant	0,52
Extraction par solvant avec prétraitement enzymatique	0,80

stress thermique induit par un chauffage, la pression interne dans les glandes peut excéder leur capacité d'expansion.

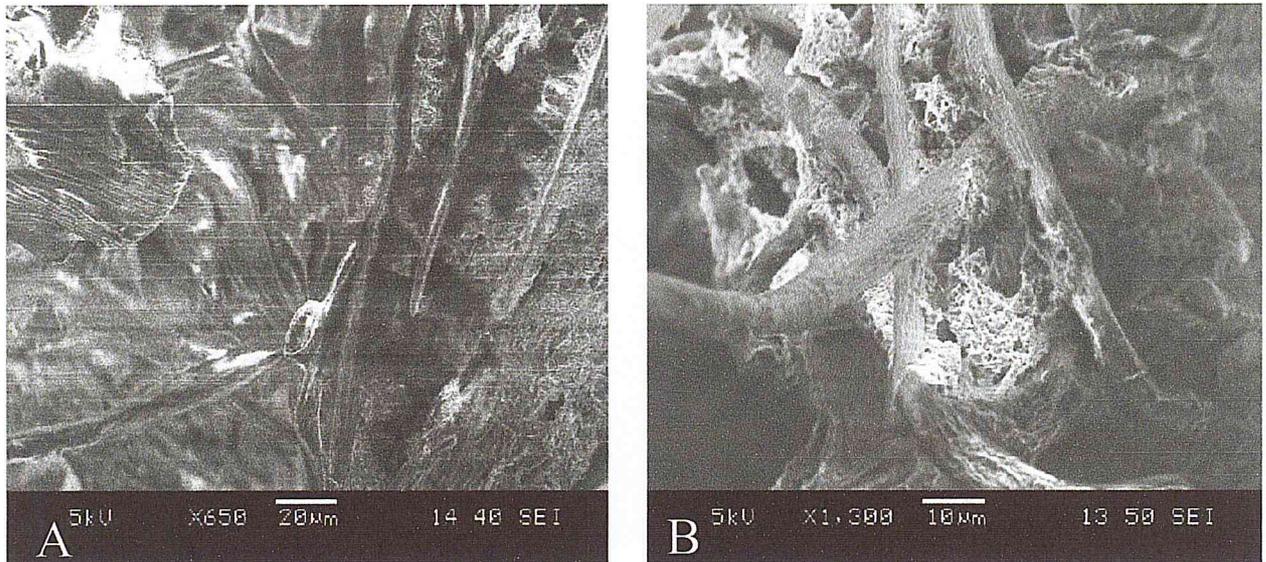


**Figure 28 :** La structure de la feuille d'artemisia campestris observée au microscope électronique à balayage après extraction par EV

Par ailleurs, la micrographie de l'extraction des feuilles d'Artemisia campestris L par le prétraitement enzymatique (figure29) montre que les parois cellulaires sont également endommagées. En effet nous pouvons observer que pour chaque poil, la poche contenant les essences, se retrouve vidée de son contenu. Cela peut s'expliquer l'effet de l'enzyme sur les parois cellulaires.



**Figure 29 :** La structure de la feuille d'artemisia campestris observée au microscope électronique à balayage après extraction par EV avec prétraitement enzymatique



**Figure 30 :** La structure de la feuille d'*artemisia campestris* observée au microscope électronique à balayage après extraction par solvant (A) et par extraction par solvant avec prétraitement enzymatique(B)

L'observation des deux figures (A) et (B) illustre les changements observés sur la micrographie des feuilles qui ont subi l'extraction par solvant sont différents selon la technique d'extraction utilisée.

### **III.7. Analyse de l'huile essentielle par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.**

L'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur d'eau sans prétraitement et avec prétraitement, a été ensuite, analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les conditions opératoires sont détaillées précédemment. Les tableaux 15 et 16 regroupent la composition qualitative et quantitative de l'huile essentielle.

**Tableau 15 :** Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles d'artemisia campestris extraite par entraînement à la vapeur d'eau sans prétraitement

Ordre d'éluion	Nom du composé	Formule moléculaire	Temps de rétention (min)	% de l'aire
1	$\beta$ -Myrcène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	13,74	0,073%
2	cis-Ocimène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	16.96	0.071%
3	3,4-Diéthylphénol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	37.07	0.061%
4	$\alpha$ -Copaéne	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	40.21	0.192%
5	$\beta$ -bourbonéne	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	40.782	0.337%
6	2,5-cyclohexadien-1-yl benzène	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub>	41.191	<b>0.826%</b>
7	Calaréne	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	42.960	<b>0.376%</b>
8	NI	/	43.574	0.146%
9	$\beta$ -Cubébène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	44.529	0.102%
10	$\alpha$ -Humulene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	45.064	0.114%
11	$\beta$ -Farnésene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	45.542	0.130%
12	D-Germacrène	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	47.047	8.591%
13	1h-cycloprope azulene decahydro-1 1 7-trimethyl-4-methylene-	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	47.218	0.090%
14	1-Hexadécene	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>	47.598	0.105%
15	$\beta$ -Germacrene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	47.788	0.335%
16	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahyd ro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	48.041	0.243%
17	E,E- $\alpha$ -farnésene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	48.630	0.426%

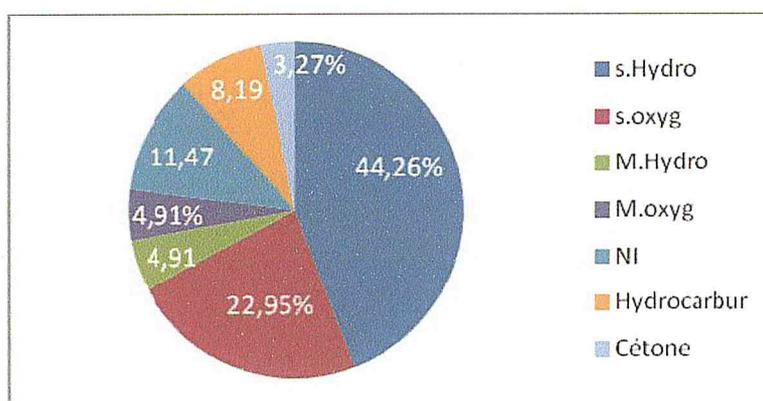
18	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1.alpha.,4a.beta.,8a.alpha.)-	C15H24	48.850	0.350%
19	$\delta$ -Cadinène	C15H24	49.429	0.457%
20	Nérolidol	C15H26O	51.943	0.109%
21	(+) spathuléol	C15H24O	52.694	1.241%
22	Ethyl-o-xylène	C10H14	52.8403	0.153%
23	Caryophyllene	C15H24	53.005	0.120%
24	Tricyclo[4.4.0.0.2,7]dec-3-ene-3-methanol, 1-methyl-8-(1-methylethyl)	C15H24O	53.317	0.143%
25	salvial-4(14)-en-1-one	C15H24O	53.468	0.129%
26	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1 $\alpha$ ,4 $\beta$ ,4a $\beta$ ,7 $\beta$ ,7a $\beta$ ,7b $\alpha$ )]-	C15H26	54.321	0.085%
27	Humulène	C15H24	54.691	0.197%
28	Longipinane, (E)	C15H24	54.852	0.194%
29	$\alpha$ -Longipinene	C15H24	55.485	0.116%
30	Cyclopropane, 1-(2-methylene-3-enyl)-1-(1-methylenepropyl)-	C12H18	55.928	0.076%
31	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	C15H24	56.338	0.561%
32	2-Naphthalenemethanol, decahydro-.alpha.,.alpha.,4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2 $\alpha$ ,4a. $\alpha$ .,8a. $\beta$ )]-	C15H26O	56.766	0.931%
33	$\alpha$ -Cadinol	C15H26O	57.054	1.012%
34	7-éthyl cycloheptabenzène	C15H24	57.565	0.261%
35	7-ethylcycloheptabenzène	C15H26	57.819	0.832%
36	(3E,5E,8E)-3,7,11-Triméthyl-1,3,5,8,10-dodecapentene	C15H22	58.822	1.453%

37	$\Gamma$ -Gurjunenepoxide-(1)	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	60.591	0.083%
38	salvia-4(14)-en-1-one	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	61.253	0.135%
39	Italicene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	61.477	0.230%
40	$\alpha$ -Longipinene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	61.750	0.079%
41	Aromadendrenepoxide	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	62.564	0.080%
42	Bicyclo[3.1.0]hexan-3-ol, 4-méthylène-1-(1-méthyléthyl)-, [1S-(1.alpha.,3.beta.,5.alpha.)]	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	62.871	0.223%
43	3-(1,5-Diméthyl-hex-4-enyl)-2,2-diméthyl-cyclopent-3-enol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	63.976	0.356%
44	3-(1,5-Diméthyl-hex-4-enyl)-2,2-diméthyl-cyclopent-3-enol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	64.425	0.276%
45	Vulgarol B	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	67.830	0.312%
46	6-Phenyl-2-tetralone	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O	70.26	50.055%
47	2-Cyclohexene-1-méthanol, 2,6,6-triméthyl-	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	70.602	0.105%
48	3-Méthyl-2-phenyl-2H-azirine	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N	71.908	0.251%
49	NI	/	76.117	0.247%
50	$\alpha$ -Gurjunene	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	76.833	0.116%
51	(2,2,6-Triméthyl-bicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-méthanol	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O	79.400	0.068%
52	Tricyclo[5.4.0.0.2,8]undec-9-ene, 6,6,9-tetraméthyl-	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	79.566	0.164%
53	Pentacosane	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	95.545	0.192%
54	Heptacosane	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	102.902	0.249%
55	Triacotane	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	109.756	0.244%

NI : Non Identifié

L'analyse de l'huile essentielle extraite à partir des feuilles d'*Artemisia campestris* sans prétraitement enzymatique s'est révélée être très riche puisqu'elle contient plusieurs classes de composés chimiques. Cette huile essentielle est largement dominée par des sesquiterpènes hydrocarbonés avec 27 composés (44.26%) tel que le Germacrene D (8.59%) et le (3E,5E,8E)-3,7,11-Triméthyl-1,3,5, 8,10-dodecapentaène (1.45%).suivi par les sesquiterpènes oxygénés avec 14 composés(22,95%) tel que (+) spathulenol (1,24%) et le  $\alpha$ -Cadinol(1,01%). Les monoterpènes (hydrocarbonés et oxygénés) occupent une fraction importante, puisqu'ils représentent environ 9,83%,

Les hydrocarbures et les composés aromatiques occupent 11,47% de la composition globale, notamment les cétones. Le composé majoritaire obtenu pour cette huile est une cétone avec une teneur de 50.055%.



**Figure 31:** composition chimique d'*Artemisia campestris* L

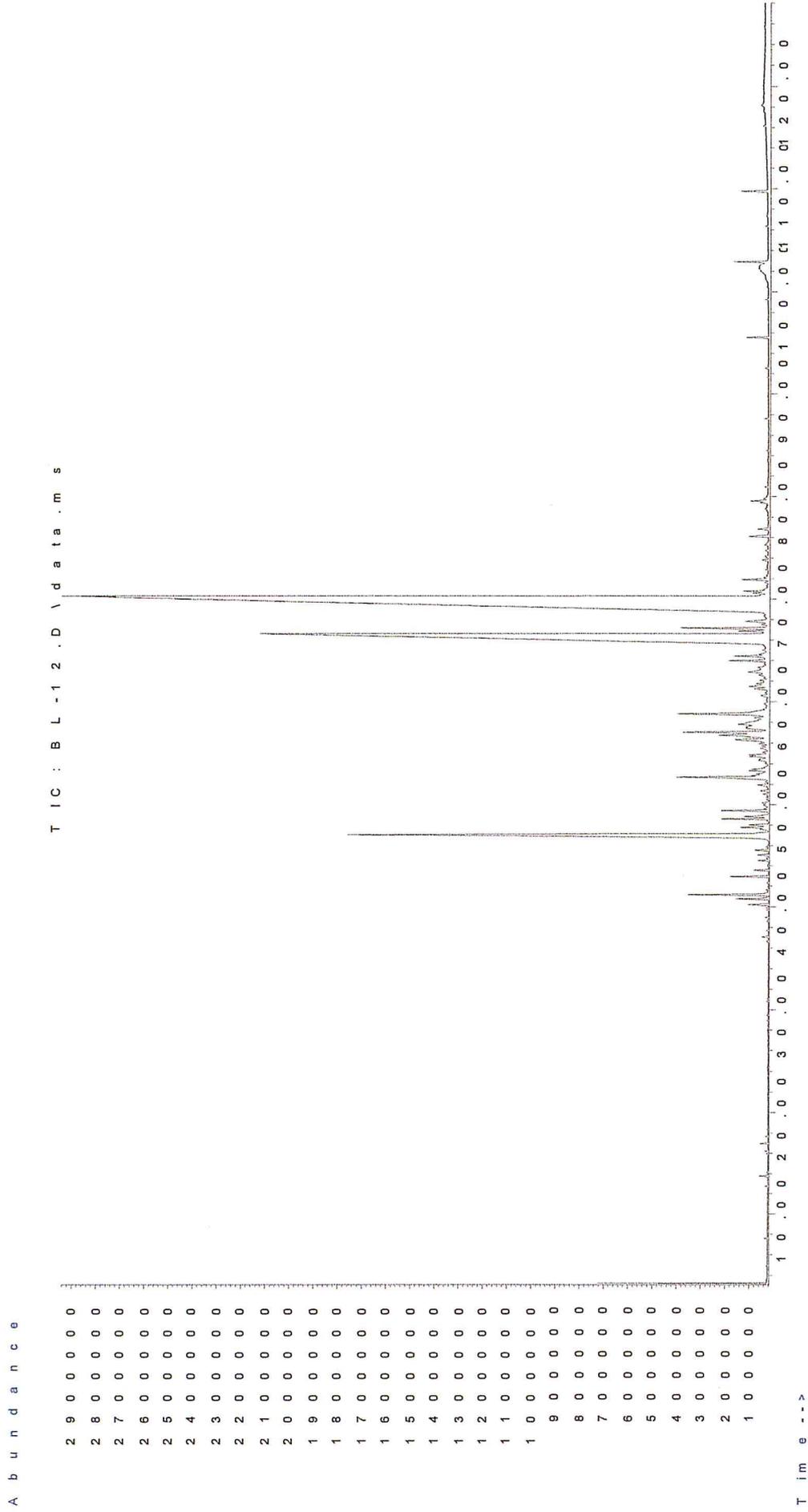


Figure 32 : profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle d'artemisia campestris. L par entrainement à la vapeur d'eau

**Tableau 16** : Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles d'*Artemisia campestris* L traité par l'enzyme.

Ordre d'élué	Nom du composé	Formule moléculaire	Temps de rétention(mn)	% de l'aire
1	Hexen-1-ol, (Z)-	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O	6.5293	0.026%
2	$\alpha$ -pinène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	10.100	0.071%
3	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-diméthyl-1,2-méthylène-, (1S)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	12.667	0.158%
4	$\beta$ -Myrcène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	13.676	0.156%
5	2-méthyl-1,4-Pentadiène	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub>	13.987	0.066%
6	o-Cymène	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	15.882	0.040%
7	$\alpha$ -Limonène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	16.141	0.074%
8	$\alpha$ -terpinolène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	21.509	0.076%
9	Benzèneethanol	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	22.591	0.123%
10	Bicyclo[3.1.1]heptan-3-ol, 6,6-diméthyl-2-méthylène	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	24.101	0.110%
11	trans-Verbenol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	24.632	0.120%
12	Bicyclo[2.2.1]heptan-3-one, 6,6-diméthyl-2-méthylène-	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	25.665	0.057%
13	3-Cyclohexen-1-ol, 4-méthyl-1-(1-méthylethyl)-	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	26.854	0.083%
14	p-Cymen-8-ol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	27.682	0.062%
15	$\alpha$ -terpinéol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	27.969	0.280%
16	Myrtenol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	28.398	0.117%
17	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one,4,6,6-triméthyl	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	29.031	0.052%

18	trans-Mentha-1,8-dien-6-ol	C10H16O	30.030	0.043%
19	Ethanone, 1-(1-cyclohexen-1-yl)-	C8H12O	32.320	0.052%
20	Thymol	C10H14O	36.607	0.069%
21	3-Methyl-cis-3a,4,7,7a-tetrahydroindan	C10H16	37.683	0.045%
22	Eugenol	C10H12O2	39.379	0.494%
23	$\alpha$ -Copaene	C15H24	40.188	0.102%
24	$\beta$ -bourbonène	C15H24	40.767	0.071%
25	1,4-Dimethylnaphthalène	C12H12	41.225	0.574%
26	trans-Caryophyllène	C15H24	42.935	0.092%
27	(-)- $\alpha$ -Neoclovene	C15H24	44.504	0.030%
28	D-germacréne	C15H24	46.901	0.998%
29	$\alpha$ -curcuméne	C15H22	47.144	1.178%
30	$\alpha$ -Cubebene	C15H24	47.773	0.088%
31	2-éthénylnaphthalène	C12H10	47.948	0.116%
32	E,E- $\alpha$ -farnésène	C15H24	48.659	0.107%
33	6-bis(1,1-diméthylethyl)4méthylphenol	C15H24O	48.9812	1.023%
34	delta.-Cadinène	C15H24	49.444	0.223%
35	Benzenemethanol, $\alpha$ ,4diméthyl-,	C9H12O	49.648	0.060%
36	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-triméthyl-	C11H16O2	49.819	0.111%
37	Phenol, 2,6-bis(1,1-diméthylethyl)-4-méthyl-(CAS)	C15H24O	50.043	0.200%

56	m-Mentha-4,8-diene, (1S,3S)-(+)-	C10H16	57.667	0.199%
57	d-Nerolidol	C15H26O	58.018	0.234%
58	m-Mentha-4,8-diene, (1S,3S)-(+)-	C10H16	58.154	0.255%
59	Dehydroaromadendréne	C15H22	58.549	0.417%
60	(3S,4R,5S,6R,7S)-Aristol-9-en-3-ol	C15H24O	59.012	1.480%
61	1,3,3-Trimethyl-2-hydroxymethyl-3,3-dimethyl-4-(3-methylbut-2-enyl)-cyclohexéne	C15H26O	59.255	0.324%
62	Valerenol	C15H24O	59.806	0.125%
63	NI	/	60.624	0.155%
64	NI	/	61.307	0.145%
65	Tricyclo[4.4.0.02,7]dec-3-ene-3-me thanol, 1-methyl-8-(1-methylethyl)	C15H24O	62.724	0.258%
66	13-Epitorreferol	C20H34O2	63.051	1.072%
67	1,2-Longidione	C15H22O2	63.455	0.194%
68	$\beta$ -vulgarol	C15H24O	64.005	0.111%
69	2-methyl-5-(1-methylethenyl)-2-Cyclohexen-1-one	C10H14O	64.459	0.110%
70	{2-Methyl-4-(1',2',2'-trimethylbicyclo[3.1.0]hex-3'-yl)but-2-en-1-ol	C14H24O	64.692	0.116%
71	Dihydro(-)-Neoclovene-(I)	C15H26	67.435	0.583%
72	CYCLOISOLONGIFOL-5-OL	C15H24O	68.117	0.172%
73	6-Phenyl-2-tetralone	C16H13O2	70.485	19.807%
74	NI	/	71.371	25.342%

75	NI	/	71.518	5.075%
76	1,8-dimethyl-8,9-epoxy-4-isopropyl-Spiro[4.5]decan-7-one	C15H24O2	71.674	0.179%
77	2,7-Ethanonaphth[2,3-b]oxirene, 1a,2,7,7a-tetrahydro-, (1a.alpha.,2.alpha.,7.alpha.,7a.alpha.)-	C12H12O	71.903	0.162%
78	4-acetyl-2-methylnaphthalene-1,3-diol	C13H12O3	72.502	0.048%
79	Isopropyl-phenyl-acetylene	C11H12	74.061	0.073%
80	Aciden-Hexadecanoique	C16H32O2	74.431	0.055%
81	2,3-dihydro-1,1,5-trimethyl-1H-Indene	C12H15	75.732	0.193%
82	1-Phenyl-1-nonyne	C15H20	76.370	0.255%
83	Eicosane	C20H42	79.113	0.056%
84	(Z,Z,Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid, methyl ester	C19H32O2	79.239	0.072%
85	6,6,9-tetramethyl-Tricyclo[5.4.0.02,8]undec-9-ene	C15H24	80.009	0.043%
86	Tricosane	C23H48	83.453	0.064%
87	Tetratriacontane	C34H70	87.663	0.072%
88	3-ethyl-2-methyl-2H-naphtho[2,3-b] pyran-5,10-dione	C20H20O3	90.069	0.034%
89	Tetracosane	C24H50	91.711	0.106%
90	Pentacosane	C25H52	95.608	0.223%
91	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	C24H38O4	97.474	0.455%
92	Triacotane	C30H62	99.316	0.075%
93	Nonadecane (CAS)	C19H40	102.984	0.411%

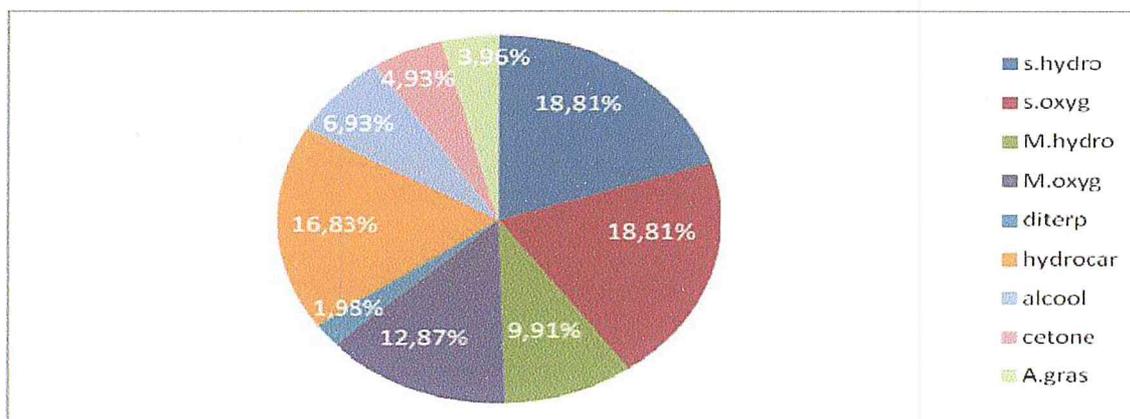
94	Docosane, 11-decyl- (CAS)	C32H66	106.394	0.067%
95	Nonadecane	C19H40	109.844	0.461%
96	Docosane, 11-decyl- (CAS)	C32H66	116.177	0.049%

L'huile essentielle extraite à partir des feuilles d'*Artemisia campestris* L. traitées avec l'enzyme s'est révélée très riche par rapport à l'huile essentielle extraite sans prétraitement. On remarque que cette huile essentielle contient plus de composés par rapport à la première.

Cette huile essentielle est largement dominée par des sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés avec 19 composés pour chaque classe (18,81%) où le composé majoritaire de cette classe est le 1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-triméthyl-4-méthylène-, [1ar-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta., 7a.beta.,7b.alpha.)]- avec (2,03%) suivi par le beta.-Eudesmol (1,81).

Les monoterpènes oxygénés sont présents (12,87%) par contre les monoterpènes hydrocarbonés occupent (8,91%)

On note aussi la présence des diterpènes sous forme de traces et des hydrocarbures, alcool, des acides et des cétones



**Figure 33:** composition chimique de l'HE d'*Artemisia* traité par l'enzyme

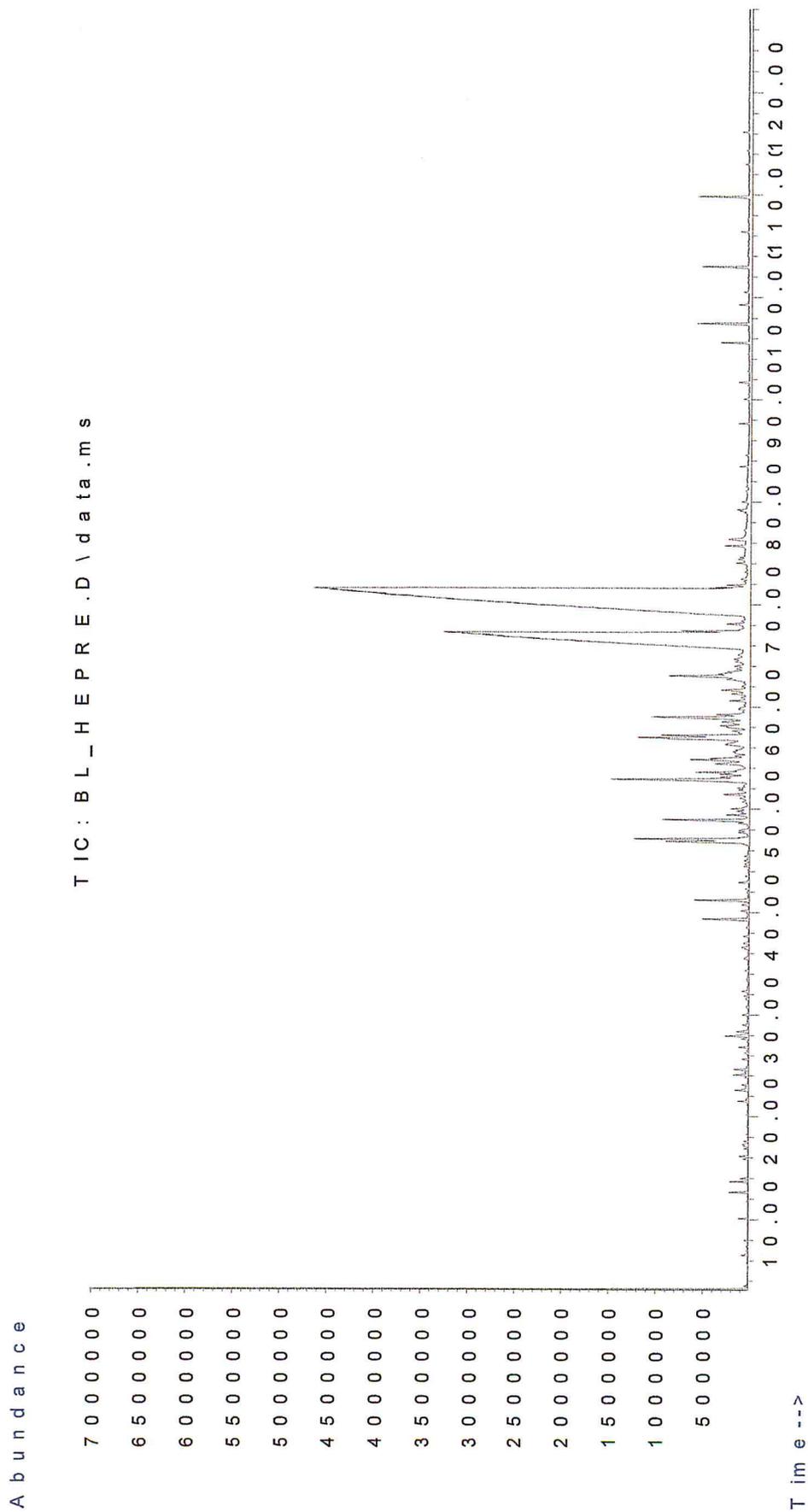


Figure34 : profil chromatographique d'analyse de l'huile essentielle d'Artemisia campestris L. traité par l'enzyme

### III.8.Activités biologiques

#### III.8.1.Evaluation de l'Activité antibactérienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien de trois échantillons ; l'huile essentielle sans et avec prétraitement enzymatique et la fraction volatile d'*Artemisia campestris*.L par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé (Muller Hinton) (Aromatogramme).

L'activité antibactérienne de nos échantillons est mesurée en diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les échantillons à tester vis-à-vis de trois germes pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptocoque* ..... ) après 24 h d'incubation à une température de 37° C. Les résultats qualitatifs sont représentés dans le tableau 17

Tableau 17: diamètre des zone d'inhibition d'*Artemisia campestris* .L

Les bactéries	Gram	Huile essentielle	Huile essentielle (prétraitement)	Fraction volatile
<i>Escherichia coli</i>	-	29 mm	17 mm	23 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	12 mm	25mm	20mm
<i>Streptococ</i>	+	10 mm	11mm	10mm

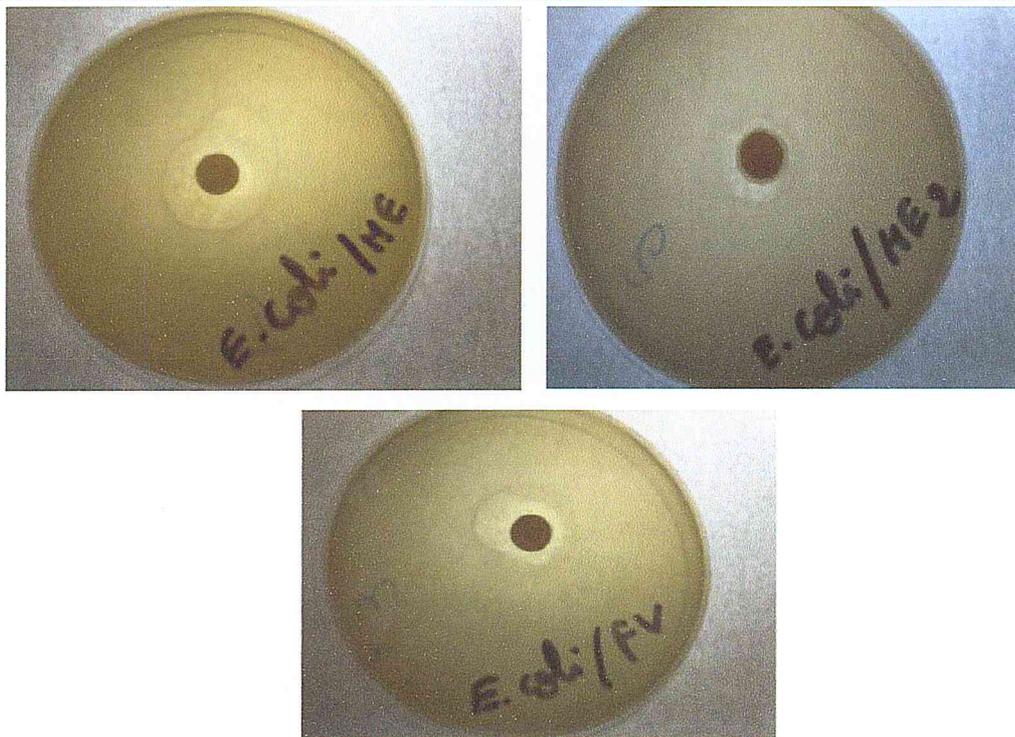
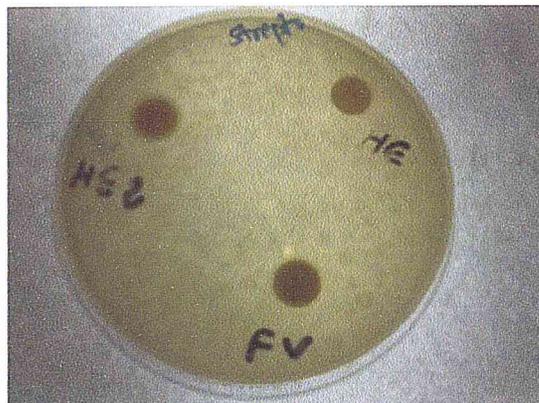


Figure 35 . Aromatogramme de *E. Coli* avec les 3 échantillons.



**Figure36.** Aromatogramme de *Staphylococcus aureus* avec les 3 échantillons.



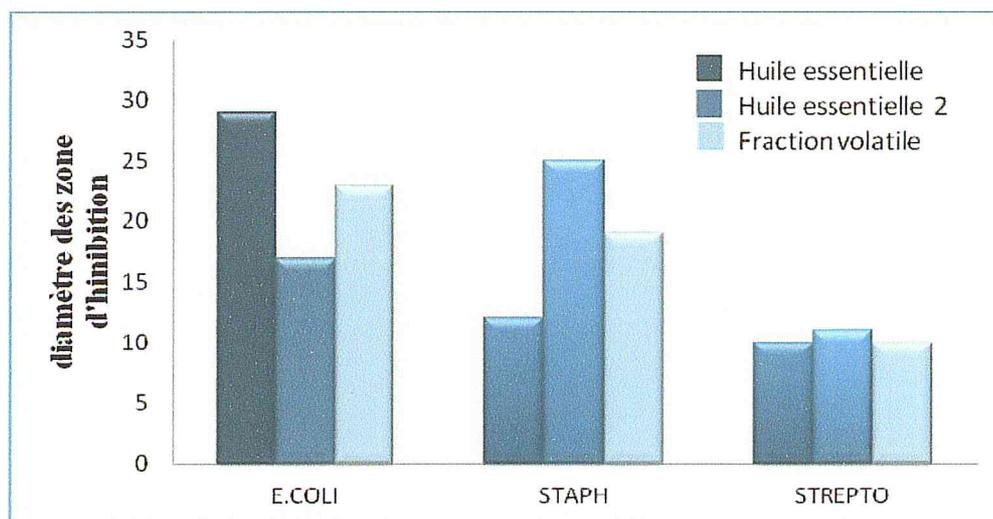
**Figure 37** Aromatogramme de *Streptococ* avec les 3 échantillons

Après l'incubation, on remarque l'apparition des zones d'inhibition avec des diamètres différents qui entourent les disques imprégnés de l'huile essentielle 1 et 2 et la fraction volatile ; cela s'explique par le fait que les souches bactériennes :

*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococ*, sont sensibles vis-à vis nos échantillons.

- La bactérie *Escherichia coli* est extrêmement sensible à l'HE et à la fraction volatile, avec une zone d'inhibition de 29mm, 23mm respectivement. Elle présente aussi une sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle avec le prétraitement enzymatique avec un diamètre de l'ordre de 17mm.
- *Staphylococcus aureus* est moyennement sensible à l'HE qui a donné une zone d'inhibition de 12 mm. Elle est aussi très sensible vis-à-vis la fraction volatile avec une zone de 20mm. Par contre elle est extrêmement sensible vis-à-vis l'huile essentielle extraite à partir de la plante traitée avec l'enzyme dont le diamètre d'inhibition est de l'ordre de 25mm.
- La bactérie *Streptococ* est moyennement sensible pour les trois échantillons avec un diamètre presque identiques entre 10 et 11mm.

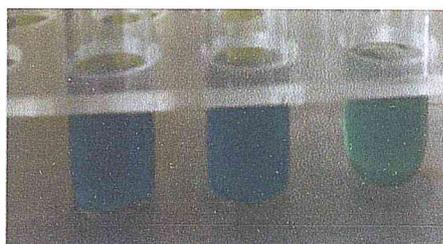
L'histogramme suivant présente le comportement de l'huile essentielle avec et sans prétraitement enzymatique ainsi que la fraction volatile vis-à-vis les souches bactériennes.



**Figure38 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition des bactéries**

### III.8.2. Evaluation de l'activité antioxydante (Réduction du fer Frap)

La méthode est basée sur la réaction de réduction du  $Fe^{3+}$  présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en  $Fe^{2+}$ , la réaction est révélée par le virement de couleur jaune de fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en couleur bleu vert du fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 657 nm.



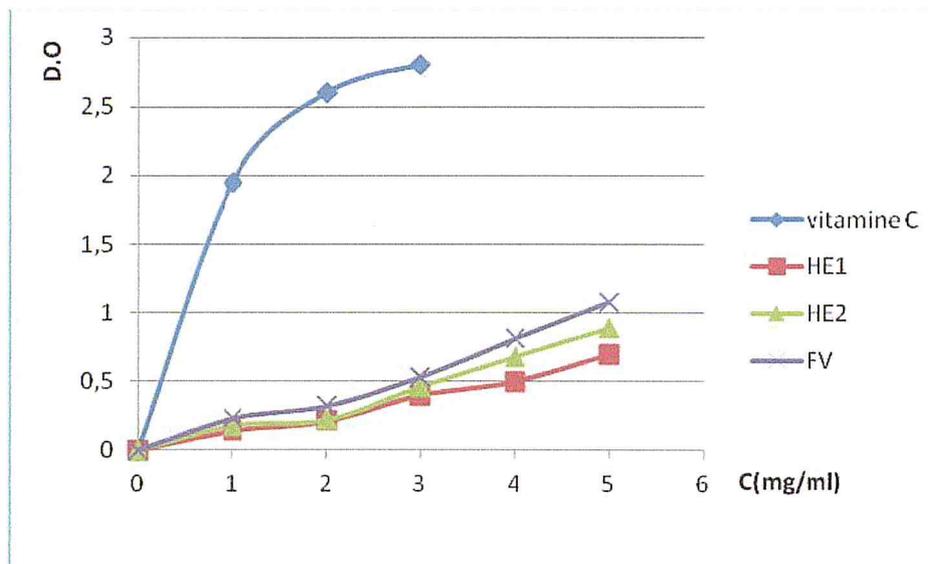
**Figure 39** : virement de la couleur jaune de fer ferrique en couleur bleu vert du fer ferreux.

Dans ce travail l'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif de l'évaluation de l'activité antioxydante. Le tableau regroupe les résultats obtenus :

Tableau 18: résultats expérimentaux de l'activité antioxydante :

[c](mg/ml)	Vitamine C	HE1	HE2	FV
0	0	0	0	0
1	1,95	0,14	0,18	0,23
2	2,6	0,21	0,22	0,32
3	2,8	0,40	0,46	0,53
4	-	0,50	0,68	0,81
5	-	0,70	0,89	1,08

La figure39 représente le pouvoir réducteur de l'huile essentiel 1,2 et la fraction volatile d'*Artemisia campestris*L



**Figure 39:** activité antioxydante d'*Artemisia campestris* L

Les résultats obtenus montrent que tous les échantillons d'*artemisia campestris* L ont un pouvoir réducteur et ils présentent une activité antioxydante, mais qui est nettement inférieure à celle de la référence (acide ascorbique)

En comparant nos échantillons, la fraction volatile présente le meilleur pouvoir réducteur par rapport aux deux autres échantillons avec une densité optique maximale de 1,08 à une concentration 5mg/ml. Il est à signaler le prétraitement enzymatique a augmenté le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle.

---

# CONCLUSION

---

## 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 de l'huile essentielle, utilisation de la méthodologie de plans d'expérience Box-Behnken pour étudier les effets des paramètres opératoires de l'extraction par solvant. L'évaluation des effets du prétraitement enzymatique de la matière végétale sur l'extraction de l'huile essentielle et sur l'extraction par solvant et son impact sur le rendement, la composition chimique et l'activité antibactérienne et antioxydante.

- L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle laboratoire. L'étude de certains paramètres influençant le rendement de l'huile essentielle nous a permis de donner un meilleur rendement de l'ordre de **0,82%**.
- L'optimisation des paramètres opératoires de l'extraction par solvant (« temps d'extraction », « nombre d'extraction », « rapport liquide /solide » par plan d'expériences Box Behnken a montré que ces paramètres influent sur le rendement en extrait de façon significative à savoir : les effets simples, les effets quadratiques et les effets d'interaction. Ainsi que la valeur du coefficient de détermination  $R^2$  qui est égale a 97,52%, indique une meilleure relation entre l'expérimental et le modèle choisi
- Une augmentation du rendement a été observée après l'utilisation de l'enzyme « Hémicellulase » pour un prétraitement de la matière végétale, de 0.37% à 0.41% pour l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau et de 0.52% à 0.80% pour l'isolation de la fraction volatile en utilisant la technique de combinaison SE-SD.
- L'observation des feuilles d'*Artemisia campestris* L. par la microscopie électronique a balayage nous a permis d'observer l'état des cellules avant et après l'extraction de l'huile essentielle de cette plante qui sont localisé dans des poils sécrétrices ainsi que de comprendre l'effet de l'enzyme sur les structures de la feuille.
- L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/SM) a permis l'identification de la composition chimique de l'huile essentielle

d'*Artemisia campestris* L. sans prétraitement enzymatique extraite par entraînement à la vapeur d'eau. Cette dernière est composée principalement par des sesquiterpènes hydrocarbonés avec 27 composés (44,26%) tel que le D-Germacrène(8,59%) et le (3E,5E,8E)-3,7,11-Triméthyl-1,3,5, 8,10-dodecapentaène (1,45%), suivi par les sesquiterpènes oxygénés avec 14 composés(22,95%) tel que (+) spathulenol (1,24%) et le  $\alpha$ -Cadinol(1,01%). Les monoterpènes (hydrocarbonés et oxygénés) occupent une fraction importante, puisqu'ils représentent environ 9,83%. Le composé majoritaire obtenu pour cette huile est une cétone avec une teneur de 50,055%.

- L'huile essentielle extraite à partir des feuilles d'*Artemisia campestris* L. traitées avec l'enzyme s'est révélée très riche par rapport à l'huile essentielle extraite sans prétraitement. Cette huile essentielle est largement dominée par des sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés où le composé majoritaire de cette classe est le 1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol,décahydro-1,1,7-triméthyl-4-méthylène-[1ar (1a.alpha.,4a.alpha.,7.beta., 7a.beta.,7b.alpha.)]- avec (2,03%) suivi par le beta.-Eudesmol (1,81%). Les monoterpènes oxygénés présentent (12,87%) par contre les monoterpènes hydrocarbonés occupent (8,91%).
- Les tests d'activités antibactériennes effectués sur l'huile essentielle et la fraction volatile ont montré qu'ils avaient des actions inhibitrices contre « *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ».avec des zones qui dépassent 20 mm. Par contre la bactérie *Streptocoque* s'est révélée assez résistante.
- Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle et la fraction volatile testée par la méthode de FRAP ont montré que la fraction volatile est la plus active mais ils ont un pouvoir antioxydant faible par rapport à l'acide ascorbique.

---

# REFERENCES

---

[1] **LESLEV BREMNESS**. « Plantes aromatiques et médicinales ; 700 espèces ». La rousse 2005.

[2] **Z. MOHAMEDI**. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magister. Université Abou Bakr Belkaid Tlemcen, faculté des sciences, département de biologie, laboratoire Produit Naturels 2005-2006.

[3] **BRUNETON J.** « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». Editions Tec & Doc, éditions médicales internationales, pp: 483-560. Paris 1999.

[4] **F. Bakkali , S. Averbeck , D. Averbeck , M. Idaomar**. Biological effects of essential oils: A review. Food and Chemical Toxicology 46 :446–475. (2008).

[5] **J. Azmir, I.S.M. Zaidul, M.M. Rahman, K.M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, K. Ghafoor , N.A.N. Norulaini, A.K.M. Omar, M.H.A. Jahurul**. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. Journal of Food Engineering 117 :426–436. (2013).

[6] **M. Boudjouref**. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*artemisia campestris* L. thèse de Magister, université Ferhat Abbas, Sétif, Faculté des sciences de la nature et de vie, département de biochimie. 2011.

[7] **MICHEL BOTINEAU**. « Préface de Jean-Marie-Pelt. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs ».

[8] **ŞURA BAYKAN EREL, G. REZNICEK, S. G. ŞENOL, N.S. U. K. YAVAŞOĞULU, S. KONYALIOĞLU, A. ULVI ZEYBEK**. Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia L.* species from western Anatolia. Journal of Turk J Biol 36 :75-84. (2012).

[9] **N. MEZACHE**. Détermination structural et évaluation biologique de substances naturelles de quelques espèces de la famille Astéracée. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine, faculté des sciences exactes, département de chimie. 2010.

[10] **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.

- [11] **B.BAKCHICHE, A.GHERIB, A. AAZZA, G.CUSTODIA, M.GRACA MIGUEL.** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products* 46 : 85– 96. (2013).
- [12] **Benoit Bock Tela Botanica**, base de données Nomenclature de la Flore de France BDNFF, 4.02 18.06.2011.
- [13] **K. Maiza.R.A.Brac de la Priere.V.Hammiche** « Pharmacopée traditionnelle Saharienne : Sahara septentrional. Médicament et aliments : l'approche ethnopharmacologique ». p 169.
- [14] La grande flore en couleurs de **GASTONBONNIER**, 3 BELIN, p 543.
- [15] **P. Quezel, S.Santa** . Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (Tome II). CNRS, Paris. 1963.
- [16] **PAUL OZENDA** .Flore du Sahara, deuxième édition, p 441-416.
- [17] « Catalogue des espèces et Habitats des sites Natura 2000 de la région Wallonne Edité par la DGARNE/DNF.fiche rédigée sur la base des dociers scientifiques réalisés par le DEMNA, la FUSAGx, l'UCL et avec la collaboration de Notagora. Natura 2000 »
- [18] **ALBERT BLANCHARD**. « Librairie, scientifique et technique. Tome II. 9 rue de Médicis, paris 6 ».
- [19] **PAUL FAURNIER**. « Plantes médicinales, préface par Jean-Marie-Pelt. Tome I .Abricot à coloquinte connaissance et mémoire européennes 1999 ».
- [20] **MOHAND AIT YOUSSEF**. Plantes médicinales de Kabylie. Préface du docteur Jean-Philippe-Brette. Ibis press, paris 2006.
- [21] **M.Sefi, H.Fetoui 1, M.Makni , N.Zeghal**. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1986–1993. (2010).
- [22] **M. Saoudi, M. Salah Allagui, A. Abdelmouleh, K. Jamoussi, A. ElFeki**, Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus*

lagocephalus extract-induced oxidative damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62: 601–605. (2010).

[23] **A. Akrou1, 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.

[24] **F. Baba Aissa.** Les plantes médicinales en Algérie. Coédition Bouchene et Addiwane, Alger. Algérie. 1991.

[25] **Mahboba B. Naili, Rabia O. Alghazeer, Nabil A. Saleh ,Asma Y. Al-Najjar.** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Journal of Chemistry* 3: 79–84. (2010).

[26] **Ahmed AKROUT.** Contribution a l'étude chimique et activités biologiques de la plante *Artemisia campestris*. L. Thèse de doctora, Université de Sfax, Faculté des Sciences de Sfax. 27 Mai 2005.

[27] **Ahmed Akrou.** Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 49: 342–347(2011).

[28] **I.Karabegovi, Milena Nikolova, Dragan Veli kovi, S.Stoji evi, Vlada Veljkovi , Miodrag Lazi.** Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Methanolic Extracts of the *Artemisia* sp. Recovered by Different Extraction Techniques, *Journal of Chemical Engineering*, 19(3) 504-511 (2011).

[29] **Jerkovic J., Mastelic M. Milos., Juteau F., Masotti V and VianoJ.** Chemical variability of *Artemisia vulgaris* L. essential oils originated from the Mediterranean area of France and Croatia *Flavour. Fragr. J.* (18): 436–440(2003).

[30] **R.Belhattab ,Boudjouref M., Barroso J.G., Pedro L.P, Figueirido A.C.,** Essential Oil Composition from *Artemisia campestris* Grown in Algeria. *Journal of Advances in Environmental Biology*, 5(2): 429-432, (2011).

[31] **S.TOUIL.** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Artemisia HARBA ARBA ASSO et Artemisia campestris.L de la région aride de Djelfa.

Thèse de magistère. Université Saad Dahleb de Blida, faculté des sciences agro-vétérinaires, département des sciences agronomiques. novembre 2012.

[32] F. Juteau, V. Masotti, J-M. Bessière , J. Viano .Compositional characteristics of the essential oil of *Artemisia campestris* var. *glutinosa*. *Bioch. Syst. Ecol.* (30): 1065-1070. (2002).

[33] A.María José , B. Luis Miguel, Luis Apaza , Paulina Bermejo . The *Artemisia* L. Genus: A Review of Bioactive Essential Oils : A review. *Molecules*, 17: 2542-2566. (2012).

[34] K.HUSNU CAN BASER GERHARD BUCHBAUER « Handbook of essential oils .science, technology and applications ». CRC press Taylor &Francis group.

[35] 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.

[36] 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.

[37] A. Djeridane, M. Yousfi , J. Michel Brunel , P. Stocker. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology* 48: 2599–2606. (2010)

[38] A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, N. Vidal. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97: 654–660.(2006).

[39] Y. Aniya, M. Shimabukuro, M. Shimoji, M. Kohatsu, M.A. Gyamfi, and C.Miyagi. Antioxidant and hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. *J. Biol. Pharm. Bull.* 23 (3):309–312. (2000).

[40] Kyeong Won Yun, A. Maun and J.Hee Kim. Effects of the aqueous extract from *Artemisia campestris* ssp.caudata on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *Journal of plant biology*, 50(3):358-361. june 2007.

[41] A. Memmi, G. Sansa, I. Rjeibi, M. El ayebe, N. Srairi-Abid, Z. Bellasfer, and A. Fekih. Use of medicinal plants against *scorpionic* and *ophidian* venoms. *Arch. Inst. Pasteur.*

*Tunis*. **84** (1-4): 49-55. (2007).

[42] **GUENTHER E.** The essential oils, Ed. Robert Krieger publishing Co. H. Huntington, New York. 1972

[43] **K. BOUTEMAK.** Contribution a l'étude des procédés d'extraction conventionnels et innovants appliqués a la récupération de l'huile essentielle de l'Armoise blanche d'Algérie (*Artemisia herba alba*).Thèse de doctorat. Université Saad Dahleb de Blida, faculté des sciences de l'ingénieur, département de chimie industrielle, juin 2011.

[44] **Normes AFNOR.** Recueil des normes françaises, huiles essentielles. AFNOR. Paris.1992.

[45] **R. PERRIN, J-P. SCHARFF.**Chimie industrielle.Editon. Dunod-Paris1997.

[46] **P. SCHIMMERLING, J-C. SISSON, A. ZAIDI.** Pratique des plans d'expériences. Tec & doc. Lavoisier. Paris.1998.

[47] **J. GOUPY.** Modélisation par les plans d'expériences. Techniques de l'ingénieur Traité mesures et contrôle. R275

[48] **MOSTAFA KHAJEH.** Optimization of process variables for essential oil components from *Satureja hortensis* by supercritical fluid extraction using Box-Behnken experimental design. The Journal of Supercritical Fluids.55 :944-948(2011).

[49] **J. Goupy, L. Creighton,** Introduction aux plans d'expériences, 3ème édition. Dunod. Paris, 2006.

[50] **L. Eriksson, E. Johansson et coll.** « Design of Experiments”, Umetrics Academy (2000).

[51] **Z.R. Lazić,** “Design of Experiments in Chemical Engineering”, Wiley (2004).

[52] **X.-M. Li, S.-L. Tian, Z.-C. Pang, J.-Y. Shi, Z.-S. Fengc, Y.-M. Zhang,** Extraction of *Cuminum cyminum* essential oil by combination technology of organic solvent with low boiling point and steam distillation, Food Chemistry 115: 1114–1119. (2009)

[53] **Xianzhong Zhang, Hongjian Gao, Lifan Zhang, Donghong Liu, Xingqian Ye.** Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam

distillation, and identification of its chemical composition. *Industrial Crops and Products* 39: 162-169.(2012)

[54] **Munish Puri, Deepika Sharma and Colin J. Barrow.** Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants.A review *Trends in Biotechnology*. Vol. 30, No. 1. January 2012.

[55] **M .Pinelo, A. Arnous , A. S. Meyer.** Upgrading of grapeskins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release *Trends in Food.A review. Science & Technology* 17: 579-590 (2006).

[56] **S. Chen, X.Xing, J. Huang, M. Xu.** Enzyme-assisted extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba* leaves: Improvement effect of flavonol transglycosylation catalyzed by *Penicillium decumbens* cellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 48 : 100–105(2011)

[57] **K.hosni, I.Hassen, H.Chaabane, M.jemli, S.Dallali, H.Sebei, H.Casabianca.** Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*.47: 291-299(2013).

[58] **F.Li, L.Yang, T.Zhao, J.Zhao, Y.Zou, Y.Zou, X.Wu.** Optimization of enzymatic pretreatment for *n*-hexane extraction of oil from *Silybum marianum* seeds using response surface methodology *food and bioproducts processing* 9 0 : 87–94( 2 0 1 2 ).

[59] **H.B. Sowbhagya , P. Srinivas, N. Krishnamurthy.** Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds .*Food Chemistry* 120: 230–234. (2010).

[60] **H.B. Sowbhagya, Kaul T. Purnima , Suma P. Florence , A.G. Appu Rao , P. Srinivas.** Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil. *Food Chemistry* 113: 1234–1238(2009).

[61] **Allured Publ.,Carol Stream, IL.** identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Adams R.P.(1995).

[62] **M. L. Faleiro, M. G .Miguel, F.Ladeiro; F.Venancio, R.Tavares, J. C.Brito; A. C. Figueiredo; J. G. Barroso, L. G. Pedro .**Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*, *Letters in Applied Microbiology*, 36:35–40, (2003).

[63] **M. Amin , E. Kalantar , N. Mohammad-Saeid , B. Ahsan.** Antibacterial effect and physicochemical properties of essential oil of *Zataria multiflora* Boiss. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 439-442(2010).

- [64] **B.Teixeira, A.Marques, C.Ramos, N.R.Neng, José M.F.Nogueira, J.A.Saraiva, M.L.Nunes.** Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products* 43: 587-595(2013).
- [65] **J. H. López-Vargas, J. Fernández-López, J. A. Pérez-Álvarez , M. Viuda-Martos.** Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. *Food Research International*.51: 756-763 (2013).
- [66] **B. Benjlali, A .tantaoui-elarki, M. ismaili-alaoui .** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé . *Plant. Méd. Phytothér.* 1986; 20, pp: 155-167.
- [67] **B. Satrani, H. fougrach, B. bourkhiss, D. boustia, M. TALBI.** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus* . *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, 2007, 146, pp : 85-96.
- [68] **VG .De billerbeck, C. roques, P. vaniere, P. marquier .** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles . *HYGIENES Vol X – n°3*, pp : 248-251(2002).
- [69] **M-C. Pibiri.** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles . Thèse de doctorat ès sciences, école polytechnique fédérale de Lausanne pp : 19-55. (2005).
- [70] **M .N Boukhatem** Extraction, caractérisation des huiles essentielles du geranium rosat et formulation d'une pommade a effet cicatrisant . thèse de magister, universite saad dahleb de blida faculté des sciences agro vétérinaire et biologique département de biologie.2010.
- [71] **C.Duraffourd ; J-C. Lapraz ; R.Chemli ;** La plante médicinale de la tradition à la science.1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, p.222(1997).
- [72] **M. Oyaizu,** Studies on products of browning reaction-Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307–315.(1986).
- [73] **V.L.Singleton et J.A. Rossi.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture.* 16: 144-153. (1965).
- [74] **M.N.Boukhatem, M.S.Hamaidi, F.Saidi, Y.Hakim.** Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). *Revue « Nature et Technologie ».* n° 03/Juin 2010
- [75] **L.E.a-Ayuso et M.D. Luque De Castro,** *Anal. Chim. Acta* 382 : 309. (1999).

## ANNEX A

### Caractérisation de l'huile essentielle

#### 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>.

#### Mode opératoires:

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 :

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

Où :

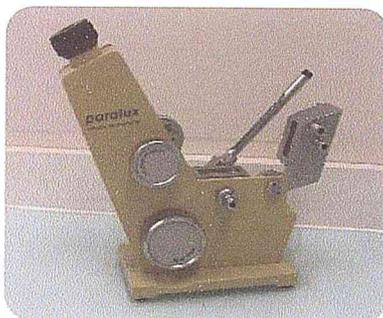
$\rho_{20(\text{HE})}$  : La masse volumique de l'huile essentielle de l'*Artemisia campestris* à 20°C

$\rho_{20(\text{eau})}$  : 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.



**Figure : 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  $n_D^T$

### **Caractéristiques chimiques de l'huile essentielle**

#### **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.

#### **Méthode de calcul**

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

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

Où :

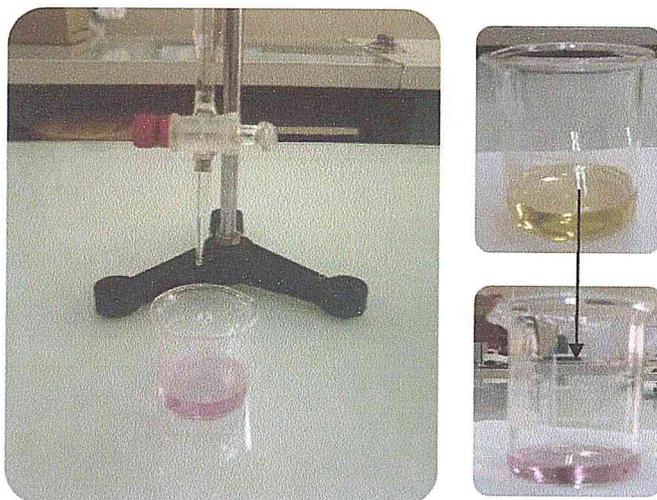
$I_A$  : L'indice d'acide

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

$m$  : La masse de la substance à examiner en g

## Mode Opérateur

On introduit 0,5 g de l'huile essentielle dans 25 ml d'éthanol et 5 gouttes de phénolphthaléine comme indicateur coloré, et on neutralise la solution avec l'hydroxyde de potassium contenue dans la burette.



**Figure : Différentes étapes de la détermination de l'indice d'acide**

### Détermination de l'indice d'ester

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1g d'huile essentielle. L'hydrolyse des esters présents dans l'huile essentielle se fait par chauffage, dans des conditions définies, en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique et dosage en retour de l'excès d'alcali par une solution d'acide chlorhydrique HCl. La figure 10 illustre les différentes étapes de la détermination de l'indice d'ester.

### Méthode de calcul

$$IE = \frac{28,05}{m} (V_0 - V_1) - IA$$

IE : Indice d'ester ;

$V_0$  : est le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

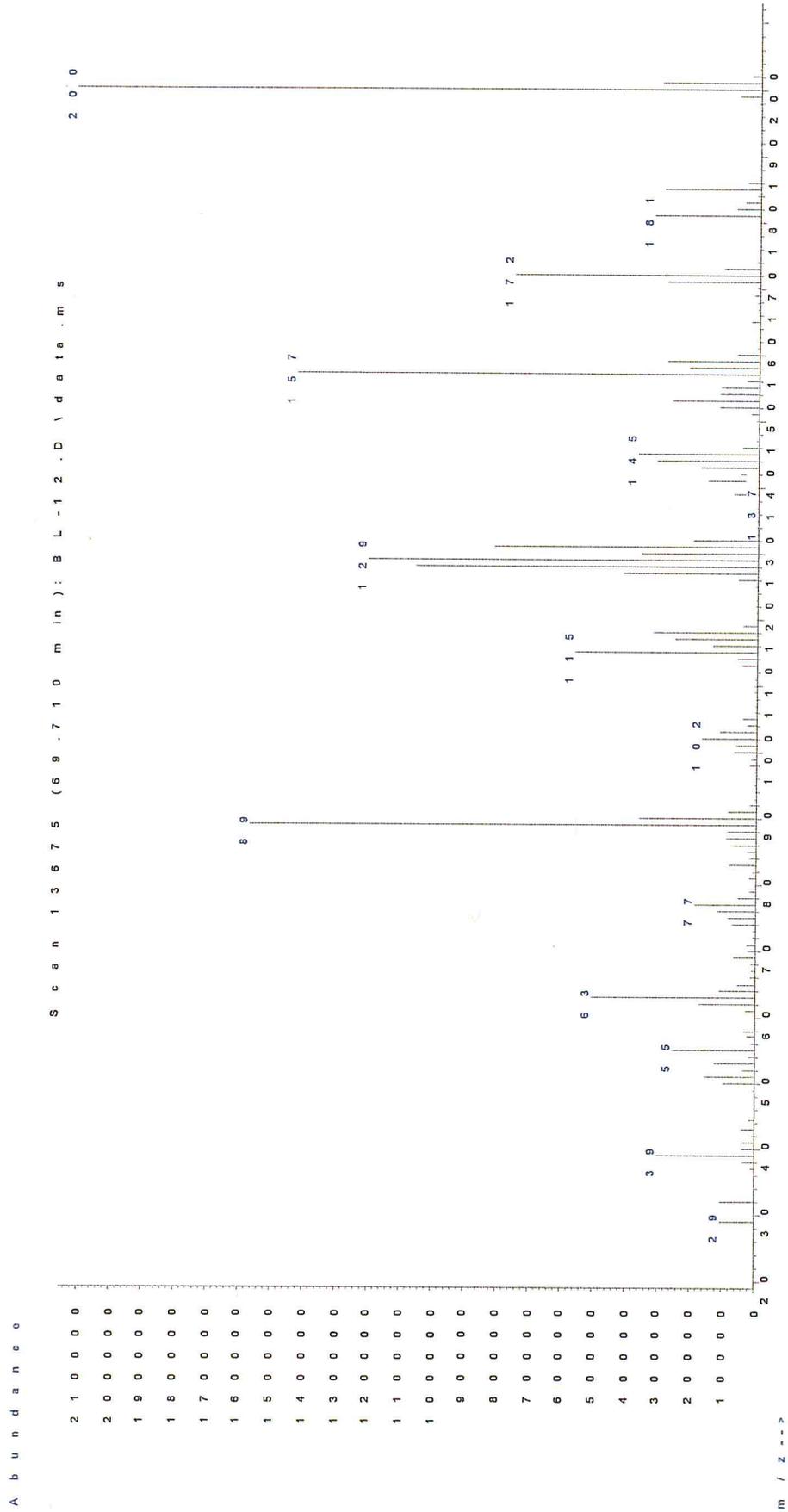
$V_1$  : est le volume, ml, de la solution de HCl utilisé pour la détermination ;

$m$  : est la masse, en grammes, de l'huile essentielle ;

IA : est la valeur de l'indice d'acide déterminé selon la norme NF T 75-103

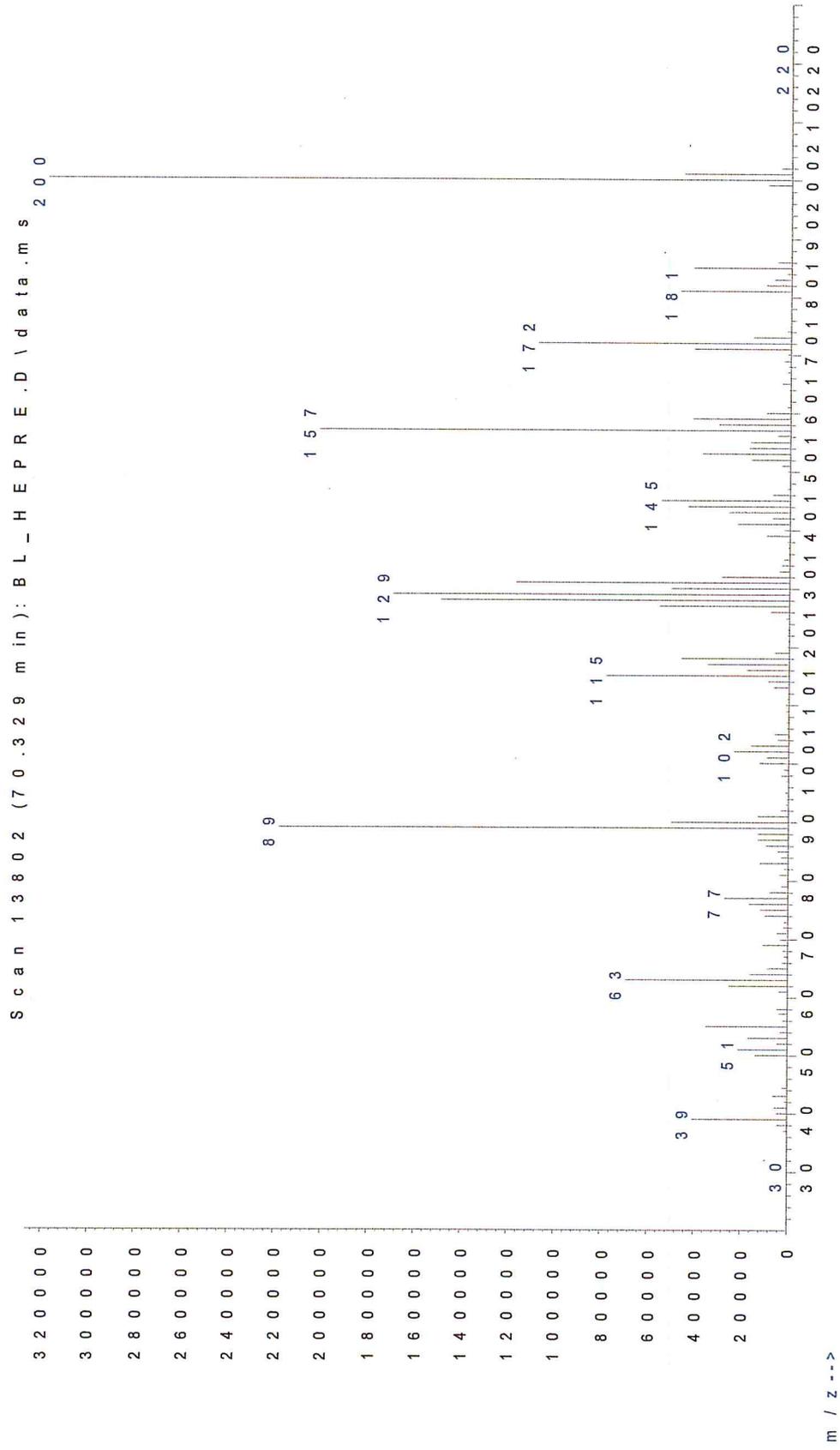
# Annex C

## Les Spectres de masse



Spectre de masse de l'huile essentielle d'*Artemisia campestris*.L

Abundance



Spectre de masse de l'huile essentielle après traitement enzymatique

## ANNEX B

**Tableau :** influence de la masse de la matière végétale sur le rendement en huile essentielle

Masse végétale (mg)	Rendement(R%)
30	0,59
40	0,78
50	0,8
60	0,82
70	0,56
80	0,52
90	0,42

**Tableau :** Evolution du rendement en HE selon la durée d'extraction (cinétique)

Temps (min)	Rendement (R%)
0	0
30	0
60	0,2
90	0,39
120	0,51
150	0,66
180	0,77
210	0,81
240	0,81
270	0,80

**Tableau :** variation du rendement d'extrait en fonction du temps d'extraction

T (H)	Essais 1
1	4,14
2	7,14
3	8,75
4	8,78
5	8,80

**Tableau** : variation du rendement en fonction du nombre d'extraction

nbr	Essais 1
1	7,24
2	11,61
3	15,75
4	20,07
5	20,24



**Tableau** : variation du rendement en fonction du rapport ml/g

V /M	Essais 1
4	7,18
4,5	7,88
5	9,98
5,5	10,77
6	10,88
6,5	10,99
7	11,05