N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le Grade de

MASTER

Filière : Chimie
Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par
M[lle] Amitouche Dahbia.
M[lle] Chemloul Lamia.

Thème

Contribution à l'évaluation de l'huile essentielle et des extraits d'*Artemisia herba-alba* algérienne

Soutenue publiquement le : 15/ 07 / 2012, devant le jury composé de :

M[me] N. Kichou	Maître de Conférences (UMMTO)	Présidente.
M[me] N. Dahmani	Maître de Conférences (UMMTO)	Promotrice.
M[r] M. Mamou	Maître assistant (UMMTO)	Examinateur.
M[me] K. Ighilahriz	Maître assistante (UMMTO)	Examinatrice.

Remerciements

Nos *remerciements vont tout d'abord au* ***bon DIEU****, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la volonté de mieux mener ce travail faisant l'objet du mémoire de fin d'études.*

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie pharmaceutique de la Faculté de Chimie de l'Université des Sciences et de la Technologie MOULOUD MAMMERIE (UMMTO), Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnel de la Faculté de Chimie de l'Université des Sciences et de la Technologie HAOUARI BOUMADIENNE (USTHB), sous la direction de Mme N. DAHMANI. Maitre de conférences à UMMTO et Maître de recherche au Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle de la Faculté de Chimie de l'USTHB. Qu'il me soit permis de lui témoigner notre profonde gratitude pour nous avoir suivis et dirigés durant notre projet de fin d'études. Qu'elle trouve ici l'expression de nos plus vifs remerciements pour les conseils et les éclaircissements qui nous ont été très précieux et pour son aide indispensable

Nous remercions également Mr le Professeur A. BALIOUAMEUR. Directeur du laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnel de la Faculté de Chimie de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene et Mr le Professeur B.MEKLATI. Directeur du Centre de Recherche en Analyse Physico-chimique pour nous avoir autorisés de réaliser nos extractions et nos analyse chromatographique et spectroscopique au sein du Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnel

Je *suis très sensible à l'honneur que me fait Mme N. Kichou Maître de Conférences, à l'UMMTO, en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

J'exprime mes profonds remerciements à M^r^ M. Mamou Maître de Conférences et Mme K. Ighilahriz Maître assistante à l'Université MOULOUD MAMMERIE, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de venir participer à ce jury.

Je ne saurai oublier l'équipe d'ingénieur et de chercheur du CRAPC d'avoir acceptés d'effectuer toute les analyses chromatographiques et spectrométriques.

Nos remerciements vont également à tous nos Enseignants de graduation qui ont participé à notre formation, Qu'ils veuillent bien trouver ici l'expression de notre gratitude.

Nous remercions aussi toute l'équipe de ce laboratoire. Sans oublier de remercier nos familles. Nos remercions tous ceux qui nous ont aidés de prés ou de loin et les étudiants de chimie pharmaceutique.

Dédicaces

Je dédie ce travail

- A mes très chers parents
- A mes chers frères Ahmed, Ahcene, Hocine, Momoh.
- A mes chères sœurs Fatiha, Fadila, Mbarka, Linda, Sabrina.
- A mes très chers neveux : Liza, Kenza, Ania, Mohamad, Anaisse, Aghilasse, Sélssabil.
- A tous mes beaux frères: Saide, Kalid, Hamide, Rabah.
- A mon binôme et à tous mes amis.

Dahbia

Je dédie ce mémoire

- A mes très chers parents pour leurs dévouements, leurs amours, leurs sacrifices et leurs encouragements. Que ce travail soit, pour eux, un faible témoignage de ma profonde affection et tendresse.

- A mes frères : Massinissa, Farid et Mohamed Amine.

- A ma sœur Naima.

- A ma cousine Drifa, et chère amie Fatiha, mes tantes, mes oncles et leurs familles.

- A tous mes amis et tous ceux qui me sont chers.

Lamia

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Liste des abréviations

INTRODUCTION GENERALE…… 1

CHAPITRE I : GENERALITES

I.GENERALITES SUR L'ARMOISE BLANCHE ……. 3
I.1. Description botanique…… 3
I.2. Classification botanique…… 3
I.3. Répartition géographique…….. 4
I.4. Domaines d'utilisations...……..... 4
II.LES PLANTES MEDICINALES…….. 5
II.1. Les huiles essentielles.……. …….. 5
II.1.1. Localisation des huiles essentielles ……. 6
II.1.2. Compositions chimiques ……..... 7
II.1.3. Les procédés d'extraction ……. 7
II.2. Les polyphénols ……...…… 9
II.2.1. Les Flavonoïdes …… …….. 10
II.2.2 .Structure chimique des flavonoïdes…….. 10
II.2.3. Localisation et distribution des flavonoïdes ……. 13
II.2.4. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes ……. 14
III. ACTIVITES BIOLOGIQUES …..... 15
III.1. Activités antioxydantes ……. 15
III.1.1. Le test DPPH …….. … 16
III.1.2. Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)…….. 17
III.1.3. Le test TEAC/ ABTS.$^{+}$ Decolorization Assay ……..... 18
IV. METHODES D'ANALYSE… …… 18
IV.1. Méthodes chromatographiques……... 18

IV.1.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)…….. 19
IV.1.1.1. Principe de fonctionnement……..... 19

IV.1.1.2. Appareillage .....…… 19
IV.1.2. Chromatographie liquide à haute performance ……..... 21
IV.1.2.1. Principe de fonctionnement ….……..... 21
IV.1.2.2. Appareillage……. 22
IV.1.2.3. Les grandeurs de rétention ……..... 23
IV.1.3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) …… 24
IV.1.3.1. Principe ……. 24
IV.3. Spectrométrie d'absorption UV-visible ……. 24
IV.3.1. Principe…… 25
IV.3.2. Appareillage …… 26
V. TRAVEAUX ANTERIEURS SUR L'*ARTEMISIA HERBA-ALBA*…..…… 27

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. MATERIEL VEGETAL…… 29
I.1. Echantillonnage ……... 29
I.2. Détermination de taux d'humidité (teneur en eau) 30
I.3. Détermination de la vitesse de séchage ……..... 31
II. EXTRACTION DES HUILES ESSENTILLES ……... 31
II.1. Méthode d'extraction …….. 31
II.2. La composition chimique de l'huile essentielle …….. 32
II.2.1. Chromatographie en phase gazeuse ……. 32
II.2.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse..... 33
II.2.3. Identification des composés ……. 33
III. EXTRACTION DES POLYPHENOLS ……..... 34
III.1. Préparation des extraits ……. 34
III.1.1. Appareillage ……... 34
III.1.2. Modes opératoires …….. 34
III.1.2.1. Macération ……... 34

III.1.3. Intérêts des solvants utilisés ……. 36
III.2. Identification de la composition des extraits par HPLC …… 37

III.3. Chromatographie liquide: On-line HPLC-DPPH ……. 38
IV. DETERMINATION DU RENDEMENT D'EXTRACTION ……. 38
V. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES ESSENCES …….. 38
V.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante …… 39
V.2. Préparation de la solution alcoolique de DPPH ……... 39
V.3. Protocole expérimental …… 39

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. CINETIQUE DE SECHAGE …… 41
I.1. Détermination de taux d'humidité (teneur en eau)…….. 42
I.2. Détermination de la vitesse de séchage…… 42
II. LES HUILES ESSENTILLES……. 43
II.1. Détermination du rendement d'extraction……. 43
II.2. Analyse de l'huile d'*Artemisia herba alba* par GC et GC/MS…… 44
III. LES POLYPHENOLS…… … 50
III.1. Les résultats d'extraction…….. 50
III.2. Analyse par HPLC……. 51
IV. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE……. 55

CONCLUSION ……..... 60
Bibliographie
Annexes
Résumé

Liste des abréviations

ABREVIATIONS

A : artemisia.

AAPH: 2,2 '- azobis (2 - methylpropionamidine) Dichlorhydrate.

ABTS: 2,2'-azobis (3-éthylique benzothiazoline-6-acide sulfonique).

AcOH : acide acétique.

BHA: Hydroxyanisol butylé.

BHT: Hydroxytoluène butylé.

CPG: Chromatographie en phase gazeuse.

CG/SM: Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

DCE: Détecteur à capture d'électron.

DCT: Détecteur à conductibilité thermique.

DIF: Détecteur à ionisation de flamme.

DNP: Détecteur à azote phosphore.

DPPH: (2, 2-diphenyl-1– picrylhydrazyl).

E1: Extrait d'éthanol.

E2: Extrait de l'acétate d'éthyle.

E3: Extrait de n-butanol.

E*1: Extrait d'éther de pétrole.

E*2: Extrait de n-butanol-acide.

FID: détecteur à ionisation de flamme.

FRAP: Puissance antioxydante réductrice ferrique.

HE: Huile essentielle.

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance.

IC50: Concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres

LAOF: Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle

MeOH : méthanol.

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity.

TEAC: Trolox Equivalent Antioxydant Capacity.

UV: Spectroscopie ultraviolet.

%CR: Pourcentage de capture du radical DPPH.

INTRODUCTION

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine de nos grands parents, cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales et les remèdes qu'on pouvait en tirer ne furent jamais totalement abandonnés et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante une tradition thérapeutique connue depuis nos ancêtres.

Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales, trouvent des applications dans divers domaines tels que la médecine, la pharmacie, la cosmétologie (parfumerie, savonnerie…) et l'agriculture. L'évaluation de leurs propriétés phytothérapeutiques notamment comme antioxydantes et antimicrobiennes, demeure une tâche de plus en plus recherchée (**Nostro et al; 2002**).

Ces produits naturels se présentent souvent sous forme d'un mélange complexe constitué de plusieurs dizaines de composés en proportions variables. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé.

Les flavonoïdes sont des pigments naturels répandus dans tout le règne végétal où ils interviennent comme filtre UV et comme agent de protection contre les organismes pathogènes. Ils sont apportés au niveau de l'organisme grâce à la consommation des fruits, des légumes, des céréales et de boissons (**Bruneton ; 2008**, **Chebil ; 2006**).

L'Algérie recèle d'importantes potentialités en matière de plantes aromatiques et médicinales et ce en raison de la diversité de son climat et de la nature de ses sols. Parmi les plantes aromatiques douées de propriétés curatives intéressantes qui occupent une grande place en Algérie, on peut citer, le Romarin (Rosmarinus officinalis L), la Lavande (Lavandula spica), l'Origan commun (Origanum vulgare), l'Anis vert (Pimpinelle anisum) et l'Armoise blanche (*Artémisia herba-alba*).

La valorisation de ces produits, quel que soit leur débouché, requiert en général une étape de caractérisation qui inclut l'analyse de leur composition chimique.

Ainsi, dans le cadre de la connaissance et la valorisation des produits naturels Algériens principalement d'origine végétale, nous nous sommes intéressées à l'extraction des flavonoïdes à partir d'une plante médicinale : *Artémisia herba-alba*.

L'Artemisia *herba alba* (Armoise blanche ou Chih) qui pousse à l'état spontané dans la steppe Algérienne et au Sahara. Elle est fréquemment employée par la population contre de nombreuses pathologies telles que les aménorrhées, les syndromes neurologiques, les troubles hépatiques, les troubles gastriques et certains empoisonnements (**Valnet, 1984).**

Dans la première partie de ce travail nous allons nous intéressé à l'extraction de la partie volatile (l'huile essentielle) de la plante et à sa composition chimique, nous passerons en revu les méthodes analytiques utiliser pour l'identification.

La seconde partie de ce travail traite de l'extraction, de l'identification et de l'analyse des extraits des polyphénols d'*A. herba-alba* en utilisant des étalons purs et l'analyse on line-HPLC-DPPH.

Cette étude va être complétée par des essais d'activité antioxydante évaluée sur l'huile essentielle et les différents extraits par le pouvoir réducteur et l'inhibition du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

Chapitre I

Généralités

I. GENERALITES SUR L'ARMOISE BLANCHE

I.1. Description botanique

L'Armoise blanche est une plante ligneuse se présentant sous forme de buissons blancs laineux très ramifies de 30 à 80 cm de hauteur. Les feuilles sont courtes, étroites et espacées. Les capitules ovoïdes comportent 3 à 8 fleurs jaunâtres (Figure I.1). Le fruit est un akène indéhiscent ne contenant qu'une seule graine**.** Les racines sont très épaisses, laineuses, très enfoncées et tiennent solidement au sol (**Khafagy; 1971**).

La croissance végétative de l'*Artemisia herba-alba Asso* à lieu à l'automne, la floraison commence en Juin et se développe essentiellement en fin d'été. L'armoise blanche se développe dans les zones bioclimatiques qui vont de la partie supérieure semi-arides à la partie inferieur Subsaharienne.

Figure I.1. *Artemisia herba-alba*

I.2. Classification botanique

- **Règne :** végétale
- **Embranchement:** Spermatophyte
- **Classe :** Dicotylédones
- **Ordre :** Aristolochiales
- **Famille :** Astéracée
- **Genre :** Artemisia
- **Espèce :** Artemisia herba-alba (Asso) (**Ghrabi et al; 2008**).

I.3. Répartition géographique

L'Armoise blanche connu en Algérie sous le nom de ‹ Chih › est une plante spontanée vivace et hermaphrodite. On la rencontre dans la steppe marocaine, dans les iles Canaries et en Amérique du Sud (**Trabut; 1988**). C'est une espèce méditerranéenne et Sahara-Indienne, elle est très commune en Afrique du Nord et au Moyen Orient.

En Algérie elle affectionne les climats secs et chauds, elle forme des peuplements importants dans les zones désertiques. Très abondante sur les hauts plateaux mais rare au Sahara septentrional (**Benmansour; 2001**).

I.4. Domaines d'utilisations

L'Armoise blanche est une plante médicinale et surtout aromatique, largement exploitée pour son huile essentielle. Son pouvoir antibactérien, antiseptique et antifongique lui a conféré une application dans de nombreux domaines : en thérapeutique, en cosmétologie et en industrie agro-alimentaire (**Benjilali; 1984**).

- **Domaine thérapeutique**

L'Armoise est utilisée en médecine traditionnelle depuis l'antiquité. Très recherchée pour ses propriétés pharmacologiques, elle est utilisée pour traiter les maux les plus divers : ulcères, dyspepsies, troubles hépatiques, aphtes, mycoses, contre les piqûres d'insectes et de scorpions et toutes les formes d'empoisonnements **(Bendjilali; 1980**).

En chine, elle est utilisée pour régulariser le cycle menstruel et stopper leurs douleurs. Ses propriétés antispasmodiques la recommandent dans les syndromes neurologiques et psychiatriques : (hypotension, syncope, épilepsie), dans les affections du foie et de la vésicule biliaire (**Benjilali; 1984, Benmansour; 2001**).

Toutefois, elle doit être utilisée avec beaucoup de prudence et à des doses faibles car des doses trop élevées peuvent causer des intoxications très graves (caractérisées par une hépato-néphrite à prédominance rénale accompagnée de phénomènes convulsifs) causés par certains composés cétoniques, l'α-thujone, la β-thujone et le Camphre (**Benjilali; 1984, Dahmani ; 2004**).

- **Domaine alimentaire**

Par ses caractères organoleptiques l'Armoise blanche peut être utilisée pour aromatiser certaines boissons comme le café dans le sud des pays du Maghreb. Son emploi reste cependant limité à cause de la toxicité de l'α-thujone et de la β-thujone contenus dans les

huiles essentielles. Le code des bons usages pour l'industrie des arômes préconise que le taux de la thujone ne doit pas dépasser 5 mg/kg dans les aliments et les boissons (**Benjilali; 1984**).

- **Domaine de la cosmétologie**

Exploitée industriellement, les huiles essentielles de l'*Artémisia herba alba* sont utilisées en parfumerie et en cosmétologie à cause de leur pouvoir antiseptique, et aromatique, elles servent à augmenter la durée de conservation des produits cosmétiques tout en leur assurant une odeur agréable (**Benjilali; 1984, Dahmani; 2004**).

II. Les plantes médicinales

Les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et composés naturels bioactifs qui contiennent des principes utilisables en thérapeutique. La composition chimique des plantes est complexe et est constituée de deux fractions :

La fraction non volatile de la plante composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante.

La fraction volatile présente dans différents organes de la plante selon la famille appelée essence ou huile essentielle.

II.1. Les huiles essentielles

Le terme "huile essentielle" a été inventé au 16ième siècle par le médecin suisse Parascelsus von Hohenheim afin de désigner le composé actif d'un remède naturel. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums (**El kalamouni; 2010**).

Les huiles essentielles sont des substances huileuses, volatiles et odorantes qui sont sécrétées par les plantes aromatiques. Elles sont obtenues soit à partir des matières premières naturelles par distillation à l'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques (**Afnor; 1986**).

- ✓ **Concrète**

Extrait à odeur caractéristique obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, par extraction au moyen d'un solvant non aqueux à chaud ou à froid**.** En outre, elle se présente

sous un aspect pâteux et coloré. Elle est composée de plusieurs sous-produits, dont l'absolue, les cires, les tannins et les colorants (**Naves; 1974**).

- ✓ **Pommade florale**

Corps gras parfumé obtenu à partir de fleurs, soit par "enfleurage à froid" (diffusion des composés odorants des fleurs dans le corps gras), soit par "enfleurage à chaud" (digestion ou immersion des fleurs dans le corps gras fondu) (**Naves; 1974**).

- ✓ **Absolue**

Produit ayant une odeur caractéristique, obtenu à partir d'une concrète, d'une pommade florale ou d'un rétinoïde par extraction à l'éthanol à température ambiante.

Note : la solution éthanolique est généralement refroidie à basse température (8 à 15°C) durant quelques heures et filtrée dans le but d'éliminer les cires. Le filtrat, dépouillé de l'alcool par évaporation sous vide, n'est autre que l'absolue de la concrète (**Naves; 1974**).

- ✓ **Cires**

Elles sont composées de substances saponifiables (acides gras à longue chaines) et insaponifiables (hydrocarbures à nombre impair de carbones rarement insaturées). Elles représentent la fraction lourde de la concrète.

Les cires sont utilisées dans la savonnerie en raison de leur puissante note odorante et leur pouvoir conservateur (**Grandery; 1974**).

II.1.1. Localisation des huiles essentielles

En principe, toutes les parties d'une plante contiennent des huiles essentielles, mais elles sont souvent majoritairement dans l'une d'elles. La teneur en huile essentielle des plantes est faible de l'ordre de 1 à 3 % à l'exception du clou de girofle de (14 à 19 %), du macis (10 à 13 %), de la noix de muscade (8 à 9 %), de la cardamone (4 à 10 %).

Dans beaucoup de plantes aromatiques, les huiles essentielles sont localisées dans les poiles glandulaires qui se développent à la surfaces des feuilles et autres organes des plantes. Ces poiles pelletés contiennent une grande partie des huiles et sont désormais appelés "glandes"(**Werker; 1985**).

L'*Artemisia herba-alba* est une plante médicinale contenant des sites exogènes (glandes, cellules épidermiques) et des sites endogènes (poches ou canaux). Les huiles essentielles sont présentes dans tous les organes à l'exception des racines, elles se séparent synérèse, sous forme de petites gouttelettes qui confluent ensuite en plages plus en moins

étendues. Elles sont ensuite accumulées sous la cuticule, dans les glandes sécrétrices situées au niveau des deux épidermes, de la feuille et sur les tiges pendant la période de l'épanouissement des feuilles. Ainsi, la cuticule joue un rôle important dans le stockage des huiles essentielles (**Perrin; 1985**).

II.1.2. Compositions chimiques

La composition des huiles essentielles est très complexe, elles peuvent renfermer jusqu'à plusieurs centaines de molécules chimiques différentes. Les plus fréquemment rencontrés sont les alcools (phénols et sesquiterpénols), les cétones, les aldéhydes terpéniques, les esters, les éthers oxydes, les terpènes et les sesquiterpènes.

Une huile essentielle est très fluctuante dans sa composition, car peuvent intervenir un grand nombre de paramètres, d'ordre naturel ayant une origine intrinsèque (génétique, localisation, maturité…) ou extrinsèque (sol, climat…..) et d'ordre technologique, c'est-à-dire liés au mode d'exploitation du matériel végétal.

La composition d'une huile essentielle varie au sein d'un même genre, mais aussi dans une même espèce (cas de *l'Artemisia herba-alba*). On parle alors de races chimiques ou chémotypes.

Le chémotype indique le composant biochimique majoritaire ou distinctif des huiles essentielles extraites d'une même variété botanique. Cette classification capitale permet de sélectionner les H.E. pour une utilisation plus précise, plus sûre et plus efficace. Nous connaissons par exemple sous la même appellation botanique, deux grandes familles de thyms, subdivisées elles-mêmes grâce à la définition de leurs chémotypes respectifs (**Gildmeister; 1919**).

II.1.3. Procédés d'obtentions des huiles essentielles

En général le choix de la méthode d'extraction dépend de la nature de matériel végétal à traiter (graines, feuilles, ramilles), de la nature des composées à extraire (les flavonoïdes, les huiles essentielles, les tanins), de rendement en l'huile et la fragilité de certains constituants des huiles aux températures élevées (**Hellal; 2011**).

- **L'hydrodistillation**

Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont

condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat (**Franchomme; 1990**).

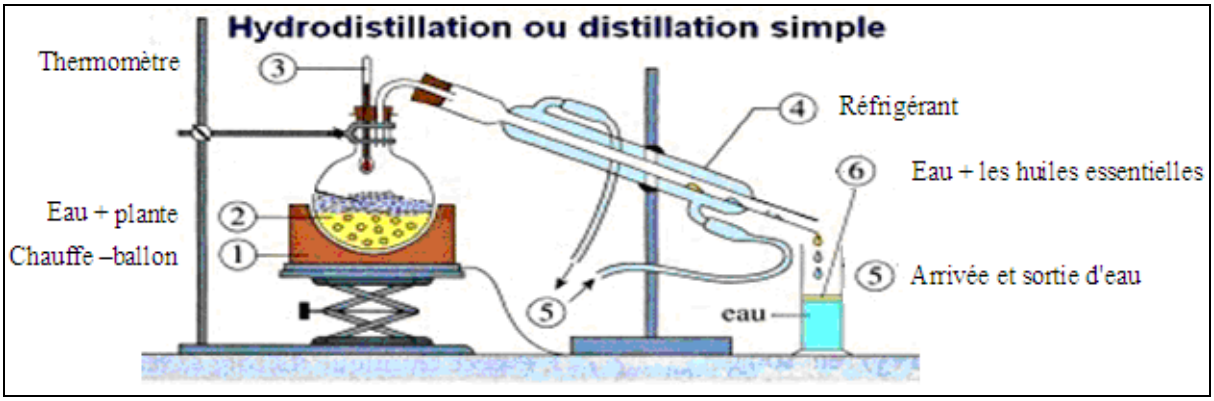


Figure I.2. L'hydrodistillation

- **La distillation par entraînement à la vapeur d'eau**

Le matériel végétal est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau (Figure I.3). La vapeur d'eau traverse le matériel végétal et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques (**Franchomme; 1990**).

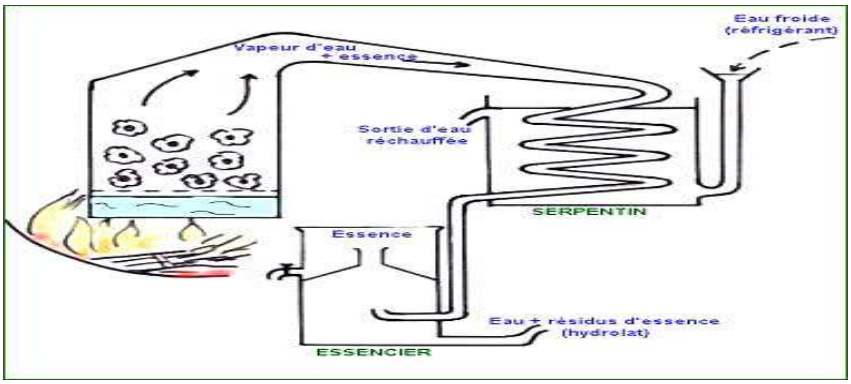


Figure I.3. La distillation par entraînement à la vapeur d'eau

- **Extraction par micro-ondes**

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes (Figure I.4). Dans une enceinte fermée dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont

ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable (**Mengel; 1993**).

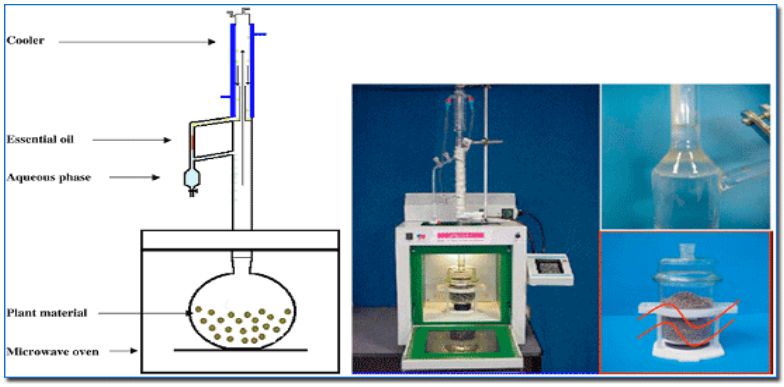


Figure I.4. Extraction par micro-ondes

- **Extraction par solvant**

Elle consiste à épuiser la matière végétale de ses constituants odorants au moyen d'un solvant, elle est ensuite dépouillée du solvant par évaporation sous vide à 40°C afin d'éviter la dégradation thermique des molécules odorantes. Cette extraction conduit à l'obtention d'essences, concrètes ou oléorésines, de rétinoïdes et d'absolues**.**

II.2. Les polyphénols

Les composés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ce sont des métabolites secondaires des plantes. Ils possèdent dans leur squelette, un ou plusieurs cycles aromatiques portants un ou plusieurs groupes hydroxyles ainsi que des groupes fonctionnels (ester, méthyle ester, glycoside…) **(Bruneton ; 1999**). Ils participent à la défense des plantes contres les agressions environnementales (**Gee et Johnson ; 2001**) et les attaques microbiennes (**Bennick ; 2002**). Généralement, ils sont subdivisés en :

- ✓ flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des polyphénols ;
- ✓ tanins qui sont des produits de la polymérisation des flavonoïdes ;
- ✓ acides phénoliques ;
- ✓ coumarines ;
- ✓ lignanes et d'autres classes existent en nombres considérables.

Ces dernières années, les recherches sur les composés phénoliques se sont accentuées en raison de leurs activités anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, anti oxydantes et même anticancéreuses (Tableau. I.1) (**Montoro et al; 2005**).

Tableau. I.1 : activités biologiques des différentes classes des polyphénols (**Montoro et al ; 2005**).

Polyphénols	**Activités**	**Auteurs**
Acides phénols (cinnamiques et benzoïques).	Antibactérienne Antifongique Anti oxydante	Didry et al ; 1982 Raven et al ; 1984 Hayase et Kato, 1984
Coumarines	Protectrice Antioedémateuse	Mabry et Ulubelen, 1980
Flavonoïdes	Anti tumorale Anti carcinogène Anti-inflammatoires Anti oxydante	Stavric et Matula ; 1992 Das et al ; 1994 Bidet et al ; 1987 Aruoma et al ; 1995
Tanins galliques et catéchiques	Anti oxydante	Okuda et al ; 1983 Okamura et al ; 1993

II.2.1. Les Flavonoïdes

Le terme flavonoïde provenant du latin "flavus", signifiant "jaune", désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ce groupe comprend comme son nom l'indique des composés jaunes mais aussi d'autres couleurs ou incolores. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules. En effet plus de 6500 structures ont été identifiées (**Bruneton ; 1999, Harborne et Williams ; 2000**). Dans les fruits et légumes, les flavonoïdes constituent par le nombre de composés et les quantités présentes, la principale classe de polyphénols antioxydants et capteurs de radicaux libres. Ils sont particulièrement abondants dans les aliments et boissons comme le raisin et les préparations dérivées, le thé et le cacao, dont la consommation est réputée avoir des effets protecteurs contre différentes affections chroniques (maladies cardiovasculaires, diabète de type 2, cancers, maladies neurodégénératives). Ils entrent en outre dans la composition de médicaments et d'adjuvants alimentaires (**Liu; 2004 et Middleton ; 2000**).

II.2.2. Structure chimique des flavonoïdes

La structure chimique des flavonoides est basée principalement sur un squelette de quinze (15) atomes de carbones : le 2-phenyl-benzo [α] pyrane, ou le noyau flavane, constitué de

deux cycles benzéniques (A et B) reliés par un hétérocycle, le noyau pyrane (C), ce qui donne aux flavonoïdes, un faible poids moléculaire (**Heller ; 1993, Brown; 1980**).

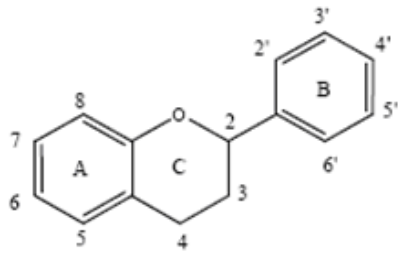


Figure I.5. Le squelette de noyau flavane

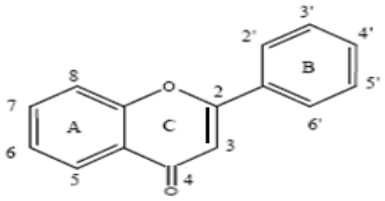
La variation du degré d'oxydation et la différence de substituant de l'hétérocycle C peuvent subdiviser les flavonoïdes en familles bien distinctes :

- **Flavones et flavonols**

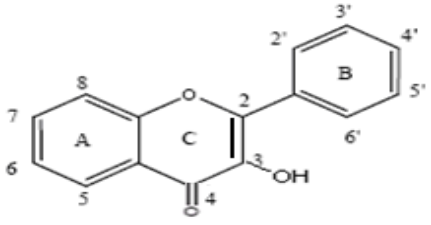
Les flavones sont caractérisées par la présence d'une double liaison entre les carbones 2 et 3 du squelette flavane, et un groupement carbonyle en position 4 (4-oxo). Le cycle aromatique B est attaché à la position 2. Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement hydroxyle en position C3 (**Heller; 1993)**.

Les principaux flavones sont l'apigénine et la lutéoline. Elles ont dans la majorité des cas la forme de glycosides.

Les flavonols sont beaucoup plus abondants dans le règne végétal que les flavones et leurs concentrations sont plus élevées. Les principaux sont la quercétine, kaempférol et myricétine.



	5	6	7	4'
Apigénine	OH	-	OH	OH
Lutéoline	OH	-	OH	-



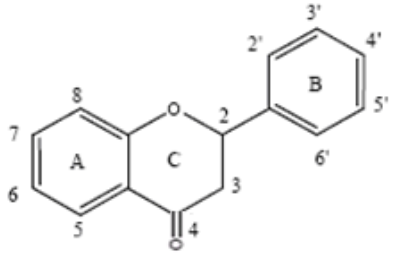
	5	7	3 '	4'	5'
Quercétine	OH	OH	OH	OH	-
Kaempférol	OH	OH	-	OH	-
Myrecétine	OH	OH	OH	OH	OH

Figure I.6. Structure de base des flavones et flavonols

- **Flavanones**

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie. Elles existent sous formes libres ou sous formes glycosylées. Sous forme libre, les carbones en position 5 et 7 sur le cycle A peuvent être hydroxylées ou méthoxylées. Le cycle B peut aussi être substitué en position 3', 4', 5' et 6'.

La principale flavanone est : La naringénine.

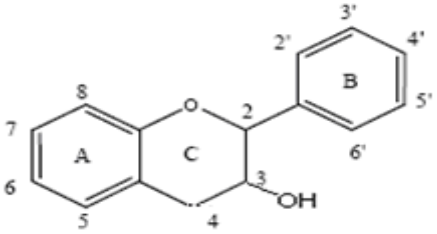


	5	7	4'
Naringénine	OH	OH	OH

Figure I.7. Structure de base des flavanones

- **Flavanols**

Ils se distinguent des flavanones par l'absence à la position 4 d'un atome d'oxygène relié au carbone par une double liaison la plus rencontré est la catéchine.



	5	7	3'	4'
Catéchine	OH	OH	OH	OH

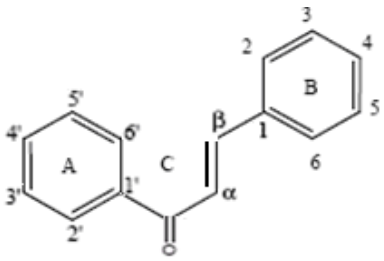
Figure I.8. Structure de base des flavanol

- **Isoflavones**

Les isoflavones constituent une branche spécifique des flavonoïdes, qui diffèrent des autres par la position du noyau phénolique B (en position 3). Jusqu'à présent, plus de 1600 iso flavonoïdes aglycones et glycosides ont été identifiés, dont la grande majorité se trouvent chez la famille des légumineuses (**Veitch ; 2007**).

- **Chalcones**

Les chalcones, ou 1,3-diaryl-2-propen-1-one, représentent une des classes majeures des produits naturels appartenant à la famille des flavonoides. Chimiquement, ils sont dépourvus du cycle C central et constituées par deux unités aromatiques A et B, reliées par une chaîne tricarbonée cétonique α, β insaturée. Les cycles A et B sont équivalents aux cycles A et B des autres flavonoïdes mais leurs numérotations sont inversées. Les plus abondants sont : butéine et phlorétine**.**

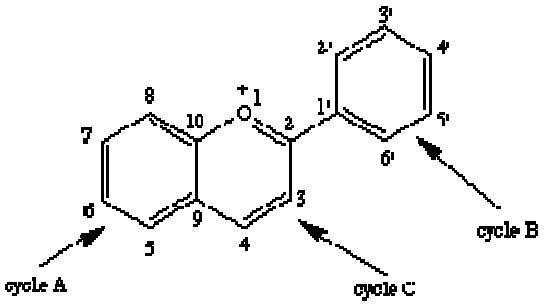


	3	4	2'	4'	6'
Buteine	OH	OH	OH	OH	H
Phlpretine	H	OH	OH	OH	OH

Figure I.9. Structure de base des chalcones

- **Anthocyanines et anthocyanidines**

Les anthocyanines désignent un vaste groupe des flavonoides, se sont les glucosides des polyhydroxy et polymétoxy des dérivés de 2-phenylbenzopyrylium ou les sels de flavylium.



	5	7	3'	4'	5'
Pelargonidine	OH	OH	H	OH	H
Cyanidine	OH	OH	OH	OH	H
Péonidine	OH	OH	OCH_3	OH	H

Figure I.10. Structure du cation flavylium ou 2-phényl-1-benzopyrilium

Les différences de structures entre les anthocyanines sont reliées au nombre de groupes hydroxyles, la nature et le nombre de sucres attachés à la molécule, la position de cette liaison, la nature et le nombre des acides aliphatiques ou aromatiques attachés au sucre dans la molécule (**Mazza ; 1993, Kong ; 2003**). Les plus importants sont : pélargonidine, cyanidine et péonidine**.**

II.2.3. Localisation et distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (**Hutzler; 1998**). Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (**Piquemal; 2008**), la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (**Boudet; 2000**).

Les flavonoïdes sont largement abondants dans: les parties des végétaux racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (**Verhoeyen; 2002**), ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle) (**Urquiaga et Leighton; 2000**). D'autres travaux ont reportés la présence de ces composés dans le miel et la propolis, on en trouve également en quantité dans de nombreuses plantes médicinales. Leurs répartitions dépendent de leur degré d'accessibilité à la lumière. Ainsi, les flavonols sont presque exclusivement présents dans les légumes à feuilles et les fruits, à l'état glycosylé. Cependant, certains flavonols ont été identifiés sous forme de traces dans les parties de la plante au-dessous de la surface du sol (**Harborne; 1986, Hertog; 1992, Crozier; 1997**).

.

II.2.4. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent une partie intégrale des composés importants pour la nutrition et la santé humaine. Ainsi, la consommation quotidienne moyenne recommandée des flavonoïdes est environ 1g pour chaque personne (**Pengelly; 2004**). Ces donnés permettent d'établir le lien entre fruits, et légumes, et effet bénéfique sur la santé, en effet toutes les études épidémiologiques, ont suggérées qu'une alimentation riche en flavonoïdes, est plus particulièrement les flavones, peut réduire le risque de nombreux cancers (cancer de poumon et de colon), les maladies coronaires, et les inflammations chroniques.

De nos jours, les propriétés thérapeutiques attribuées aux flavonoïdes sont largement étudiées, ils sont notamment : Antioxydants, anti-carcinogéniques, anti- oestrogéniques (**Middleton ;**

2000, Hertog ; 1992, Di Carlo; 1999), inhibiteurs d'enzyme, antimicrobiens (**Harborne ; 1999**), antiallergiques (**Middleton ; 2000**), cytotoxiques et anti-tumoraux (**Crozier ; 1997**).

III. ACTIVITES BIOLOGIQUES

L'un des facteurs importants du vieillissement est une diminution progressive de la capacité des cellules à lutter contre les phénomènes d'oxydation. Il existe des défenses physiologiques naturelles contre les agressions des radicaux libres et une part significative de ces défenses provient de la nourriture.

L'oxydation des lipides est une cause majeure de la détérioration de la qualité des aliments contenant des matières grasses, d'où l'utilisation devenue de plus en plus fréquente des antioxydants. Les antioxydants synthétiques les plus utilisés sont l'hydroxyanisol butylé (BHA) et l'hydroxytoluène butylé (BHT), ces deux composés sont assez volatils et se décomposent rapidement à des températures élevées (**Branen; 1975**) ainsi les préparations d'antioxydants naturels sont vivement recherchées.

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques furent utilisées le plus souvent par les parfumeries. Cependant, durant ces dernières décennies, elles sont devenues sources d'antioxydants naturels et d'agents antimicrobiens (**Bandoniene; 2000**).

Les plantes aromatiques possèdent plusieurs activités biologiques, parmi lesquelles on peut citer les activités suivantes :

* Fongistatique * Insecticide
* Nématicide * Herbicide
* Bactériostatique * Antioxydante

III.1. Activités antioxydantes

Les flavonoïdes forment l'une des plus importantes familles de molécules ayant des activités antioxydantes, une caractéristique associée à la présence dans leur structure des groupes hydroxyles liés à des noyaux aromatiques. La diversité de la nature et la complexité des composés phytochimiques des extraits de plante imposent l'élaboration de plusieurs de méthodes pour évaluer l'activité antioxydante et pour estimer l'efficacité de ces substances. La majorité de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans le milieu réactionnel. Elles peuvent également être basées sur :

- le métal réduisant la puissance (puissance antioxydante réductrice ferrique, FRAP);

- le balayage radical de peroxyl (capacité radicale d'absorbance de l'oxygène, ORAC);
- le balayage radical d'hydroxyle (analyse de desoxyribose);
- le balayage radical organique qui nécessite l'utilisation de l'ABTS (2,2'-azobis (3-éthylique benzothiazoline-6-acide sulfonique) ou DPPH (2,2-diphenyl-1–picrylhydrazyl) comme radicaux libres et exprimé en capacité antioxydante équivalente de Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (TEAC) (**Agrobio ; 2009**).

Ces méthodes sont généralement appliquées soit dans l'analyse de l'alimentation et le système biologique pour évaluer la peroxydation de lipide ainsi que la mesure du degré d'inhibition d'oxydation, soit dans l'analyse des effets antioxydants des extraits végétaux ou produits pharmaceutiques (**Langley-Evans; 2000**).

III.1.1. Le test DPPH

Le DPPH est un radical libre stable, avec une absorption maximale de 515 à 518 nm. La structure de DPPH est indiquée dans la figure ci-dessous:

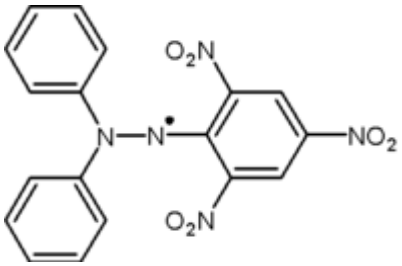


Figure I.11. Structure du 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

La méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH**.** Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH• de coloration violette pour le stabiliser en DPPH de coloration jaune-verte. La mesure de la décroissance de coloration violette au cours du temps permet de déterminer l'IC_{50}, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue. Généralement interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH (IC_{50}), (des comparaisons d'IC50 sont réalisées), le résultat est dépendant de la concentration en DPPH initiale. En ajoutant une référence connue, on pourrait standardiser la méthode, en ramenant par exemple

les résultats à un équivalent Trolox (une molécule de référence, analogue structural hydrosoluble de la vitamine E).

Cette méthode est généralement utilisée pour étudier et mesurer la capacité antioxydante totale des extraits végétaux et alimentaires. Le mécanisme de réaction est illustré dans le diagramme ci-dessous : où AH est l'antioxydant et $R^{\bullet}$ est le radical libre:

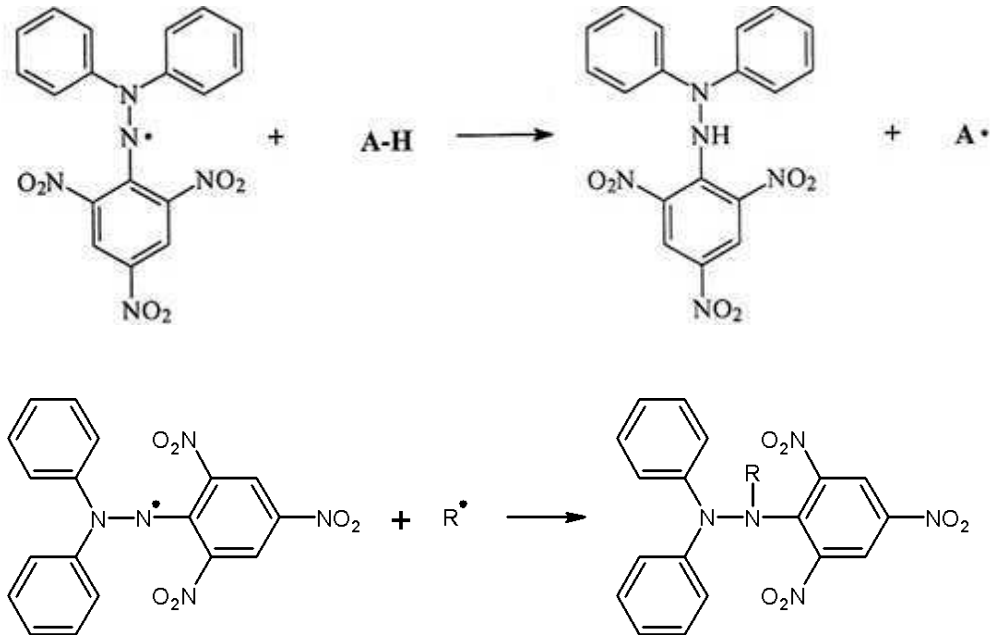


Figure I.12. Mécanisme de réaction.

III.1.2. Le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La méthode est basée sur la décroissance de la fluorescence de la fluorescéine en présence d'un oxydant chimique l'AAPH (un radical peroxyl libre stable). Le produit à tester peut être capable de protéger la fluorescéine et de réduire la vitesse de dégradation de la fluorescence. Il possède alors un pouvoir antioxydant (**Agrobio ; 2007**).

La méthode est réalisée en microplaque dans lesquelles nous mesurons en parallèle, le déclin de la fluorescéine au cours du temps en présence de concentrations croissantes de Trolox, et des échantillons à tester à différentes concentrations. Le but est d'obtenir une réponse comparable à celle de la gamme. On peut ainsi après traitement des données, calculer l'équivalent Trolox.

La méthode faisant intervenir une cinétique, la mesure de la capacité se fait par l'intermédiaire du calcul des aires sous la courbe. C'est la seule méthode qui combine à la fois

le pourcentage d'inhibition de la réaction d'oxydation et le temps de cette inhibition en une seule mesure. Elle donne une mesure globale de la capacité antioxydante. L'avantage majeur du test ORAC est de proposer une mesure standardisée et largement acceptée (**Agrobio ; 2009**).

III.1.3. Le test TEAC/ ABTS.$^{+}$ Decolorization Assay

Le test Trolox Equivalent Antioxydant Capacity (TEAC) est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS**.** $^{+}$de coloration bleu-verte en le transformant en $ABTS^{+}$ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant.

Une comparaison, de la capacité des antioxydants, est faite avec la capacité du Trolox à capturer ABTS**.** $^{+}$. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité et la même concentration que la substance à tester.

Il existe souvent des différences de valeurs entre les méthodes du fait que les sources de radicaux libres soient différentes, et que les antioxydants répondent différemment aux méthodes de mesure. Selon les matrices testées, l'une ou l'autre méthode est applicable. Par exemple pour des extraits végétaux, les trois tests sont applicables. En revanche, pour le plasma sanguin, la méthode ORAC semble plus indiquée du fait que les radicaux peroxyl utilisés dans le test ORAC sont les plus couramment rencontrés dans le corps humain. La valeur en est de fait plus significative (**Agrobio ; 2007**).

IV. METHODES D'ANALYSE

IV.1. Méthodes chromatographiques

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact, l'une stationnaire et l'autre mobile. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure etc) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité). A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange (**Martin; 1941**).

Il existe trois principaux types de chromatographie:

- la chromatographie en phase gazeuse (CPG)
- la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)
- la chromatographie en couche mince (CCM).

IV.1.1. La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La CPG est une méthode de séparation des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décompositions. Elle permet ainsi l'analyse de mélange éventuellement très complexe dont les constituants peuvent différer d'une façon considérable par leur nature et leur volatilité (**Tranchant ; 1982**).

IV.1.1.1. Principe de fonctionnement

Le mélange à séparer (l'ordre de µl) est injecté, à l'entrée d'une colonne grâce à l'injecteur qui est porté à une température supérieure à la température de la volatilisation des solutés à séparer. Les solutés à l'état gazeux sont transportés par le gaz vecteur le long de la colonne où ils se solubilisent dans la phase stationnaire liquide (**Tranchant ; 1982**).

Si la phase stationnaire est bien choisie, ces solutés vont être inégalement retenus, ce phénomène appelé rétention. Les constituants du mélange sortent l'un après l'autre du fait de leur différence de déplacement dans la colonne. Le temps de séjour du soluté dans la colonne est appelé temps de rétention (**Heddar; 1993**).

A la sortie de la colonne, se trouve un détecteur qui émit un signal chaque fois qu'un soluté sort. Le signal produit est proportionnel à la quantité de chaque substance. Ce signal est amplifié, reproduit sur l'enregistreur et évalué à l'aide d'un intégrateur ou d'un ordinateur (**Tranchant ; 1982**).

IV.1.1.2. Appareillage

La chromatographe gazeux (Figure I.13) comporte :

- ✓ **La colonne**

C'est la partie la plus importante du chromatographe car c'est dans la colonne qu'a lieu le processus physico-chimique de séparation, on distingue les colonnes capillaires qui sont de longueur allant jusqu'à 60 m et de faible diamètre de l 'ordre du dixième de millimètre, leur

surface interne est couverte par une couche de 0,1 à 1,5µm d'épaisseur, elle est uniforme le long de la colonne, cette couche appelée phase stationnaire est lieu où s'effectue la séparation des constituants du mélange à analyser grâce au phénomène d'adsorption et aussi à la polarité des solutés (**Heddar; 1993**).

- ✓ **L'injecteur**

Pour pouvoir introduire l'échantillon à analyser dans le chromatographe on utilise une micro seringue d'injection de l'ordre de 1 à 10µl, l'injection se fait dans l'injecteur qui est porté à une haute température ce qui permet l'évaporation instantanée de l'échantillon qui sera transféré dans la colonne grâce à un gaz porteur qui peut être l'hydrogène, l'azote ou l'hélium. La température de l'injection doit être de 20 à 30^0C supérieures à la température d'ébullition du soluté le moins volatil (**Heddar; 1993, Tranchant; 1982**).

- ✓ **Le diviseur d'entrée**

La faible capacité de la colonne capillaire fait qu'on peut injecter dans la colonne que très peu d'échantillon. Dans le cas d'une colonne remplie (phase stationnaire + support) la quantité d'échantillon injectée se situe entre 1 et 10µL. Mais pour une colonne capillaire une telle quantité sature très vite la colonne.

Le rôle du diviseur d'entrée est d'éliminer à l'extérieur la plus grande partie de l'échantillon injecté par une fuite contrôlée alors qu'une faible partie 1/10 à 1/100µL pénètre dans la colonne. Il existe plusieurs types de diviseurs d'entrée. Pour notre travail nous avons utilisé le diviseur d'entrée « split-splitless » (**Tranchant ; 1995**).

- ✓ **Le détecteur**

A pour rôle essentiel de reconnaître un soluté et d'envoyer un signal électrique chaque fois qu'un soluté est séparé. Il est caractérisé par sa sensibilité, on distingue les détecteurs suivants :

- Détecteur à conductibilité thermique (DCT)
- Détecteur à ionisation de flamme (DIF)
- Détecteur à capture d'électron (DCE).
- Détecteur à azote phosphore (DNP).

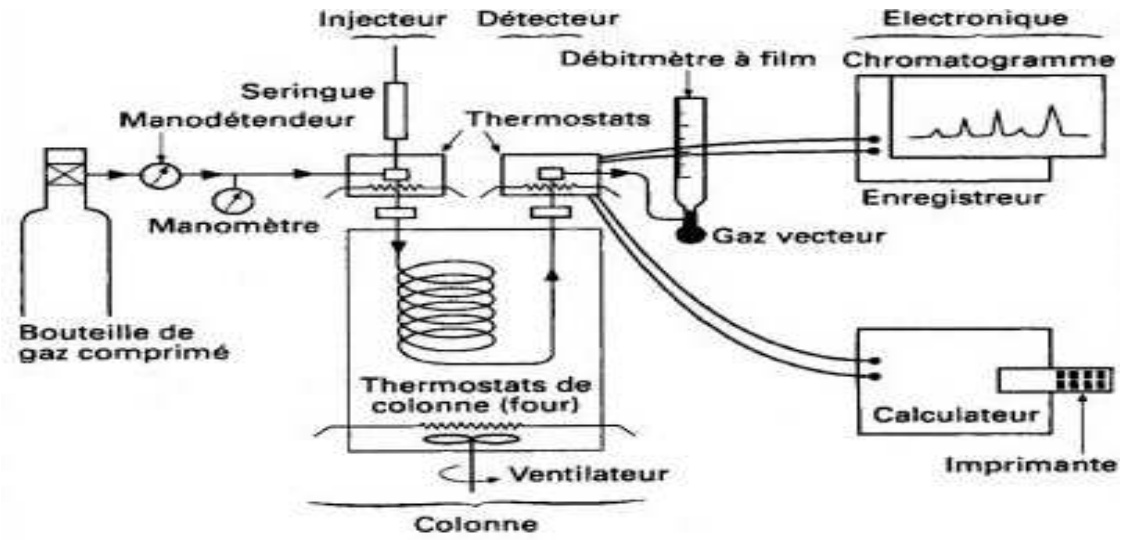


Figure I.13. Chromatographe en phase gazeuse

IV.1.2. Chromatographie liquide à haute performance

La HPLC est une technique de séparation analytique et préparative d'un mélange de composés à haut poids moléculaire. Cette forme de chromatographie est fréquemment utilisée en chimie analytique. Dans la plupart des cas, la HPLC est la méthode proposée dans la monographie pour les qualités de spécificité et de détection qu'elle présente. De plus, elle donne des résultats performants et permet de séparer une grande partie des composants d'un produit pharmaceutique (**Burgot; 2006**).

IV.1.2.1. Principe de fonctionnement

L'échantillon à analyser est poussé par un liquide (phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire de fine granulométrie qui permet une meilleure séparation des composants. Le seuil de détection est également plus bas. La combinaison de ces attributs - rapidité et résolution élevées - conduit à l'appellation « haute performance » (**Burgot; 2006**).

Les solvants utilisés sont des combinaisons miscibles d'eau et de divers solvants organiques (alcools, acétonitrile, dichlorométhane, ...). Souvent, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le mode dit *"gradient"* ou *"élution graduée"* (en opposition au mode *"isocratique"*, pour lequel la composition de la phase mobile reste la même tout au long de l'analyse).

L'échantillon à analyser est injecté en amont de la colonne au moyen d'un injecteur online ou une microseringue. Le volume d'échantillon est de l'ordre de 20 µl à 500 µl. Le composé séparé, au niveau de la phase stationnaire, est détecté à la sortie de la colonne qui est directement lié à un ou plusieurs détecteurs en série (**Burgot; 2006**).

IV.1.2.2. Appareillage

Le chromatographe liquide (Figure I.14) utilise :

- un réservoir de phase mobile qui est pompée à l'aide d'une pompe et envoyée sous pression dans la colonne chromatographique;
- Un dégazeur pour éliminer les bulles d'air;
- Une boucle d'injection qui détermine le volume de l'échantillon à introduire;
- Des colonnes en acier de petite dimension (10 - 50 cm de longueur sur quelques mm de diamètre). Ces colonnes sont remplies sous haute pression (600 bars) avec une phase stationnaire constituée d'un absorbant greffé sur des petites particules de silice (5 - 10 µm) ;
- un four pour contrôler la température (0°C à 60°C) pendant l'analyse ;
- un ou plusieurs détecteurs en série tel que :
  - Le détecteur à absorption UV ou visible.
  - Le détecteur à indice de réfraction.
  - Le détecteur UV à barrette de diodes (DAD).
  - Le détecteur fluorimétrique
- un collecteur de fraction ou réservoir de rejets ;
- un ordinateur qui permet l'introduction des données ainsi que la récupération et traitement des résultats ;
- le mode d'analyse est déterminé selon la nature des phases :
  - Mode normale : phase stationnaire polaire, solvant apolaire ;
  - Mode inverse : phase stationnaire apolaire, solvant polaire.

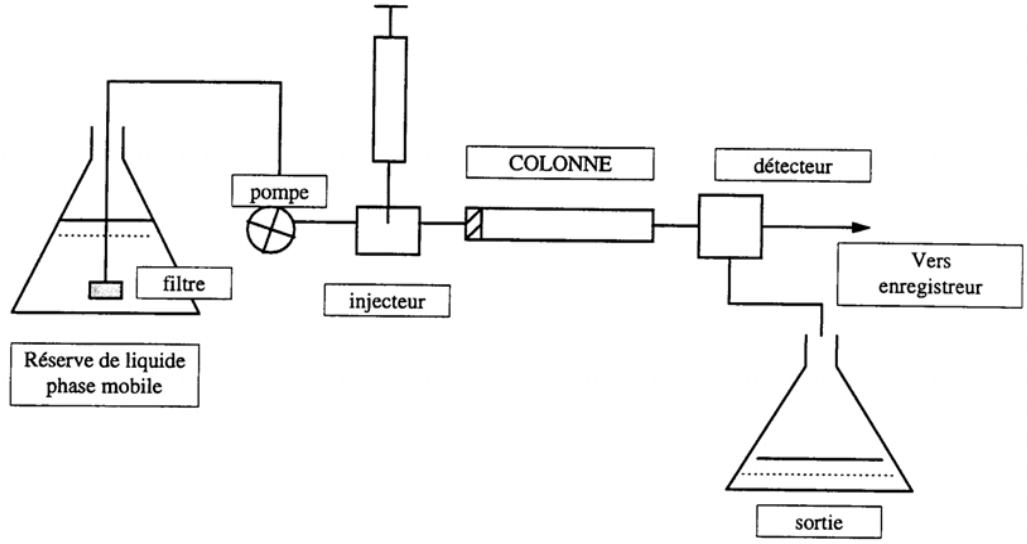


Figure I.14. Chromatographe en phase liquide

IV.1.2.3. Les grandeurs de rétention

La chromatographie en phase gazeuse repose sur un certain nombre de grandeurs essentielles pour l'interprétation des chromatogrammes.

- **Le temps de rétention t_r**

C'est le temps qui s'écoule entre l'injection de l'échantillon et l'apparition du sommet du pic du soluté, cette définition n'est valable que pour les pics étroits et symétriques. Le temps de rétention est indépendant de la quantité injectée, de la nature et de l'abondance des autres constituants, de la nature du gaz vecteur. Il dépend de la température de la colonne et du couple soluté/phase stationnaire (**Tranchant; 1995**).

$$t_r = d / \mu \qquad \textbf{(I.1)}$$

d : Distance de rétention qui sépare le top d'injection et l'abscisse du sommet du pic.

μ : La vitesse de déroulement du papier de l'enregistreur.

Le temps de rétention réduit est donné par la relation :

$$t_{r`} = (t_r - t_m) \qquad \textbf{(I.2)}$$

t_r : Temps de rétention qui va mettre le soluté de l'injection à la sortie de la colonne.

t_m : Temps de rétention mort d'un soluté non retenu par la phase stationnaire.

$t_{r`}$: Temps de rétention réduite.

- **L'indice de rétention**

Introduit par **Kovats** (**Bengacemi; 2005**) en chromatographie isotherme, il est donné par la relation **(I.3).**

$$I_r(x) = [(\log t_{r`}(x) - \log t_{r`}(z)) / (\log t_{r`}(z+1) - \log t_{r`}(z))] + 100.Z \quad (I.3)$$

Z: représente l'alcane à z atomes de carbone, $d_{r`}(x)$, $d_{r`}(z)$ et $d_{r`}(z+1)$ sont respectivement les distances de rétention réduite de la substance inconnue et les alcanes à z et z+1 atome de carbone qui sortent juste avant et après la substance inconnue.

Vanen Dool et **Kratz** (**Bengacemi; 2005**) ont par la suite introduit l'indice de rétention à température programmée par l'expression **(I.4).**

$$I_r = 100n.\ [(t_r(x) - t_r(z)) / (t_r(z+1) - t_r(z))] + 100Z \quad (I.4)$$

Avec :

t_r (x) : C'est le temps de rétention du soluté (x) étudié.

t_r (z) : C'est le temps de rétention de l'alcane à z atome de carbone qui précède (x).

t_r (z+1) : C'est le temps de rétention de l'alcane à z+1 atome de carbone qui suit (x).

n : Différence du nombre d'atome de carbone entre les deux alcanes (généralement n =1).

IV.1.3. Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

La spectrométrie de masse désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des masses, des espèces atomiques ou moléculaires individuelles de l'échantillon analysé, ce qui permet de recueillir des informations sur sa nature, sa composition et même sur sa structure.

IV.1.3.1. Principe

C'est le couplage avec la CPG le plus intéressent, puisqu'il permet d'obtenir des informations concernent la structure de la plupart des molécules. Les molécules entraînées dans le flux gazeux, à la sortie de la colonne arrivent directement dans la chambre d'ionisation maintenue sous vide. L'ionisation se fait par impact électrique ou par ionisation chimique. La fragmentation de la molécule permet d'obtenir un spectre de masse.

Cette technique consiste à ioniser par bombardement électronique, les molécules élues de la colonne capillaire du chromatographe en phase gazeuse dans l'enceinte sous vide du spectromètre de masse. Les cations et ions radicaux formés sont ensuite séparés d'après leur rapport (m/z) dans le champ électrique et / ou magnétique de l'analyseur, et connectés au multiplicateur d'électrons qui amplifie ce courant ionique. (**Etiévant ; 1993, Crocq; 1982**)

IV.3. Spectrométrie d'absorption UV-visible

La spectrophotométrie UV/Visible est une méthode d'analyse quantitative, fondée sur l'étude du changement d'absorption d'une lumière monochromatique par un milieu en fonction de la variation de la concentration d'un constituant. Cette méthode d'analyse est intéressante et s'applique à un très grand nombre de dosages. Elle permet de travailler sur de faibles quantités de substances et elle n'est pas destructrice vis-à-vis de l'échantillon

IV.3.1 Principe

Le principe de la quantification consiste à doser directement le soluté en utilisant la relation de Beer-Lambert. Elle permet de déterminer la concentration de chaque substance dans l'échantillon à analyser selon la relation ou loi suivante :

$$A = \varepsilon.l.C \quad (I.5)$$

A : Absorbance (sans unité).

ε: Coefficient d'extinction molaire (L.mol-1.cm-1).

l : Trajet optique (cm).

C : Concentration de la substance dans la solution (mol/L).

Pour pouvoir appliquer cette loi quantitative, il faut connaître le coefficient d'extinction de la substance (ε). Ce dernier varie en fonction du solvant dans lequel la substance est dissoute et de la longueur d'onde d'absorption (**Burgot ; 2006**).

Si le ε n'est pas connu, il est nécessaire de tracer une courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration avec une gamme des concentrations d'un témoin où la loi de Beer-Lambert est vérifiée (linéaire).

Cette loi n'est vérifiée que dans les conditions suivantes :

- Lumière monochromatique.

- Solution très diluée (concentration ≤ 10-2 mol/L).
- Pas de réflexion, diffusion ou fluorescence du faisceau incident.

IV.3.2. Appareillage

Les spectrophotomètres sont des appareils permettant une sélection continue des longueurs d'ondes par un monochromateur (Figure I.15) (**Burgot ; 2006**).

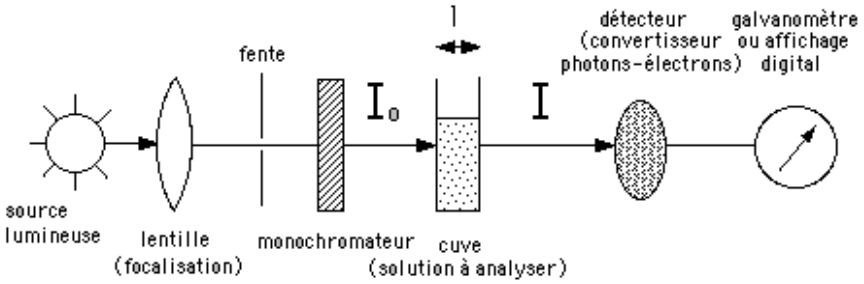


Figure I.15. Schéma descriptif d'un spectrophotomètre UV-Visible.

Un spectrophotomètre comprend quatre parties essentielles :

- **Les sources**

Les plus employées sont celle au deutérium qui émet fortement dans l'UV mais peu dans le VIS et une lampe au tungstène qui émet fortement dans le VIS mais peu dans la région basse de l'UV. Elles émettent un spectre continu et quelques raies atomiques qui permettent de faire un calibrage en longueur d'onde par exemple.

- **Le monochromateur**

Composé d'une fente d'entrée, d'un dispositif de dispersion (un prisme) et d'une fente de sortie. La lumière polychromatique de la source est focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur qui transmet sélectivement une bande étroite de lumière.

- **la cuve**

Elle contient soit l'échantillon soit la référence. La largeur de la cuve est définie par le *trajet optique*. Elle doit être en quartz, transparente aux radiations.

- **Les détecteurs**

Les détecteurs couramment employés sont des photodiodes qui mesurent l'intensité I de la lumière non absorbée par l'élément à doser. Cette lumière passe donc à travers la cuve sans que les photons agissent sur les électrons de l'élément. Dans de tels spectromètres, tous les éléments sont situés sur la même ligne.

V. TRAVEAUX ANTERIEURS SUR L'*ARTEMISIA HERBA-ALBA*

Dans le cadre d'une contribution à la valorisation de l'*Artemisia herba alba*, des travaux ont été portés sur l'analyse des propriétés chimiques et biologiques (activité antioxyante, antimicrobienne…) notamment d'intérêt chimiotaxonomique. Des études sur les huiles essentielles obtenues par entraînement à la vapeur, l'isolation et l'élucidation de la structure des flavonoïdes qu'elle contient.

Benjilali et Richard. (1980) réalisent une étude qualitative par GC/MS de 48 échantillons d'*Artemisia herba-alba* provenant de différentes régions du Maroc. Ils ont identifié 16 composés terpéniques et 3 composés cétoniques classés en 4 chémotypes.

Par la suite, en 1982 en étudiant par la même technique, 100 échantillons récoltés sur tout le territoire marocain, ils arrivent à distinguer 7chémotypes, suivant les constituants majoritaires

Lemberg. (1982) en effectuant des études analytiques très poussées sur les mêmes échantillons du Maroc, identifie 25 nouveaux constituants. Il constate que la composition de l'huile est fortement influencée par la période et le lieu de végétation de la plante et préconise pour sa cueillette la période comprise entre juin et octobre.

Feuerstein et al. (1988) identifient plus de 30 composés dans les huiles essentielles de différentes populations d'Armoise blanches d'Espagne par GC/MS ; le camphre et le 1,8 –cinéol sont les plus prépondérants.

Benmansour. (1999) identifie 12 composés GC/MS dans différentes régions de Tlemcen. Le camphre apparaître être le constituant majoritaire dans toute les stations étudiées.

Bezza et al. (2010) étudient la composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* provenant de la région de Biskra (Algérie). 46 composés ont été identifiés. L'huile a été caractérisée par un contenu en acétate de cis-chrysanthényle (25,12 %), du 2E, 3Z-2-éthyliden-6-méthyl-3,5-heptadiènal (8,39 %), de l'α-thujone (7,85 %), de l'acétate de myrtényle (7,39 %), de la verbénone (7,19 %) et de la chrysanthénone (4,98%).

Ghanmi et al. (2010) réalisent une étude comparative sur l'effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental).

Zouari et al. (2010) les études sur la composition chimiques et l'activité biologique d'huile essentielled*'Artemisia herba-alba* de Tunisie. Identifie 48 composés par GC et GC/MS. L'essence présente des constituants majoritairestels quel'acétate de cis-chrysanthényle (10.60%) ;Sabinyl acétate(9.13%) et α-thujone(8.73%). Elle est dotée d'un pouvoir antioxydant intéressent.

Dahmani. (2010) identifie 164 composés par GC et GC/MS dans différentes régions d'Algérie. Elle évalue l'activité anti oxydante et biologique des différentes huiles essentielles par l'inhibition du radical DPPH. Elle procède également à l'isolement des composés dotés d'activité antioxydante par différente méthode spectrales en utilisant la méthode on line HPLC-DAD-DPPH pour le repérage des composé actifs. Elle a évalué également l'activité antioxydante des différents extraits et des composés isolés.

En plus des travaux ciblant les propriétés chimiques d'*Artemisia herba-alba*, d'autres ont porté sur l'analyse des propriétés biologiques. Ainsi, Yasphe et al. (1979), ont montré que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de la plante d'*Artemisia herba-alba*récoltée au Moyen Orient est due au Santalina alcool et à l'artemisia alcool qu'elles contiennent.

Chapitre II

Matériels et méthodes

Les substances organiques sont généralement présentes à de faibles concentrations dans la biomasse de l'aliment. Avant de pouvoir utiliser ou analyser de telles substances, il est nécessaire de les extraire de leur matrice.

Plusieurs méthodes d'extractions des composés naturels ont été mises au point telles que l'hydrodistillation, l'entraînement à la vapeur, extraction continue par Soxhlet et la macération. Cependant, ces composés naturels sont connus comme étant thermosensibles et vulnérables aux réactions chimiques. La perte de certains constituants, la dégradation de certains composés insaturés par effet thermique ou par hydrolyse, ainsi que la présence de résidus de solvants organiques plus ou moins toxiques peuvent être engendrés par ces techniques d'extraction (**Djabou, 2006**).

I. MATERIEL VEGETAL

Plusieurs techniques sont disponibles pour la préparation d'extraits, à intérêts aromatiques, à partir des plantes aromatiques et médicinales. La distillation est l'une de ces techniques la plus ancienne et la plus courante. Avant de procéder à cette opération qui vise à recueillir l'huile essentielle, la préparation du matériel végétal est une opération importante qu'il faut mener avec soin, car la gestion du procédé d'extraction et la qualité de l'extrait obtenu seront largement tributaires de cette préparation.

I.1. Echantillonnage

- ✓ **Récolte de l'*Artemisia herba alba***

Les échantillons d'*A. herba-alba* ont été récoltés durant le mois de mai 2012 dans la région de sidi aissa wilaya de M'Sila à 110Km de Wilaya de tizi ouzou. Seule la partie aérienne (feuilles et tiges) a été collectée en début de matinée afin que le matériel végétal soit le plus frais possible.

L'identification de l'échantillon de l'*A.herba-alba* a été réalisée au Laboratoire de biologie végétale de la Faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

- ✓ **Préparation de la matière végétale**

L'échantillon fraîchement cueilli (4 mai 2012) est préalablement séché à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 3 à 5 jours. Le temps de passage à l'extraction doit être le plus bref possible. Avant l'extraction (8 mai 2012), la matière végétale (tige+feuilles) est préalablement coupée en petit bâtonnets d'environ 1cm de long.

I.2. Détermination de taux d'humidité (teneur en eau)

Dans le but de déterminer le taux d'humidité ou la teneur en eau, nous avons procédé à l'étude cinétique de la masse humide (mt) en fonction du temps de trois échantillons d'*A.herba alba* d'un même lot, en les pesant chaque jours jusqu'à atteindre une masse stable.
Les échantillons séchés dans un endroit aéré et ombré sont ensuite placés dans une étuve réglée à 110°C durant 6 heures. La masse sèche (ms) a été déterminée à l'aide d'une balance de précisions à 0,01g (2.71, 2.70, 2.03)
La teneur en eau est déterminée à partir :

$$W = (mt - ms) / ms \qquad \textbf{(II.1)}$$

W: la teneur en eau du matériel végétal
m_t : masse du matériel végétal humide en fonction de temps (g)
m_s : masse du matériel végétal sec (g)

La moyenne de la teneur en eau pour les trois échantillons est donnée par la relation suivante:

$$W(moy) = \frac{\sum_{i=0}^{n} Wi}{n} \qquad \textbf{(II.2)}$$

$W_{(moy)}$: la teneur en eau moyenne
n : nombre d'échantillons

Le taux d'humidité exprimée en % est :

$$y = (mt - ms).100 / mt \qquad \textbf{(II. 3)}$$

y : taux d'humidité

m_t : masse du matériel végétal humide en fonction de temps (g)

m_s : masse du matériel végétal sec (g)

I.3. Détermination de la vitesse de séchage

Par définition la vitesse de séchage est la variation de la teneur en eau en fonction du temps.

$$V = -dW/dt \qquad \textbf{(II.4)}$$

V : la vitesse de séchage (% en poids d'eau/jour)

dW : la variation de la teneur en eau (%)

dt : la variation de temps (jour)

II. EXTRACTION DES HUILES ESSENTILLES

Les extractions ont été réalisées au sein du Laboratoire d'Analyse Organique Fonctionnelle (LAOF) de la Faculté de Chimie de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene.

II.1. Méthode d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation classique sur un appareil de type Clevenger modifié (**Miguel et al ; 1976**) (Figure II.1). Les extractions ont été réalisées par ébullition de 300 g de matériel végétal dans un ballon de quatre litres rempli d'eau (2/3 du volume du ballon) pendant deux heures.

Les vapeurs formées montent le long de la colonne en entraînant avec elles les huiles essentielles. Ces vapeurs sont condensées dans un réfrigérant, le condensât (eau + huile essentielle) est récupéré dans une ampoule à décanter. L'HE obtenue par une simple décantation est séparée minutieusement de la partie aqueuse.

Les huiles essentielles obtenues fluides, de couleur jaune pâle et dégagent une forte odeur, fraîche et agréable sont conservées dans des flacons ombrés hermétiques à basse température (-4°C) et à l'abri de la lumière pour évitée toute dégradation.

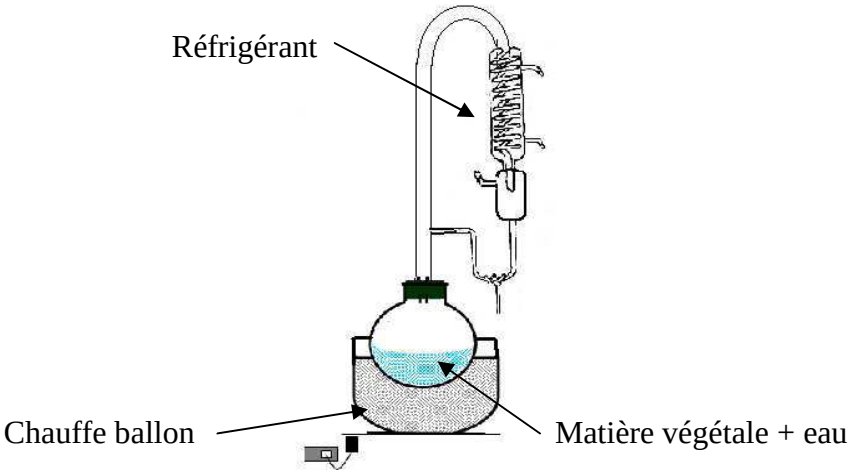


Figure II.1. Appareil de Clevenger modifié

II.2. La composition chimique d'huile essentielle

La composition chimique des huiles a été déterminée par la technique de Chromatographie en Phase Gazeuse (CG) et la technique de Chromatographie en Phase Gazeuse couplée avec la Spectrométrie de Masse (CG/MS) sous les conditions opératoires suivantes :

II.2.1. Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse qualitative et semi-quantitative des essences a été menée sur une colonne capillaire en silice fondue apolaire HP5 MS de 25m équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les conditions optimales d'analyse sont données dans le tableau (II.1).

Tableau II.1. Conditions opératoires GC

CG
Appareil : Hewlett- Packard 6890
Colonne : HP5 MS (25m x 0,32mm x 0,25µm, diméthylpolysiloxane)
Gaz vecteur : Azote
Débit du gaz : 0,5 mL /mn
Température de l'injecteur : 250°C
Température du détecteur : 250°C
Quantité injectée : 0,2 ul
Température de colonne : 45°C/8 min jusqu'à 250°C/15 min à raison de 2°C/min.

Le pourcentage de chaque constituant dans l'essence est calculé par intégration des aires du chromatogramme. Une série d'alcanes linéaires (C_5-C_{30}) est injecté dans les mêmes conditions pour calculer les indices de rétention selon Van Den Dool des constituants des huiles essentielles relation (I.4).

II.2.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

La confirmation de l'identification faite par simple chromatographie gazeuse et compléter par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dont les conditions d'analyse sont regroupées dans le tableau (II.2) ci après :

Tableau II.2. Conditions opératoires GC/MS

GC/MS	
- Chromatographie gazeuse	**- Spectrométrie de masse**
Appareil : Hewlett- Packard 6890	Appareil : Agilent MSD 5973
Colonne : HP 5 MS (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm)	Mode d'ionisation : impact électronique
Gaz vecteur : Hélium	Tension d'ionisation : 70 eV, basse résolution
Débit : 0.5 mL /mn	Balayage automatique : m/z 25 à 350
Température de l'injecteur : 250°C	Température de la source : 280°C
Température du détecteur : 250°C	Interface : Couplage direct
Quantité injectée : 0.2 uL	Courant de filament : 100μA.
Température de colonne : 45°C/8 min jusqu'à 250°C/15 min à raison de 2°C/min.	Tension d'accélération : 5 Kv
	Pression : 2.10^{-6} Torr

Afin de calculer les indices de rétention des différents constituants, un mélange d'alcanes a été injecté sous les mêmes conditions.

II.2.3. Identification des composés

L'identification des composés séparés sur la colonne apolaire ont été déterminés par comparaison des spectres de chaque constituant à ceux donnés par les librairies Wiley 7, NIST 02 et NIST 05 **(NIST ; 1999)**. Les résultats ont également été confirmés par la comparaison de leurs indices de rétention, par rapport à C_7-C_{28} n-alcanes **(Van Den Dool et**

al;1963) injectés en GC sur une colonne capillaire et en GC/MS dans les mêmes conditions que les huiles. Certains constituants ont été confirmés par l'analyse des étalons dans les mêmes conditions décrites ci-dessus **(Dahmani et al ; 2009. Adams ; 1995)**. Le pourcentage de la composition de chaque constituant dans les huiles a été estimé par la méthode de normalisation des aires des pics par GC **(Adams ; 2001, Adams ; 2007).**

III. EXTRACTION DES POLYPHENOLS

L'extraction liquide-liquide est la plus simple des méthodes de séparation. Elle consiste à faire passer un produit dissous dans une phase liquide, appelé le soluté, dans une seconde phase liquide non miscible avec la première. En pratique, les solutés sont souvent dans une phase aqueuse. Un solvant organique (éther, acétate d'éthyle, chloroforme etc.) est utilisé pour les extraire.

III.1. Préparation des extraits

Le matériel végétal est séché à l'air libre pendant quelques jours. La plante est ensuite réduite en poudre à l'aide d'un petit broyeur à hélices de marque **IKA A 10 basic**, puis conservée dans des flacons en verre à l'abri de la lumière.

III.1.1. Appareillage

Pour la macération suivie de l'extraction liquide-liquide nous avons besoin:

- Broyeur.
- D'un erlenmeyer d'une capacité de 250ml
- D'un entonnoir
- De papier filtre
- Des petits flacons ambrés
- D'une ampoule à décanter.
- D'un rota vapeur.
- D'une pompe à vide.
- D'une balance électronique.

III.1.2. Modes opératoires

III.1.2.1. Macération

Cette opération consiste à épuiser le matériel végétal au contact d'un solvant

✓ **Premier protocole**

2g de matériel végétal séchées et broyées ont été laissées au contact de 100 ml d'éthanol dans un erlenmeyer de telle façon que le solvant Couvre totalement le matériel végétal pendant 24 heures. Les extraits éthanoliques ont été obtenus par trois macérations successives.

Après filtration, le filtrat est évaporé à sec sous pression réduite à 40°C par à un rota vapeur. L'extrait sec (**E1**) obtenu est repris par l'eau bouillante; la solution refroidie est extraite par l'acétate d'éthyle (3x50ml) et agitée rigoureusement, après décantation la phase acétate d'éthyle est séparée de la phase aqueuse et évaporer à sec sous pression réduite à 40°C pour obtenir l'extrait (**E2**). La phase aqueuse est affrontée dans une ampoule à décanter au n-butanol (3x50ml) après décantation et évaporation à sec on obtient l'extrait **(E3).** Chaque extrait sec est récupérer par 5ml de méthanol.

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure (II.2).

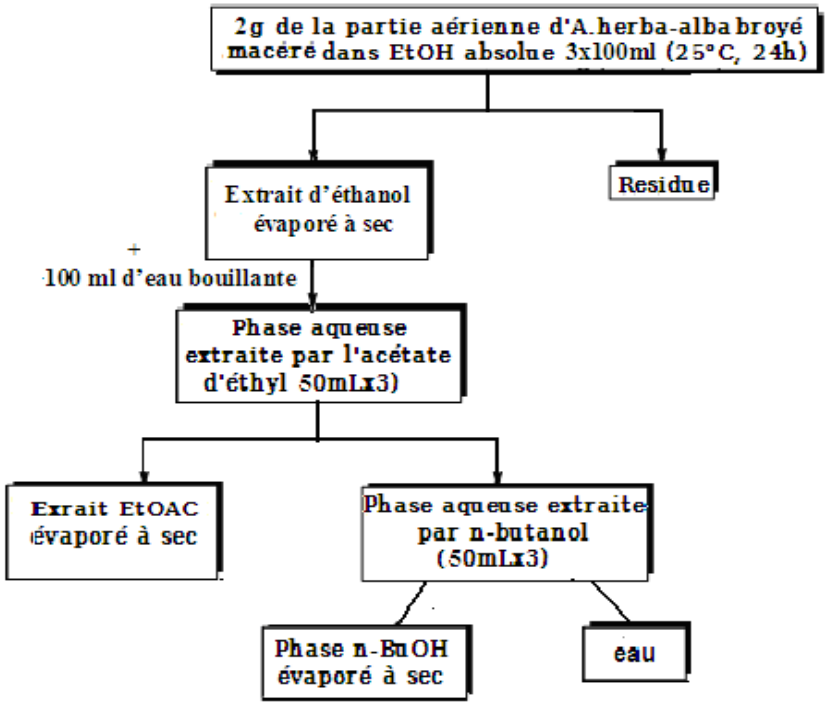


Figure II.2. Premier protocole d'extraction

✓ **Second protocole**

2g de matériel végétal séchées et broyées ont été hydrolysé par 150 ml d'une solution d'acide chlorydrique (2N) dans un bain marie pendant 40 minutes à 40°C. Après filtration, la phase

aqueuse est extraite par l'éther de pétrole (3x50ml), après décantation, la phase éthéré est récupérée et concentrée à sec à 40°C par à un rota vapeur, on obtient 1'extrait (**E*1**). La phase aqueuse est ensuite affrontée au n-butanol (3x50ml), séparée et évaporée pour obtenir l'extrait (**E*2**). Chaque extrait sec est récupéré par 5ml de méthanol.

Le protocole d'extraction est résumé dans la figure (II.3).

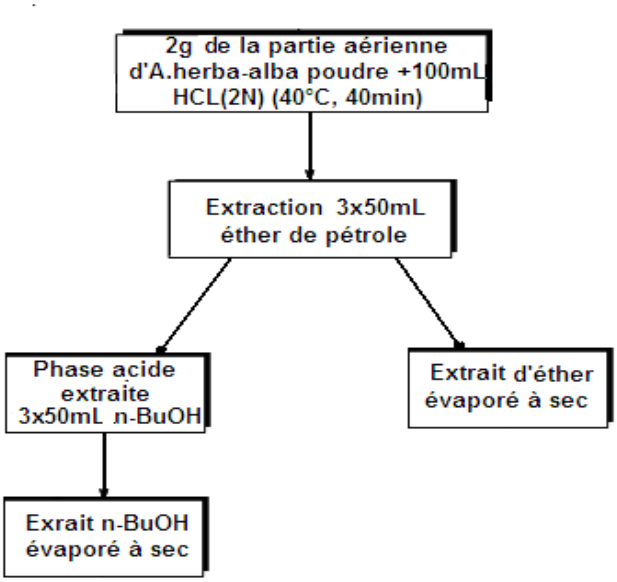


Figure II.3. Second protocole d'extraction par hydrolyse

III.1.3. Intérêts des solvants utilisés

- ✓ La phase d'éther de pétrole sépare les produits très apolaires tels que les acides gras, les huiles saturées, les stérols et les caroténoïdes.
- ✓ La phase d'acétate d'éthyle sépare les produits moyennement polaires tels que les mono glycosides, les saponines, les alcaloïdes, les huiles essentielles…
- ✓ La phase de n-butanol sépare les produits les plus polaires comprenant les oses et osides, les hétérosides, les acides aminés, les acides phénoliques et les tanins **(Benhamza L, 2008)**.

III.2. Identification de la composition des extraits par HPLC

L'analyse qualitative et semi-quantitative des extraits a été menée sur une colonne C18 hypersil BDS équipée d'un détecteur UV variable. Les conditions opératoires optimisées afin d'avoir la meilleure séparation possible sont récapitulés dans le tableau (II.3).

Tableau II.3. Les conditions opératoires optimisées pour l'analyse par HPLC.

HPLC
Colonne : C18 hypersil BDS (250 x 4,6 mm, 5µm)
Phase mobile Solvant A : MeOH:CH_3COOH
Solvant B: H_2O: CH_3COOH
Détecteur : UV/Visible variable
Longueur d'onde : 230 nm.
Volume injecté : 20 µL
Débit : 0,7 ml /min
Température Ambiante : (30°C)

Les deux solvants d'analyse sont une solution A d'acide acétique (AcOH) à 0,2% dans le MeOH (99,8:0,2: v / v) d'une part et une solution B d'AcOH dans H_2O (99,8:0,2 : v / v) d'une autre part à une température de 30°C. Le gradient utilisé dans la HPLC analytique est détaillé dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.4. Gradient utilisé pour l'analyse par CLHP

Gradient		
Temps(min)	**Phase A(%)**	**Phase B(%)**
0	5	95
35	70	30
40	70	30
45	5	95
55	5	95

(A) MeOH: CH3COOH; 99.8:0.2 (v/v) et (B) H_2O:CH_3COOH; 99.8:0.2 (v/v).

III.2.2. Chromatographie liquide : On-line HPLC-DPPH

L'appareil de HPLC décrit ci-dessus est combiné avec un système de réaction postérieur à la colonne (post-colonne).

A la sortie de la colonne (débit 0.7 ml/min) on place une valve de commutation de 6 ports qui permet de diriger l'éluât directement au détecteur, dans une première injection de l'échantillon, ou de le diriger vers le tube de réaction, de 3 m de longueur et 0.5 mm de diamètre interne, dans une seconde injection, où les éluants se mélangent avec une solution du radical DPPH (7.09×10^{-5}M) dans le méthanol avec un débit de 0.7 ml/min par une pompe. A la sortie du tube de réaction, le détecteur mesure la diminution dans l'absorbance pour le radical libre DPPH à 515 nm.

Les extraits sont préparés dans des solutions méthanoliques et injectés à une quantité de 20µl dans les mêmes conditions que précédemment.

IV. DETERMINATION DU RENDEMENT D'EXTRACTION

L'évaluation de chaque extraction a été réalisée par le calcul du rendement qui est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait obtenue et la masse sèche de la matière végétale utilisée donné selon la relation **(II.5)**

$$R\% = me/m(1-y)\ X\ 100 \qquad (II.5)$$

R : rendement en pourcentage (%)

me: masse de l'extrait (g)

m : masse du matériel végétal (g)

y: Taux d'humidité de la charge utilisée dans l'extraction.

V. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES ESSENCES

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés a partir de plusieurs substances naturelles a savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires **(Sanchez-Moreno;2002, Marc et al ; 2004, Huang ; 2005).**

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents et la méthode choisie dans ce travail est celle du radical libre DPPH•.

V.1. Evaluation de l'activité anti-oxydante

L'activité antioxydante a été évaluée en ultra-violet par le test du piégeage du radical DPPH **(Brand-Williams et al ; 1995)** stable pour les huiles essentielles et les concrètes de l'*Artemisia herba-alba* ainsi que celle du BHT et de rosmarinique après quinze minutes de réaction à λ=515nm sur des solutions méthanoliques mères de 1mg/ml, ainsi que sur une gamme de concentration (25-500µg/ml) dans du méthanol pour UV Tableau A.1 (annexe 2**)**. La moyenne sur trois essais des pourcentages de capture du radical ont été calculés à partir de la relation ci-dessous:

$$\%CR = \left[\frac{A_B - A_A}{A_B}\right] \times 100 \qquad \textbf{(II.6)}$$

A_B est l'absorbance du blanc (t = 0min).

A_A est l'absorbance de la solution de l'extrait testé (t = 15min).

V.2. Préparation de la solution alcoolique de DPPH

Nous avons dissous 2.9 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. La solution doit être préparée à l'avance car la solubilisation est difficile et elle ne se conserve pas plus de 24h à l'obscurité.

La valeur de l'absorbance a été ajustée à 0,800 ± 0,030 (515 nm). La concentration exacte de la solution est calculée par interpolation de la valeur de l'absorbance dans la courbe d'étalonnage du radical DPPH ($y = 0.1121x + 0.0055$, $R^2 = 0,999$).

V.3. Protocole expérimental

1. **Le blanc**

Une solution méthanolique (2,4 ml) du radical DPPH (7,09 × 10-5 M) est mélangée directement dans une cuve UV en plastique avec du méthanol (1,2 ml). La mesure de l'absorbance à 515 nm est prise immédiatement (t = 0min).

2. L’échantillon

Une solution méthanolique (2,4 ml) du radical DPPH ($7,09 \times 10^{-5}$ M) est mélangée dans une cuve UV avec une solution méthanolique (1,2 ml) de l’échantillon à évaluer, préparée en trois essais, agitée et maintenue à température ambiante et dans l'obscurité avant de prendre la mesure de l’absorbance dans un spectrophotomètre à 515 nm. Les mesures sont prises après 15 minutes.

La réduction du DPPH s’accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Chapitre III

Analyses et discussions

I. CINETIQUE DE SECHAGE

I.1. Détermination de taux d'humidité (teneur en eau)

Pour étudier la cinétique de séchage on à calculé la variation de la teneur en eau (W) et de taux d'humidité données par les équations (II.1, II.3) en fonction du temps de séchage. Les résultats trouvés sont regroupés dans les tableaux (A1, A2 annexe 1) et schématisé par la (Figure III.1).

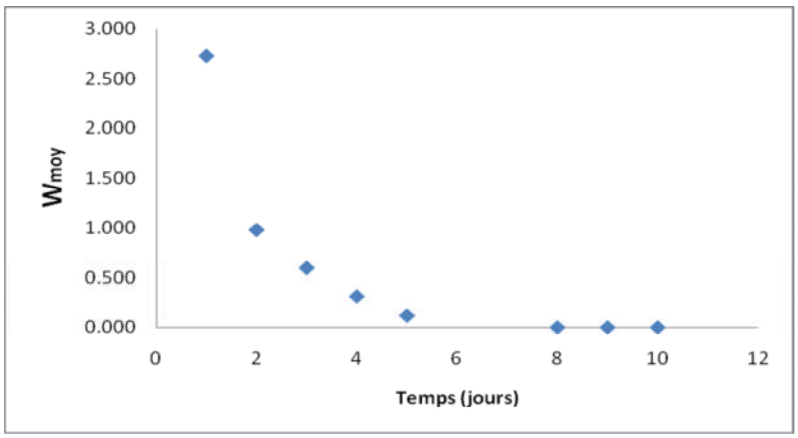


Figure III.1. Evaluation de la teneur en eau de l'*A.herba alba* en fonction de temps

L'analyse de la figure (III.1) montre qu'au cours de séchage, la teneur en eau diminue progressivement puis devient pratiquement constante. On constate ainsi deux phases distinctes:

- **La phase I** : du début du séchage aux cinquième jours ; montre une diminution rapide de la teneur en eau du matériel végétal jusqu'au point critique [5, 0.119] correspondant à l'évaporation de l'eau de la couche superficielle.
- **La phase II** : du 5-10 jours la courbe montre une stabilité de la teneur en eau, ce qui pourrait être expliqué par un équilibre établi entre la teneur en eau du milieu environnant et le matériel végétal. Dans ce cas, on peut dire que le séchage est achevé.

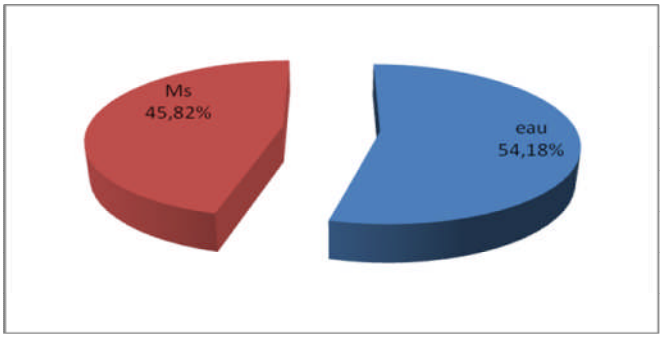


Figure III.2. Le taux d'humidité de l'*A herba alba* fraiche

Les végétaux sont riches en eau, les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau. Pour assurer une bonne conservation, la teneur en eau doit être inférieure ou égale à 10 % (**Paris et Moyse, 1965**).

Les analyses de nos échantillons ont révélé un taux d'humidité moyen important de 54,18%. Cela signifie approximativement que la moitié du poids de la plante fraiche est constitué par de l'eau (Figure III.2).

Après que le séchage est achevé, le taux d'humidité passe de 54,18% à 0%. La teneur en eau, inférieure à 10% confère à notre plante séché une meilleure conservation à long terme.

I.2. Détermination de la vitesse de séchage

Pour mieux comprendre le phénomène de séchage des plantes nous avons déduit l'évolution de la vitesse au cours du temps en appliquant la relation (II.4) pendant toute la durée d'extraction en déterminant la tangente à chaque point de la courbe représentative de l'évolution de la teneur en eau au cours du temps (Figure III.2, Tableau A3, Annexe 1) qui est schématisé par la (Figure III.3).

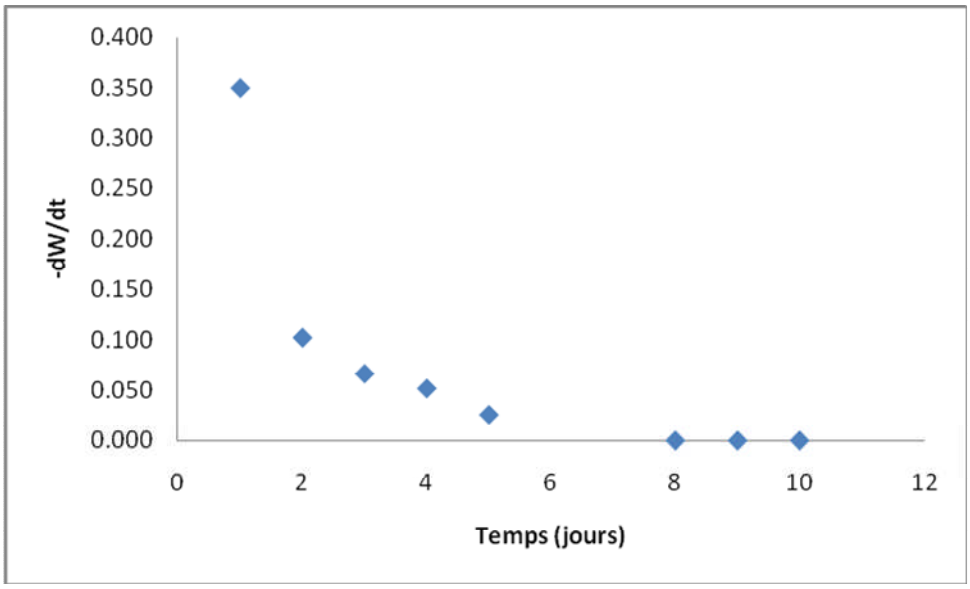


Figure III.3. Evolution de la vitesse de séchage de l'*A. herba alba* en fonction du temps

La courbe représentative (III.3) montre que le phénomène de séchage de notre plante s'effectue en deux périodes :

- Une période à vitesse élevée décroissante qui correspond au début de séchage jusqu'au point critique [4,0.313], cette diminution rapide de la teneur en eau de la matière végétal est la conséquence de l'évaporation de l'eau de surface.
- La deuxième période à vitesse décroissante faible jusqu'elle devient nulle correspond au (4,10) jours, montre la disparition complète de l'eau de la matière végétale.

Calcul des vitesses de séchage

Elles sont données par les relations suivantes :

$V_1 = - (Wc - Wi) / (tc- ti)$

$V_2 = - (We - Wc) / (te - tc)$

Avec :

V_1 : Vitesse de la première période.

V_2 : Vitesse de la deuxième période.

W_i : La teneur en eau à l'état initial **t_i :** temps initial

W_c : La teneur en eau à l'état critique **t_c** : temps critique

W_e : La teneur en eau à l'équilibre **t_e** : temps d'équilibre

Le tableau (III.1) regroupe les valeurs des vitesses de la première et la deuxième période de la partie aérienne de l'Artemisia herba alba.

Tableau III.1. Vitesses de séchage

Vitesse	Artémisia herba-alba
V_1	0,804
V_2	0,052

II.LES HUILES ESSENTILLES

II.1. Détermination du rendement d'extraction

L'étude est basée sur deux extractions pour un même échantillon. Les rendements obtenus en huile essentielle selon les conditions d'extraction sont déterminés à partir de la relation (II.5) et représentés dans le tableau (III.2).

Tableau III.2. Rendements en huile essentielle d'*A .herba- alba*

Poids de la charge (g)	Quantité en HE (g)	Rendement (%)	R_{moy} (%)
300	2 ,79	1.05	1.11
	3,09	1.17	

Au vu de ces résultats, il apparaît que le rendement moyen en HE obtenue par hydrodistillation est important, et compris dans l'intervalle [0.3-1.6%] cités dans la bibliographie (**Lattaoui ; 1989**).

II.2. Analyse de l'huile d'*Artemisia herba alba* par GC et GC/MS

Les analyses chromatographiques des huiles essentielles nous a permit de déterminer simultanément le nombre de constituants de l'huile, leurs concentrations respectives et leurs ordres d'élution qui renseignent sur la volatilité, c'est à dire à leurs masses moléculaires, et leurs polarités.

L'analyse qualitative et semi-quantitative des essences extraites par hydrodistillation a été effectuée par GC sur une phase stationnaire apolaire HP5MS (Polyméthyle siloxane, 30m x 0,25mm x 0,25µm). L'identification a été réalisée grâce au couplage GC/MS en impact électronique (IE), sur une même colonne par comparaison avec les spectres de masse déjà référenciés, à ceux de la banque de spectres (**Nist et Wiley 07**) et à des étalons injectés dans les mêmes conditions opératoires que l'échantillon d'huile essentielle. L'injection des n-alcanes, dans les mêmes conditions opératoires nous a permis de calculer les indices de rétention de tous les pics (voir les détails dans la partie expérimentale de ce chapitre). Les taux sont évalués en fonction de la surface des pics (**AFNOR ; 1996**). .

L'analyse de l'essence par GC et par GC/MS, a montré des différences importantes dans la composition du point de vu qualitatif et quantitatif. Le chromatogramme, de l'huile essentielle, obtenu sur une colonne apolaire HP-MS5 est représenté sur la (Figure III.4).

Les nombres de pics obtenus sur le chromatogramme en courant ionique total des essences sont inférieurs aux nombres de spectres indexés car un pic peut représenter deux à trois constituants mal séparés. Le détecteur utilisé en GC/MS, de par sa grande sensibilité peut permettre une détection des constituants à l'état de traces. Pour certains nombres de spectres,

nous n'avons pas pu déterminer avec précision le composé correspondant par manque de spectre de référence.

La combinaison de la GC et de la GC/MS, nous a permis d'identifier 50 composés correspondant à 90,56 % de la composition totale pour l'essence, tableau (III.3).

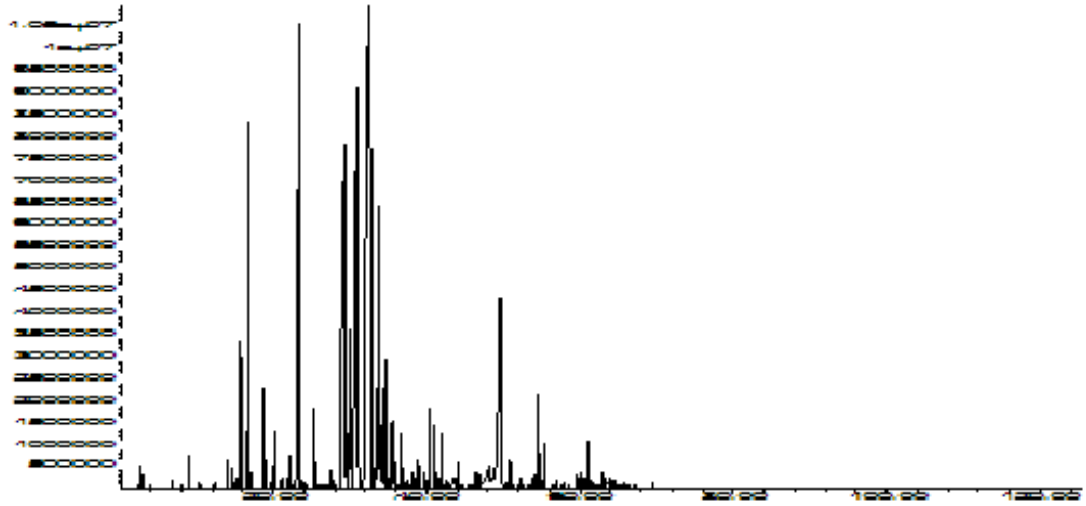


Figure .III.4. Chromatogramme de l'essence d'*A. herba alba* obtenue par hydrodistillation

L'analyse semi-quantitative de l'HE (Figure III.5) montre une prédominance en camphre (24,09 %), la Chrysanthénone (12.55 %), le 1.8-cinéole (10.93 %), le filifolone (8.63 %), la cis-jasmone (7.85 %), le camphène (4.74 %), l'α-thujone (4.26 %) et le Bornéol (3.91 %). La composition chimique est très spécifique pour cette plante algérienne.

D'autres composés sont également présents dans cette essence, mais à des teneurs relativement faibles : β-thujone (2.70 %), le terpinène-4-ol (1.69 %), l'α pinène (1.28 %).

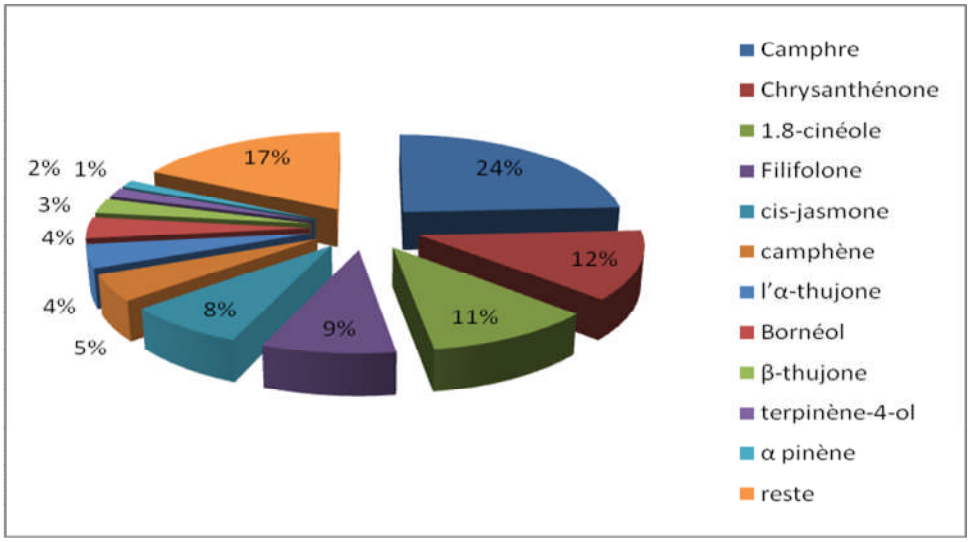


Figure III.5. Distribution des constituants majoritaires de l'huile essentielle d'*A .herba alba*

Parmi les cinquante composés identifiés, sept d'entre eux (camphre ; chrysanthénone, 1.8-cineole, filifolone, cis-jasmone, camphène et α-thujone) peuvent être considérés comme les principaux constituants, représentant plus de 73 % de la totalité de l'HE.
Le camphre (24,09 %) est le constituant majoritaire de l'HE analysée. Il n'est qu'en faible quantité dans celle de la Tunisie (**Zouari; 2010**).

La chrysanthénone (12,55 %) est absente dans des HE de Jordanie (**Hudaib; 2006**) et elle est peu présente dans celle de Matmata (2,30 %) (**Akrout ; 2004**). Elle est très importante dans l'HE d'armoise blanche de M'Sila (**Dob ; 2006**), et de composition variable pour celle du sud de l'Espagne (0,10 à 36,40 %) (**Salido; 2004**), et de la Tunisie (0,91 à 17,37 %) (**Haouari; 2009**). Ce composé pourrait provenir de l'hydrolyse puis de l'oxydation de l'acétate de cis-chrysanthényle (**Bezza; 2010**).

Le 1.8-cinéole (10,93 %) est identifié comme le constituant majoritaire dans l'HE d'armoise blanche provenant du sud de l'Espagne (41,00 % au maximum) (**Salido; 2004**). Il est l'un des principaux composés dans les HE provenant d'Ichemoul en Algérie (**Giordani; 2008**), du sud de la Tunisie et de Matmata (Tunisie) (**Akrout ; 2004**) (3,00 à 20,00 %). Ce composé est surtout présent dans les HE à activité antispasmodique.

L'α-thujone (4,26 %) est le composé majoritaire de l'HE de Matmata et de Jordanie (respectivement 44,00 et 16,00 %) (**Akrout ; 2004, Hudaib ; 2006**). De composition variable pour celle du l'Algérie (0.1% à 47.1%) (**Dahmani ; 2004, Dahmani ; 2010**) et absent dans l'huile d'Espagne (**Salido; 2004).** Ce composé a des activités biologiques telles qu'abortives, antibactériennes, emménagogues, insecticides et larvicides. De plus, il caractérise les armoises blanches par une odeur spécifique (**Bezza; 2010**).

Le filifolone (8.63 %) a toujours été signalé à l'état de trace dans toutes les huiles essentielles d'*A. herba-alba* étudié jusqu'à présent.

La composition en pourcentage des principales classes de familles tableau (III.3) révèle qu'elles sont riches en cétones (60,39%) suivi par les éthers oxydes (11,27%), puis par les monoterpènes (8.95%) et enfin par les alcools (6,40%). Les sesquiterpènes (1,68%) et les esters n'excèdent pas les 2,00 % (Figure III.6).

Plusieurs facteurs sont responsables de cette variabilité et dont les plus importants sont le climat, le sol, la période de récolte et la méthode de conservation et d'extraction (**Amarti; 2011**)**.**

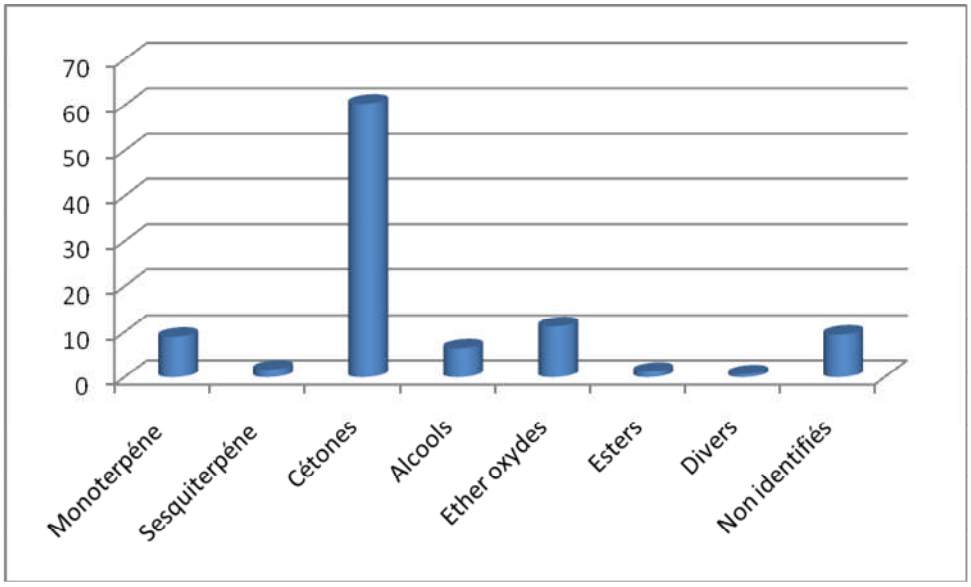


Figure III.6. La composition en pourcentage des principales classes de familles

Tableau III.3. Composition chimique L'huile essentielle d'Artemisia herba-alba

N° pic	Composés identifiés	TR (min)	%	IR
1	Santalina triène	14.007	0.22	909
2	Tricyclène	14.761	0.17	921
3	α Thujène	15.273	0.09	929
4	α pinène	15.743	1.28	936
5	camphène	16.903	4.74	953
6	verbenene	17.221	0.11	958
7	sabinène	18.792	0.92	979
8	β pinène	18.904	0.16	980
9	1-octène-3-ol	19.675	0.07	990
10	α phellandrène	21.122	0.08	1008
11	yomogi alccol	21.31	0.01	1011
12	α-isopropenyltoluène	21.81	0.01	1018
13	α-terpinène	22.105	0.36	1022
14	p-cymène	22.93	0.01	1033
15	1.8- cinéole	23.500	10.93	1040
16	γ-terpinène	25.448	0.63	1064
17	trans-sabinène hydrate	26.41	tr	1075
18	α-terpinolène	27.619	0.18	1088
19	Artemisia alcool	28.07	tr	1093
20	filifolone	29.191	8.63	1107
21	α-thujone	29.409	4.26	1110
22	β-thujone	30.021	2.70	1119
23	Chrysanthénone	30.992	12.55	1133
24	terpinène-1-ol	31.08	tr	1134
25	camphre	32.622	24.09	1155
26	Bornéol	33.775	3.91	1170
27	terpinène-4-ol	34.640	1.69	1181
28	α-thujenal	34.946	0.11	1184
29	myrtenal	35.764	0.46	1194
30	myrtenol	35.85	0.12	1195

N° pic	Composés identifiés	TR (min)	%	IR
31	trans-carveol	37.459	0.08	1218
32	cis-carveol	38.295	0.14	1230
33	cumin aldehyde	38.754	0.07	1237
34	trans-ocimenone	38.942	0.31	1240
35	piperitone oxide	39.860	0.23	1252
36	chrysanthenyl acétate	40.367	0 .74	1258
37	Bornyl acétate	41.985	0.48	1281
38	piperitone	45.58	tr	1335
39	Eugenol	46.775	0.15	1354
40	α-copaene	47.829	0.28	1371
41	cis-jasmone	49.618	7.85	1398
42	trans-caryophyllene	50.607	0.04	1415
43	γ muurolene	54.502	0.88	1479
44	Bicyclogermacrene	55.397	0.40	1494
45	α-muurolène	55.62	tr	1497
46	δ-cadinene	57.004	0.08	1522
47	spathulenol	60.158	0.10	1577
48	caryophyllene oxyde	60.387	0.11	1581
49	β-copaen-8- α-ol	60.711	0.07	1587
50	Ledol	61.612	0.06	1602
% d'identification		90.56		
Monoterpéne hydrocarboné		8,95		
Sesquiterpéne hydrocarboné		1,68		
Cétones		60,39		
Alcools		6,40		
Ether oxydes		11.27		
Esters		1.22		
Divers		0,65		
Non identifiés		9,44		

tr : trace <0.01 ; TR : temps de rétention IR: indices de rétention déterminée sur une colonne capillaire HP5-MS (apolaire) en programmation de température selon Van Den Dool et Kratz.

III. LES POLYPHENOLS

III.1. Les résultats d'extraction

Les différents extraits de la poudre de la partie aérienne de l`*A. herba alba*, nous a permis à partir de deux protocole d'extractions d'obtenir les extraits suivant:

Le protocole 1 (Figure II.2) a permis d'obtenir : L'extrait éthanolique (E1), l'extrait d'acétate d'éthyle (E2) et l'extrait de butanol (E3).

Le protocole 2 (Figure II.3) a permis d'obtenir : L'extrait d'éther de pétrole (E*1) et l'extrait acide de butanol (E*2).

Les rendements d'extraction sont reportés dans le tableau (III.4) ci-dessous. Les rendements des extraits sont calculés à partir de la relation (II.5) par apport à 2g de la matière végétal sèche.

Tableau III.4. Rendements des extraits de la partie aérienne d'A. herba alba

Solvant	Extraits	Masses (g)	Couleurs	Rendements (%)
Ethanol	E1	0,73	Verre	36,5
Acétate d'éthyle	E2	0,55	Verre	27,5
Butanol	E3	0,54	Marron foncé	27,0
Ether de pétrole	E*1	0,11	Jaune	5,5
Butanol-acide	E*2	0 ,63	Marron foncé	31,5

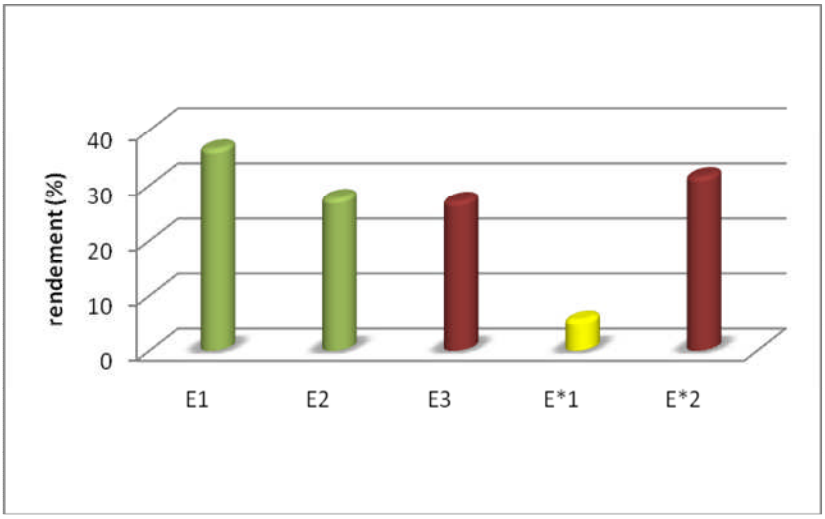


Figure III.7. Rendement en extraits secs

Du point de vue rentabilité en poids, les extraits polaires (E1, E3 et E*2) et moyennement polaire (E2) ont donné les proportions les plus élevées en comparaison avec l`extrait apolaire (E*1) et; cela peut s'expliquer par le fait que l'éther de pétrole est un solvant organique apolaire très volatil et juste utilisé pour dégraisser les drogues.
L'extrait éthanolique de l`*Artemisia herba alba* représente le rendement le plus élevé (36.5%) suivi de l`extrait butanolique (31,5%). L'extrait d`acétate d`éthyle a le plus faible rendement avec 5.5 %.

A priori, nous pouvons dire que le meilleur solvant pourrait être celui qui donne le plus grand rendement, or suivant la nature de celui-ci, nous n'obtenons pas le même type d'extrait. Certains solvants extraient de la matière végétale à la fois le principe odorant, les pigments (colorants) et les matières cireuses. C'est le cas de l'éthanol qui, en plus de l'huile essentielle extrait des pigments et des cires. Nous remarquons toutefois que l'éther donne un extrait d'aspect pâteux de couleur claire et contenant des matières cireuses en faible quantité dont l'odeur fraîche et agréable caractérise la plante *d'A. herba-alba*. Ceci est du au facteur de polarité, en effet, les composants d'une essence sont mieux extraits par des solvants de même polarité. Nous ne pouvons donc pas nous baser sur le rendement global en extrait pour pouvoir affirmer que tel ou tel solvant est meilleur pour l'extraction.

III.2. Analyse par HPLC

Chaque résidu sec est solubilisé dans le méthanol et analysé par HPLC afin d'identifier une partie des flavonoïdes présents dans ces mélanges. L'identification a été réalisée grâce à un étalonnage externe.
Chaque échantillon est injecté en HPLC suivant un gradient d'élution (chapitre II, tableau II.4).
Afin d'identifier le maximum de composés, nous avons injecté douze étalons flavonoïdes et six acides phénols dont quatre isolés à partir de l'*Artemisia herba-alba* de M'sila (**Dahmani; 2011**) à savoir l'acide chlorogénique et ces dérivés dans les mêmes conditions que nos échantillons.

Tableau III.5. Liste des étalons flavonoïdes utilisés

Flavonoïde	**Classe**
Isorhamnetine	Flavonol
Quercétine	Flavonol
Fisetine	Flavonol
Rutine	Flavonol
Hespéretine	Flavonol
Luteoline	Flavone
Rhamnetine	Flavonol
Quercitrine	Flavone
Myricétine	Flavonol
Hesperidine	Flavonone
Hyperoside	Flavone
Genestine	Isoflavone
Acide Gallique	Acide phénol
Acide Vanillique	Acide phénol
Acide caféique	Acide phénol
Acide Coumarique	Acide phénol
Acide Chlorogénique	Acide phénol
Acide 3,5-di-O-cafféoylquinique	Acide phénol
Acide 4,5-di-O-cafféoylquinique	Acide phénol
Acide 3, 4,5-tri-O- cafféoylquinique	Acide phénol

.

Sur les vingt étalons injectés, nous avons pu avoir six étalons qui absorbent dans la longueur d'onde choisie et qui ont également un bon profil avec les conditions d'analyse. Nous n'avons pu identifiés que cinq acides phénols, un flavonol (la quercétine) et une flavone (la luteoline). Les figures III.8, III.9, III.10 et III.11 représentent les chromatogrammes de nos différents échantillons.

Nous observons des profils presque similaires entre les extraits (E2 et E*1) et (E3 et E*2) cependant, l'intensité des pics diffère d'un extrait à un autre.

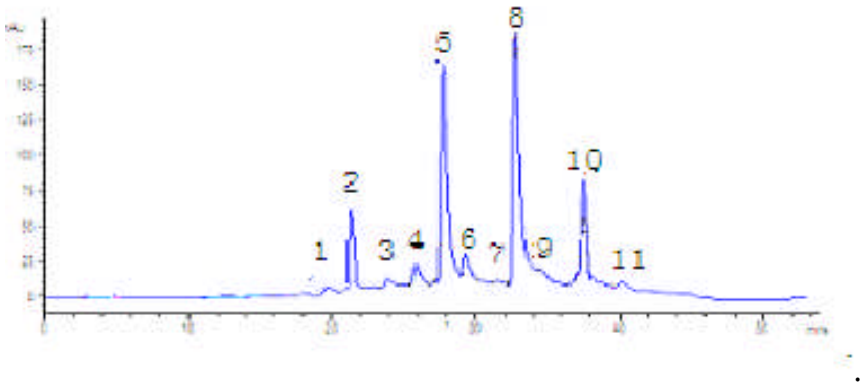


Figure III.8. Chromatogrammes de L'extrait d'acétate d'éthyle (E2).

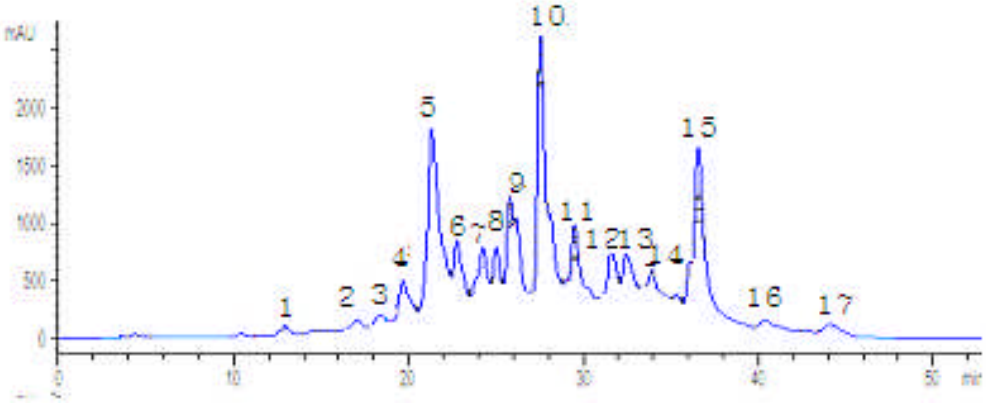


Figure III.9. Chromatogrammes de L'extrait de butanol (E3).

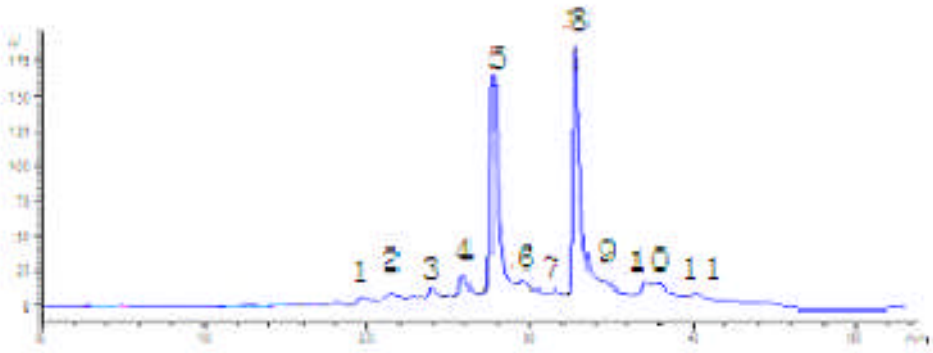


Figure III.10. Chromatogrammes de l'extrait d'éther de pétrole (E*1).

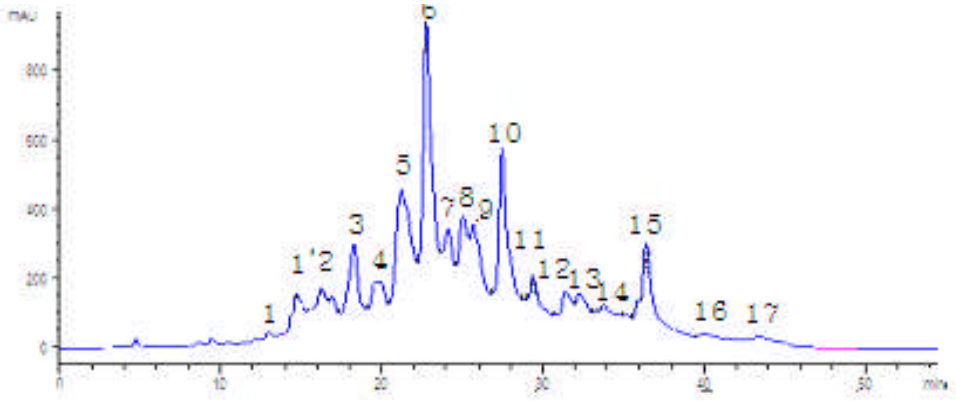


Figure III.11. Chromatogrammes de L'extrait acide de butanol (E*2).

Les sept polyphénols identifiés par rapport aux extraits (E2 et E*1) possédant une activité importante sont décrits dans le tableau (III.6).

Tableau III.6. Les polyphénols identifiés.

N° du composé	Polyphénol	Temps de rétention (min) ± écart-type
1	Acide caféique	18,068 ± 0,021
2	Acide chlorogénique	19.683 ± 0,078
4	Lutéoline	25,026 ± 0,031
5	Acide 3,5-di-O-caféoylquinique	27,743 ± 0,010
7	Quercitine	30,326 ± 0,012
8	Acide 4,5-di-O-caféoylquinique	32,752 ± 0,022
10	Acide 3, 4,5-tri-O- caféoylquinique	37,817 ± 0,042

Parmi les flavonoïdes identifiés on retrouve la quercetine dont le rôle physiologique a été démontré. En effet leurs recherches ont montré qu'une alimentation riche en antioxydants phénoliques dont la quercetine, pouvait être corrélée avec une baisse significative des décès par athérosclérose en diminuant l'oxydation des LDL (low density lipoprotein) (**Franckel; 1995**).

On retrouve aussi la lutéoline, à qui on prête un rôle important dans le corps humain, comme antioxydant, destructeur de radicaux libres, agent préventif d'inflammation, composé aidant aussi au métabolisme des glucides, et comme régulateur du système immunitaire. De nombreuses recherches expérimentales décrivent la lutéoline comme un agent chimique qui réduit considérablement les inflammations et les symptômes du choc septique (**Jang ; 2010**).

Nous avons identifié également l'acide caféique, l'acide 3-mono-*O*-caféylquinique (acide chlorogénique); l'acide 4,5-di-*O*-caféylquinique, l'acide 3,5-di-*O*-caféylquinique et l'acide 3, 4,5-tri-*O*-caféylquinique **(Islam; 2009**).

L'acide 3-*O*-caféoylquinique, l'acide 4,5-di-*O*-caféoylquinique et l'acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique sont les inhibiteurs les plus efficaces pour des tumeurs de la peau (**Kaul; 1998**). L'acide 3, 4, 5-tri-O-caféoylquinique montre une inhibition sélective de la réplication du VIH alors que l'acide 4, 5-di-*O*-caféoylquinique avait seulement une légère activité anti VIH (**Mahmood; 1993**).

Ces polyphénols ont montré différents types de fonctions physiologiques, une activité radicalaire, une activité antimutagène, anticancereuse, antidiabètique, et antibactérienne in vitro ou in vivo, qui peuvent être utiles pour le maintien de la santé. La fonction physiologique de l'acide caféoylquinique est plus efficace avec des polycaféoyl qu'avec un monocaféoyl (**Yoshimoto; 2006**).

IV. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour nos extraits, nous avons employé la méthode au DPPH, ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piéger par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pale, cette coloration dépend de la puissance de la substance anti radicalaire.

L'activité antioxydante a été calculée sur des solutions méthanoliques des huiles essentielles de 1mg/ml et sur une gamme de concentrations des extraits par solvants (concrètes) en appliquant la relation (II.6). Les valeurs de ces activités et des absorbances sont regroupés en Annexe 2. Les résultats exprimés par la moyenne de trois mesures sont regroupés dans le tableau (III.7).

L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour toutes les concentrations préparés des extraits, que ce soit flavonoïdes ou huile essentielle.

Le parcours de la littérature a permis de voir que souvent, on exprimait le pouvoir antioxydant par la concentration inhibitrice de 50% des radicaux appelée IC50 (EC50). Cette grandeur a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations d'échantillons préparés en appliquant l'équation y= ax+b.

IC_{50} c'est la concentration qui correspond à CR% = 50.

Tableau III.7. Activité antioxydante (méthode DPPH) des extraits exprimés en pourcentage de capture du radical (%CR)

Extraits	Equations	R^2	CE_{50} ± DS (µg/ml)	$\%CR_{50}$ ± DS (%)
HE	Y = 0,007 x + 7,176	0,992	6117,71±1,04	7,53±1,32
E1	Y= 0,401x + 4,820	0,997	112,67±1,16	24,87±1,59
E2	Y=1,823x + 4,949	0,995	24,71±0,39	96,10±0,18
E3	Y= 0,321x + 13,860	0,996	112,58±0,79	29,91±2,06
E*1	Y= 0,044x + 44,760	0,996	119,09±0,51	46.96±0.42
E*2	Y= 0,076x + 6,114	0,998	577,45±1,23	9,91±1,07
BHT	74,910			

% CR_{50} : pourcentage de capture du radical du radical DPPH à une concentration de 50 µg/ml.
CE_{50} : Concentration Efficace de l'extrait pour réduire le DPPH de 50%.
Y : %CR. **x** : Concentration de l'extrait.

Au vu de ces résultats, une valeur forte d'IC_{50} indique une activité antioxydante faible. L'huile essentielle de l'*A. herba-alba* a manifesté une faible activité antioxydante %CR de 7,53% comparée à celle du BHT et une concentration efficace de l'huile pour réduire le DPPH de 50% supérieur à 6 mg/ml. Généralement, le pouvoir antioxydant est associé aux composés phénoliques.

Les résultats montrent aussi que le radical libre DPPH est efficacement inhibé par les concrètes testés. Cette activité augmente évidement avec la concentration en extraits. En effet, la capacité anti-radicalaire la plus élevée est trouvée pour l'extrait d'acétate d'éthyle avec 96,10 % d'inhibition. Les autres extraits montrent des activités voisines mineures.

Les extraits possèdent une capacité de neutralisation du radical libre DPPH puissante, puisque ils agissent à une faible dose. Ces EC_{50} sont déterminés graphiquement des trois tests séparés dont l'abscisse la concentration de l'extrait et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage (%CR) (Figures en annexe 2).

La figure (III.12) montre l'ordre d'efficacité des extraits d'*Artémisia herba-alba* et l'extrait d'acétate d'éthyle présente une capacité de capture du radical DPPH la plus importante.

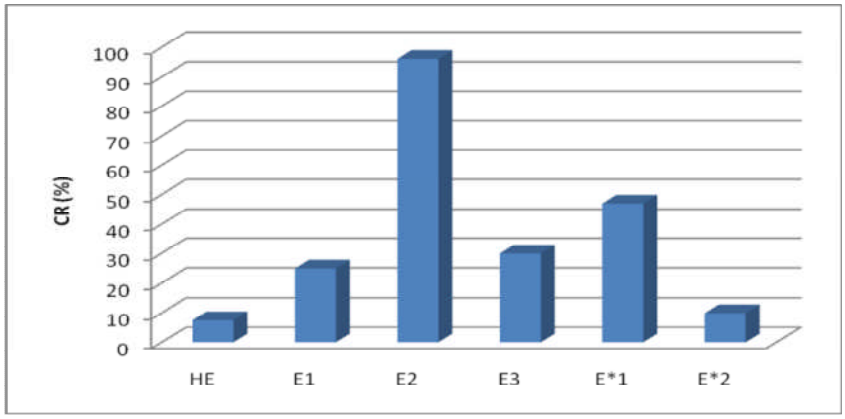


Figure III.12. Puissance antioxydante des extraits d'*Artemisia herba-alba*

L'activité antioxydante d'huile essentielle peut être liée au contenu phénolique (identifié par CG /MS). En effet l'étude comparative sur la faculté de réduction du radical DPPH par des chémotypes différents à prouvée que les chémotypes phénoliques montrent in vitro des capacités antioxydantes plus exprimées et plus fortes que les chémotypes non-phénoliques (**Mohammedi; 2006**).

Les flavonoïdes sont des excellents antioxydants naturels (**Chevaley; 2000, Mohammedi ; 2006, El kalamouni ; 2010, Heller; 1993**). Nos concrètes possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes, puisqu'ils agissent à des faibles doses (IC_{50} faible). La composition chimique est confirmée par HPLC, donc le pouvoir antioxydant puissant est expliqué par la richesse de ses extraits en composés phénoliques.

On line-HPLC-DAD

Les extraits ont été en outre évalués par on line-HPLC-DPPH (**Niederländer; 2008**) afin de déterminer avec précision les composés responsables de l'activité antioxydante des extraits. Cette méthodologie permet le repérage rapide des antioxydants dans des mélanges complexes par un mélangeur post-colonne avec des solutions radicalaires. Le signal de réduction résultant est détecté comme un pic négatif par un détecteur d'absorbance (à 515 nm pour $DPPH^{\bullet}$). Après cela, il est facile de détecter les composants actifs présents dans chaque extrait (Figures III.13 à III.16).

Les chromatogrammes on-line de la capacité de capture du radical DPPH des extraits d'*A. herba-alba* (Supérieur à 515nm et inférieur à 280 nm) montrent une activité similaire pour les deux extraits d'éther (E*1) et d'acétate d'éthyle (E2), et pratiquement un même chromatogramme pour les deux extraits butanoliques (E3 et E*2) et plus riche.

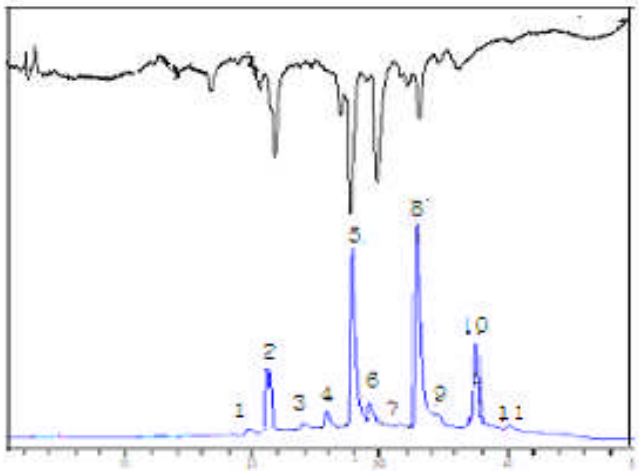


Figure III.13. Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de l'extrait (E2) (Supérieur 515nm et inférieur 280 nm)

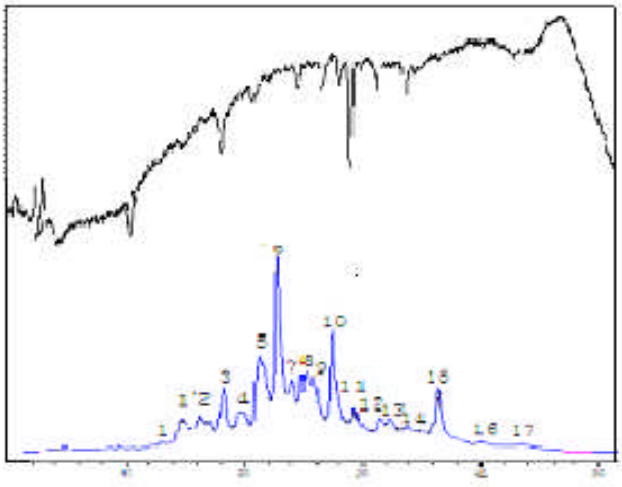


Figure III.14. Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de (E3) (Supérieur 515nm et inférieur 330 nm)

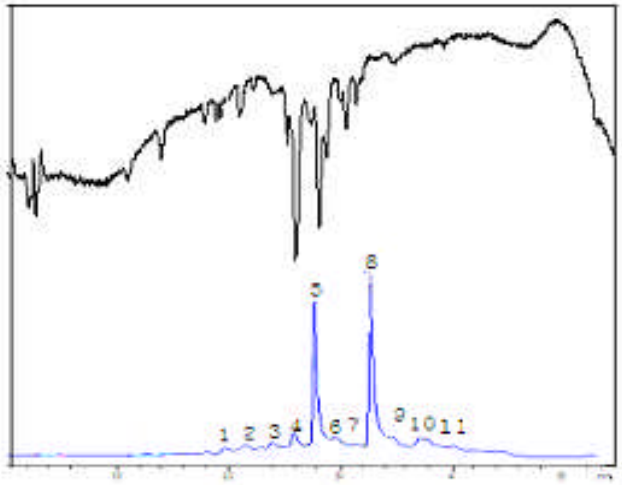


Figure III.15. Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de l'extrait (E*1) (Supérieur 515nm et inférieur 330 nm)

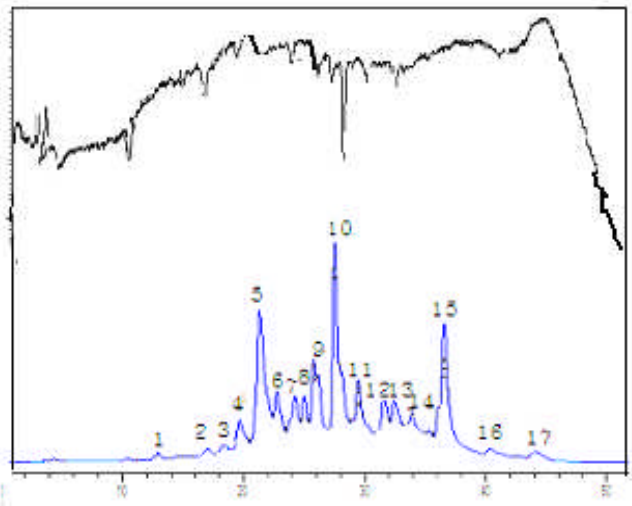


Figure III.16. Chromatogramme « on-line » de la capacité de capture du radical DPPH de (E*2) (Supérieur 515nm et inférieur 330 nm)

Conclusion

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires.
Les extraits naturels issus des plantes contiennent une variété de composés phénoliques et des huiles essentielles auxquelles on attribue des capacités antioxydantes.

L'échantillon étudié a mis en évidence une différence remarquable dans la composition chimique et les rendements d'extractions. L'huile essentielle de la partie aérienne d'*Artemisia herba-alba* a donné un rendement moyen important de 1.11% en le comparant à la littérature.

L'analyse d`essence par GC et par GC/MS, a montré des différences importantes dans sa composition du point de vu qualitatif et quantitatif. Les composés cétoniques tels que : le camphre, la chrysanthénone, le filifolone, la cis-jasmone, l'α-thujone, la β-thujone, en constituent la majeure partie.

La combinaison de la GC et de la GC/MS, nous a permis d'identifier 50 constituants, représentant 90,56 % de la composition totale pour cette essence extraite par hydrodisillation. La composition en pourcentage des principales classes de familles de ces huiles révèle qu'elle est riche en cétones 60,39%.

Cette étude nous a permis ainsi, de confirmer les hypothèses annoncées par des travaux Antérieurs **(Benjilali et Richard; 1980, Ghanmi et al; 2010, lemberge; 1982…)** notamment sur la diversité des chémotypes dont l'existence serait étroitement liée à des variations de patrimoines génétiques. Plusieurs facteurs sont responsables de cette variabilité et dont les plus importants sont le climat, le sol, la période de récolte et la méthode de conservation et d'extraction.

L'étude des polyphénols a révélé une rentabilité importante en extraits polaires (E1, E3 et E*2) et moyennement polaire (E2) de la partie aérienne de la plante ont donné les proportions les plus élevées de 27,0 à 36,5 %, en comparaison avec l`extrait apolaire (E*1) 5,5 % et; cela

peut s'expliquer par le fait que l'éther de pétrole est un solvant organique apolaire très volatil et juste utilisé pour dégraisser les drogues.

Dans le présent travail, on s'est intéressé aussi aux effets antioxydants de l'huile essentielle et des extraits bruts de l`*Artemisiaheba-alba*. Déterminer par la méthode de réduction du radical libre 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrasyl (DPPH).L'huile essentielle de l'*A.herba-alba* a manifesté une faible activité antioxydante de 7,53% comparée à celle du BHT. Les extraits surtout l'extrait d'acétate d'éthyle possède une capacité de neutralisation du radical libre DPPH puissante (96,10%), puisqu'il agit à une très faible dose 24,71 µg/ml.

La présence des polyphénols dans les extraits (E2 et E*1) possédant une activité importante est mise en évidence par HPLC. Cette dernière a permis l'identification de cinq acides phénols a savoir l'acide caféique, l'acide 3-mono-*O*-cafféylquinique (acide chlorogénique); l'acide 4,5-di-*O*-cafféylquinique, l'acide 3,5-di-*O*-cafféylquinique et l'acide 3,4,5-tri-*O*-cafféylquinique un flavonol (la quercétine) et une flavone (la luteoline).

Les extraits ont été en outre évalués par on line-HPLC-DPPH afin de déterminer avec précision les composés responsables de l'activité antioxydante des extraits**.** Cette méthodologie permet le repérage rapide des antioxydants dans des mélanges complexes par un mélangeur post colonne avec des solutions radicalaires.

Cette étude nous a permis ainsi, de confirmer les hypothèses annoncées par des travaux antérieurs **(Zouari et al ; 2010, Dahmani; 2010).** Les flavonoïdes sont des bons antioxydants naturels. Les extraits en flavonoïdes d'artemisia herba alba sont dotés d'un pouvoir anti radicalaire potentiellement élevé à son huile essentielle.

BIBLIOGRAPHIE

RÉFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

- **Adams R.P.**Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy. AlluredPubl. Corp., Carol Stream, IL. **1995**.
- **Afnor.** Association Française de Normalisation, Recueil de Normes Française « huile essentielles ». **1986**. Paris.
- **Afnor.***Huile essentielle, recueil des normes françaises*. 5èmes éditions.1.Échantillonnage et méthodes d'analyse, 2.spécifications, AFNOR.**1996**.Paris.
- **Agrobio.** Evaluer la capacité antioxydante par des tests in vitro. Cahier de paillasse du laboratoire. **2009**.
- **Agrobio.** La Mesure du pouvoir antioxydant par la méthode ORAC. Cahier de paillasse du laboratoire. **2007**.
- **Akrout A.** Étude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). Cah Options Med. **2004**,62: 289.
- **Amadou B.** Etude de la phytochimie et des activités biologiques de combretumglutinosomperr; ex dc (combretaceae). Thèse de doctorat université de Bamako**. 2004**, 15-16.
- **Amarti F., El AjjourM.i, Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Farah A., Khia A., Guedira A., Rahouti M., Chaouch A.** Composition chimique, activité antimicrobiennne et antioxydante de l'huile essentielle de *Thymus zygis*du Maroc. Phytothérapie . **2011**, 9:149-157.
- **Bandoniene D., Pukalskas A., Venskutonis P.R., et Gruzdiene D.** Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. *Food Research International*. **2000,** 33, 785-791.
- **Bendjilali B., Richard H.** Rivista Italiana. Eppos. 1980, 62, 69-74.
- **Bengacemi L, Benhenni R.** Extraction de l'artemisia herba alba (armoise blanche) poussante en Algérie. Mémoire de fin d'études de génie des procédésU.S.T.H.B.**2005**, 2-15.
- **Benhamza L.** Effets biologiques de la petite centauree*erythraeacentaurium (l.)pers* doctorat d'état en sciences vétérinaires ; université mentouri de Constantine. **2008.**
- **Benjilali B., Richard et liddle P.**Congrés International du soc. Ital. Phyto. **1984** ,131-156.

- **Benmanssour A.** Etude et valorisation de l'armoise blanche de l'ouest algérien et des noyaux de deux variétés algériennes. Thèse de doctorat d'état en chimie. Université AboubekerBelkaid. Tlemcen. **1999**.
- **Benmansour N., Hacene H.** Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* provenant de différentes régions d'Algérie. Thèse de Magister de Biologie Moléculaire Cellulaire U.S.T.H.B. **2001**.
- **Bennick A.** Interaction des polyphénols d'usine avec les protéines salivaires. Thèse de doctorat. Université se Toronto. Canada : Andres. **2002** ,184-196.
- **Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., Hadji-Minaglou F., Kaloustian J.**Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* provenant de la région de Biskra (Algérie). Phytothérapie. **2010**, 8: 277–281.
- **Boudet A. M.** L'usine chimique. 9ème conférence de l'université de tous les savoirs. France.**2000,** 1-16.
- **Brand-Williams W., CuvelierM.E. , Berset C.** Use of free radical method to evaluateantioxidant activity. Lebensm.-Wiss.-Technol**. 1995**, 28, 25–30.
- **Branen A.L.** Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1975,** *52*, 59-63.
- **BrownJ.P.** "A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids,anthraquinones and related compounds"; Mutat Res. **1980,** 75, 243-77.
- **Bruneton J.** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. *3ème Ed Tec&Doc*. *Paris*. **1999**.
- **Burgot G.** Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications; ed. TEC & DOC Lavoisier, 2eme édition; **2006**.
- **Chebil L.** Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica*et de *Pseudomonas cepacia*: études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de LORRAINE. **2006**.
- **Chevaley I.** Contribution à l'étude des phytochimiques des Saxifragacées, isolement d'antioxydants à partir de *Saxifragastellaris*L. et *Saxifragacuneifolia*L et d'un composé antifongique de *Ribesrubrum*L. Thèse de doctorat, Lausanne. **2000,** 175.
- **Crocq C., Lannion I.U.T**. Initiation au fonctionnement et à l'utilisation d'un spectromètre de masse moderne. Université de Rennes.1982.

- **Crozier A., Lean M.E.J., McDonald M.S.** "Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. J.Agric.FoodChem. **1997,** 45, 590.
- **Dahmani-Hamzaoui N**. Extraction et analyse d'huiles essentielles d'*Armoise blanche* Algérienne. Magister, U.S.T.H.B. **2004.**
- **Dahmani-Hamzaoui N., Baaliouamer A.** Chemical composition of Algerian *A.herbaalba* essential oils isolated by microwave and hydrodistillation. J. Essent. OilRes. **2009**.
- **Dahmani- Hamzaoui N.** Etude de la composition chimique de l'artemisia herba alba poussant en Algérie. Thése de doctorat .Univ. Sci.Tech.HouariBoumédiéne Alger. **2010**.
- **Djabou N.SambucusnigraL.** Une plante de la pharmacopée traditionnelle nord africaine. Thèse de magistère. Université aboubekrbelkaid . Tlemcen faculté des sciences ,département de chimie. **2006**.
- **Di Carlo, G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso,F.** "Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs" ; Life Sci. **1999**, 65, 337-353.
- **Dob T., Benabdelkader T.** Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. J Essen OilRes. **2006**, 18: 685.
- **El kalamouni Ch.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de midi-pyrénées. Thèse de doctorat de l'université de toulouse. **2010**, 47-54.
- **Feuerstein I., danin A., Segal R.** Phytochem. **1988**, 27, 433- 434.
- **Franchomme P., Pénoël D.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges**. 1990**, 445.
- **Frankel E.N., Waterhouse A.L., Teissedre P.L.** "Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and theirantioxidantactivity in inhibiting oxidation of humanlow-density- lipoproteins"; J.of Agricultural and Food Chemistry.**1995**, 43,890- 894.
- **Gee J.M., Johnson I.T.** Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry.* **2001**, **8**: 1-182.
- **Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Isamili M.R., Houti H., El Monfalouti H., Benchakroun K.H., Aberchane M., Harki L., Boukir A., Chaouch A., Charrouf Z.** Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des

huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental). Phytothérapie. **2010**, 8, 295–301.

- **Ghrabi Z., Sand RL.***Artemisia herba-alba* Asso. *A Guide to Medicinal Plants in North Africa*. **2008 ,**49- 49.
- **Gildmeister E., Hoffman FR.**Les huiles essentielles. Ed Schimmel et Cie. **1919.**
- **Giordani R., Hadef Y., Kaloustian J**. Compositions and anti-fungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. Fitoterapia. **2008**, 79: 199.
- **Grandery L .**Dictionnaire de chimie. Ed Dunod . Paris. **1974**, 81.
- **Hadouche N.** Etude et analyse des plantes algériennes Artemisiacampestris et Mentharotundifolia.Mémoire de fin d'études. Faculté de génie mécanique et de génie des procédés université des sciences et de la technologie houari Boumediene.**2011**.
- **Haouari M., Ferchichi A.** Essential oil composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia. Molecules .**2009**, 14: 1585.
- **HarborneJ.B. "**Nature, distribution, and function of plant flavonoids."; In book review: Plant Flavonoids in Biology and Medicine, Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships : Edited by V. Cody, E. Middleton and J. B. Harborne. Alan R. Liss, New York .**1986**.
- **Harborne J.B., Baxter H.** « The handbook of natural flavonoids »; Vols 1 and 2.Chichester, UK: John Wiley and Sons. **1999**.
- **Harborne J. B., Williams C. A.** advances in flavonoid research since. *Phytochimistry*.**2000**.55, 481-504.
- **Heddar S ., Kaoua G.** Extraction de l'huile essentielle de Thym Algérien sis par entraînement à la vapeur. Contribution à son étude cinétique et analytique. PFE. U.S.T.H.B.**1993**.
- **Hellal Z.** Contribution à l'étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus.Application sur la sardine (sardina pilchardus).Thése de magister en biologie . UMMTO**.2011**,8.
- **Heller W.** "Flavonoid biosynthesis"; In book review : Plant Flavonoids in Biology and Medicine, Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships : Edited by V. Cody, E. Middleton and J. B. Harborne. Alan R. Liss, New York. **1986**.

- **Heller W., Forkmann G.** Biosynthesis of flavonoids. In: Harborne, J.B. (Ed.), « The Flavonoids: Advances in Research since 1986 ». Chapman & Hall, London, pp. **1993**, 499–535.
- **Hertog M.G.L., Hollman P.C.H., Venema D.P.** "Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits."; J Agric Food Chem. **1992** , 40,1591.
- **Hudaib M., Aburjai T**. Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan. J Essen Oil Res. **2006**, 18: 301.
- **Hutzler P., Fishbach R., HellerW., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M.,Weissenböck G. et Schnitzler J. P.** Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scaning microscopy. *Journal of experimental botany*. **1998**, 49(323): 953- 965.
- **Islam I., Shaikh A.U., Shahidul I.M.** Antioxidative and antimutagenic potentials of phytochemicals from *Ipomoea batatas* (L.) Lam. International Journal of Cancer Research. **2009**, 5 (3), 83-94.
- **Jang S., coll.** "LuteolinInhibitsMicroglia and AltersHippocampal-Dependent Spatial Working Memory in Aged Mice"; J. Nutr**.** October 1.**2010**, 140 (10), 1892-1898.
- **Kaul A., Khanduja K.L.** Polyphenolsinhibitpromotional phase of tumorigenesis: relevance of superoxideradicals. Nutrition and cancer. **1998** , 32 (2), 81-5.
- **Khafagy S. M., Gharbo S. A., Sarg T.M.** Planta médicinal.**1971,** 20, 90-96.
- **Kong J.M., Chia L.S., Goh N.K., Chia T.F., Brouillard R.** "Analysis and biological activities of anthocyanins"; Phytochemistry. **2003** , 64, 923- 933.
- **Langley-Evans SC.** "Antioxydant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay." Int J Food ScNutr. **2000**, 51, 181-188.
- **Lattaoui N.** Pouvoir antimicrobien des huilles essentielles de trois espèces de thym à profils chimiques différents. Thèse de Doctorat de 3éme cycle. Option Microbiologie, Ecole Nationale Supérieure, Rabat. Maroc.**1989**.
- **Lemberge S.** Artemisia herba alba .Perfumeran flavorist. **1982**, 7, 58-63.
- **Liu R.H.** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. J. of Nutrition. **2004,** 134, 3479–3485.

- **Mahmood N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Bruke A., Hay A.** Inihibition of HIV infection by flavonoides. Antivir. Res. 1993, 46(7), 1257-1271.
- **Martin A.J.P., Synger R.L.M.***Biochemistry Journal*. **1941**, 35, 1358-1368.
- **MazzaG., Miniati E.**"Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains"; Boca Raton, CRC Press .**1993**.
- **Mengel P., Beh D., Bellido G.M., Monpon B.** VHMD: extraction d'huile essentielle par micro-ondes. Parfums Cosmétiques Arômes .**1993**, 114, 66-67.
- **Middleton Jr. E., Kandaswami C., Theoharides T.C**.The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heartdisease, and cancer. PharmacologicalReviews. **2000,** 52, 673–751.
- **Miguel J.D., Richard H.M., Agric J.** Food.Chem.**1976**, 24,833.
- **Mohammedi Z.** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magister. Université Tlemcen. **2006**.
- **Montoro P, Barara A, Pizza C, De Tommasi N.** structure antioxydante activety relationships of flavonoids isolated from diffrent plant spaices food chemistry. 2005;349-355.
- **NavesY.R.** Technologie et chimie des parfums naturels ; Ed. Masson ; Paris. **1974.**
- **NIST.** National Institute of Standards and Technology, PC version 1.7 of the NIST/EPA/NIH Mass spectral library. The Perkin Elmer Corporation. **1999**.
- **Nostro A., Germano M.P., D'Angelo V., Marino A., Cannatelli M.A.** Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lettres en microbiologie appliquée. **2002,** 30(5), 379.
- **Paris R., Moyse M.** Précis de matière médicale. *Edit. Masson. Paris*. **1965**, 412.
- **Pengelly A.** "The constituents of Medicinal Plants: An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medecine." CABI publishing. **2004**.
- **Perrin A., Colson M.** L'appareil sécréteur chez les menthes : modalités de stockage des essences dans les glandes à tête pluricellulaire: Les menthes en France ; aspects scientifiques, économiques et industriels. Univ. Claude Bernard. Lyon. **1985**, 200 – 205.

- **Piochon M.** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire présenté à l'université du québec à chicoutimi .**2008**, 7-10.
- **Piquemal G.** Les flavonoïdes (en ligne) : http://www.detoursante.com/index.php? Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215'**.2008**.
- **Salido S, Valenzuela LR, Altarejos J, et al**. Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. BiochemSystEcology. **2004**, 32: 265.
- **Trabut L.** Précis de botanique médicale, 2ème Ed, Masson et Cie Paris. **1988**.
- **Tranchant J.**Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse 3ème Ed.**1982**.
- **Tranchant J.** Manuel. Pratique de chromatographie en phase gazeuse 4ème Ed.1995, 466.
- **Urquiaga I., Leighton F**. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*. **2000**, 33(2): 55- 64.
- **Valnet J.** Aromathérapie traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. France. **1984**, 10, 23 – 178.
- **Van Den Dool H., Kratz P.D.** "Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatogr. **1963**, 11, 463-471.
- **Veitch N.** "Isoflavonoids of the Leguminosae"; Nat. Prod. Rep. **2007**. 24, 417- 464.
- **Verhoeyen M. E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., De Vos C. H. R. etColliver S.** Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany* . **2002**, 53(377): 209 -210.
- **Werker E., Putievsky E., Ravid U.** The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgar L*. Journal Annals of Botany. **1985**, 55, 793-801.
- **Yoshimoto M., Kurata R., Okuno S., Ishiguro K., Yamakawa O., Tsubata M., MoriS.,Takagaki K.** Nutritional value and physiological functions of *Sweetpotatos leaves.* Acta Horiculturae. **2006**, 703, 107-116.
- **Zouari S., Zouari N., Fakhfakh N., Bougatef A., Ayadi M. A. Neffati M.** Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herbaalba* Asso. Journal of Medicinal Plants Research. 2010, 10, 871-880.

ANNEXES

Tableau A.1. Evolution de la teneur en eau de la partie aérienne de l'*Artémisia herba- alba*

Temps (jours)	Ech1 (g)	Ech2 (g)	Ech3 (g)	W 1	W 2	W 3	W moy
0	-	-	-	-	-	-	-
1	5.96	5.70	4.55	1,199	1,111	1,241	2,724
2	3.90	3.71	3.05	0,439	0,374	0,502	0,981
3	3.33	3.45	2.58	0,229	0,278	0,271	0,597
4	3.01	3.15	2.25	0.111	0.167	0.108	0.313
5	2.8	2.91	2.08	0.033	0.078	0.025	0.119
8	2.71	2.70	2.03	0.000	0.000	0.000	0.000
9	2.71	2.70	2.03	0.000	0.000	0.000	0.000
10	2.71	2.70	2.03	0.000	0.000	0.000	0.000

Tableau A.2. Evolution de taux d'humidité de la partie aérienne de l'*Artémisia herba - alba*

Temps (jours)	Ech 1 (g)	Ech 2 (g)	Ech 3 (g)	TH1 (%)	TH2 (%)	TH3 (%)	TH Moy %
0	-	-	-	-	-	-	-
1	5,96	5,7	4,55	54,53	52,63	55,38	54,18
2	3,9	3,71	3,05	30,51	27,22	33,44	30,39
3	3,33	3,45	2,58	18,62	21,74	27,09	22,48
4	3,01	3,15	2,25	9,97	14,29	10,84	11,70
5	2,8	2,91	2,08	3,21	7,22	2,46	4,30
8	2,71	2,7	2,03	0,00	0,00	0,00	0,00
9	2,71	2,7	2,03	0,00	0,00	0,00	0,00
10	2,71	2,7	2,03	0,00	0,00	0,00	0,00

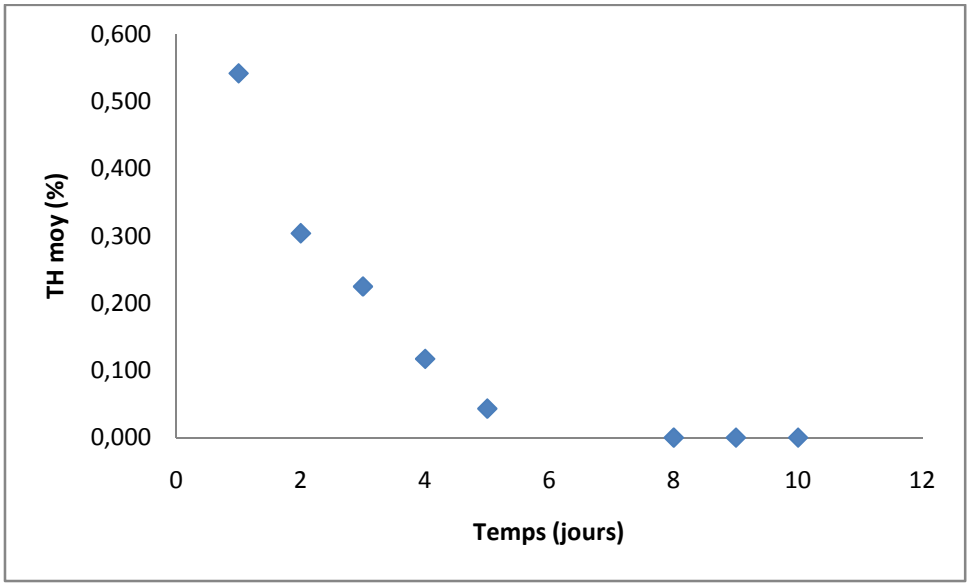


Figure A.1. L'évolution des taux d'humidité en fonction du temps

Tableau A. 3. Evolution de la vitesse de séchage de l'*A. herba-alba* en fonction du temps

Temps (jours)	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**8**	**9**	**10**
-dw/dt	2,39	0,475	0,316	0,209	0,116	0,000	0,000	0,000

Tableau A.1. Evaluation de la capacité de capture du radicale DPPH (l'huile essentielle)

Extraits	Concentration (µg/ml)	Abs	CR moy(%)
HE	25	0 ,514	7,2
	50	0,513	7,56
	100	0,508	8,00
	200	0,506	8,65
	300	0,501	9,60
	500	0 ,495	10,81

Tableau A.2. Evaluation de la capacité de capture du radicale DPPH des extraits par HCL

Extraits	C (µg/ml)	CR %			CR(%)moy± DS (%)
Ether de pétrole	100	52,36	50,54	48,58	50,01 ±1.89
	150	50 ,89	50,33	50,59	50,60±0.28
	1000	90,56	88,69	88,74	89, 33±1.06
n-Butanol	100	10,52	11,63	10,70	10,95±0.59
	150	21,53	20,66	19 ,56	20 ,58±0.62
	1000	82 ,70	83,00	81,78	82 ,49±0.86

Tableau A.3. Evaluation de la capacité de capture du radicale DPPH des extraits par l'éthanol

Extraits	C (µg/ml)	CR(%)			CR(%)moy± DS (%)
Ethanol	50	24,87	22,96	25,82	24,55±1.46
	100	46,46	46,00	46,16	46,20±0.23
	160	67,60	66,53	67,27	67,13±0.55
	200	85 ,83	85,28	86,01	85,70±0.52
Acétate d'éthyle	15	29,43	30,52	31,05	30,33±0.83
	20	43 ,61	42,96	42,75	43,10±0.15
	40	78,44	80,42	80,04	79,63±0.05
	50	94,84	94,56	94,38	94,59±0.23
n-Butanol	50	30,48	31,95	31,09	31,17±0.74
	100	42,65	44,89	44,77	44,10±1.26
	160	66,23	66,40	65,44	66,02±0.51
	200	77,85	79,38	77,58	78,27±0.97

Abs : absorbance ; C : concertation ; CR % : pourcentage de capture du radical DPPH

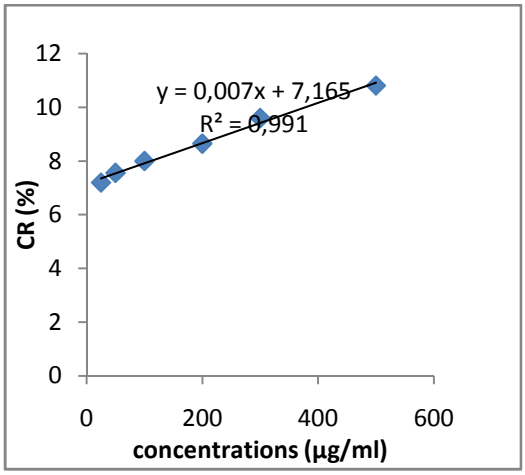


Figure A.1. Courbe de capture du radical DPPH de l'huile essentielle d'*A-herba alba*.

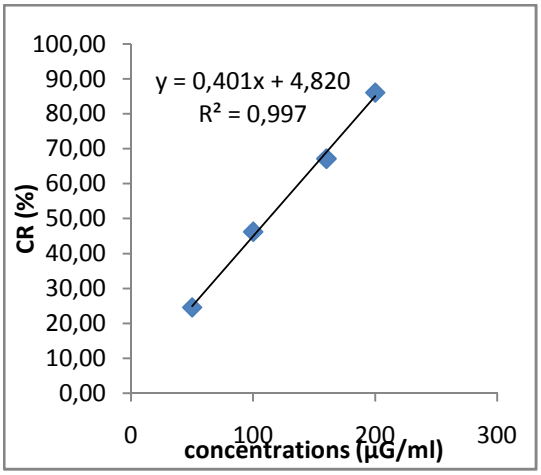


Figure A.2. Courbe de capture du radical DPPH d'extrait d'éthanol (E1).

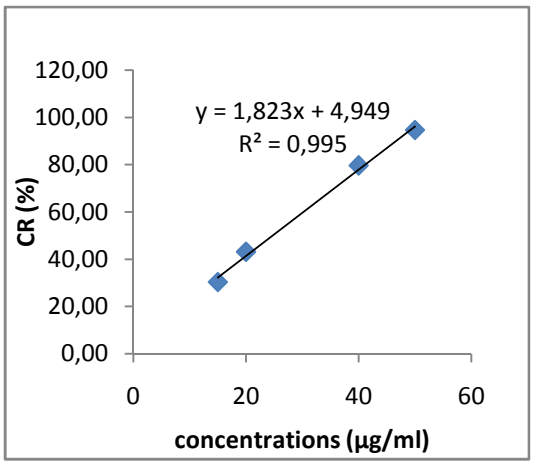


Figure A.3. Courbe de capture du radical DPPH d'extrait d'acétate d'éthyle (E2).

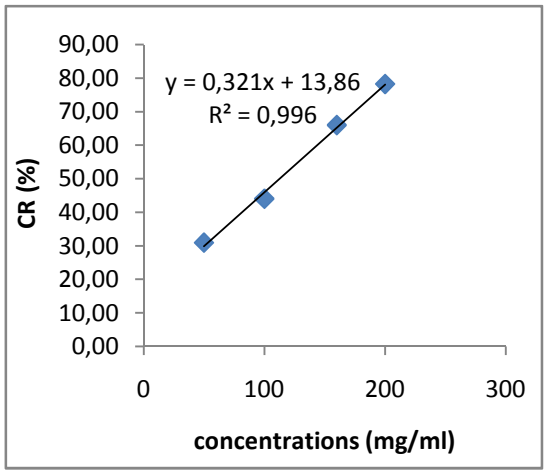


Figure A.4. Courbe de capture du radical DPPH d'extrait de butanol (E3).

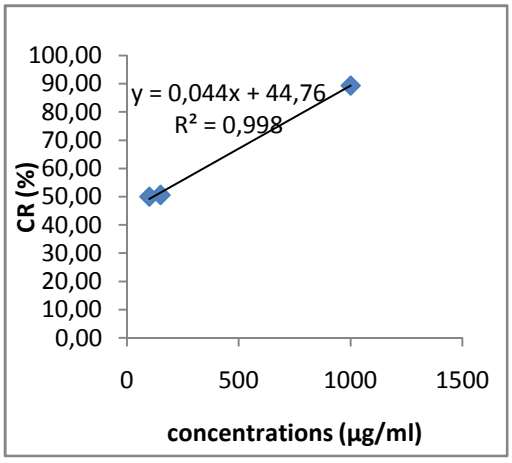


Figure A.5. Courbe de capture du radical DPPH d'extrait d'éther de pétrole (E*1).

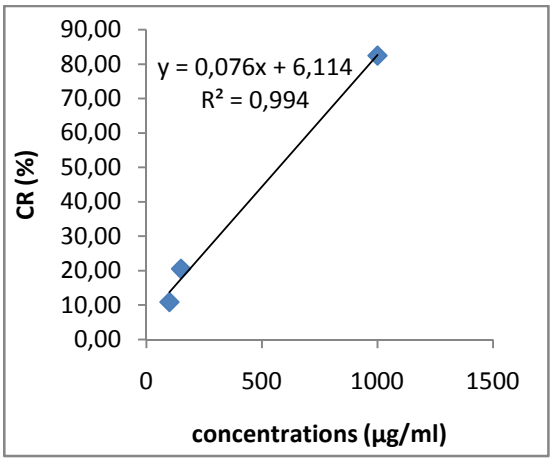


Figure A.6. Courbe de capture du radical DPPH d'extrait de butanol (E*2).