



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



ECOLE NATIONNALE POLYTECHNIQUE
Département du Génie de l'Environnement

Centre de recherche scientifique et technique
en analyse physico-chimique (CRAPC)

Mémoire de Magister en Ingénierie & Environnement

Option : biotechnologie et environnement

Présenté par :

AISSA Abdallah

Intitulé

Application des ultrasons et des procédés membranaires pour la purification de l'Artemisinin et de ses analogues à partir de *l'Artemisia annua L*

Membres du jury

Mr. MAMERI Nabil	Professeur à l'ENP	président
Mr. CHEMAT Smain	Directeur de recherche -CRAPC-	directeur de mémoire
Mr. LOUNICI Hakim	Professeur à l'université de Bouira	examineur
Mr. BENYOUCEF Elhadi	Professeur à l'ENP	examineur
Mr. AROUS Omar	Directeur de recherche -CRAPC-	invité

ENP 2012

الأرتيميسينين هو لاكتون سيسكتريني مستخرج من أوراق نبتة أرتيميزيا أنبوا وهو مضاد فعال جدا ضد الملاريا، وهو موصى به من طرف (م ع ص) في صناعة المشتقات النافعة ضد الملاريا.

في هذا العمل اهتمنا باستعمال تقنية ما فوق الصوتية لتحسين مردودية استخراج الأرتيميسينين من أوراق النبتة. النتائج بينت تحسن واضح في مردود وسرعة الاستخراج مقارنة بالتقنية الكلاسيكية (التنقيع تحت درجة حرارة مرتفعة). بالإضافة إلى ذلك استعملنا التقنيات العشائية تحت هدف تحسين تصفية المبدأ الفعال من خلال تكييف حجم المسامات حسب حجم المبدأ الفعال الأرتيميسينين. النتائج مكنت من إزالة معتبرة للكوروفيل دون تضييع الأرتيميسينين، وهذا عكس النتائج المحصل عليها من خلال استعمال الفحم والسيليت حيث ضياع الكثير من المبدأ الفعال المستخرج. بالإضافة إلى ذلك النتائج بينت تحسن في نقاوة البلورات باستعمال غشاء ثلاثي الأسينات السيلولوزي.

الكلمات المفتاحية: ما فوق الصوتية - أرتيميسينين - أرتيميسيا أنبوا - غشاء - ملاريا

Résumé :

L'artémisinine, une lactone sesquiterpénique peroxydée, extraite des feuilles d'*Artemisia annua* L., est considéré comme un anti-malarien très puissant et a été recommandée par l'OMS dans les combinaisons thérapeutiques (ACT) contre le paludisme.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des ultrasons pour l'amélioration du rendement d'extraction de l'artémisinine à partir des feuilles d'*Artemisia annua* L. Les résultats montrent une nette augmentation du rendement et de la vitesse d'extraction en comparaison avec la technique conventionnelle (macération à chaud).

Par ailleurs, nous avons fait appel à des procédés membranaires dans l'objectif d'améliorer le rendement de purification du principe actif et ceci en adaptant la taille des pores lors de la synthèse des membranes avec celle de l'artémisinine. Les résultats rapportent une élimination significative de la chlorophylle sans noter une perte de l'artémisinine et ceci contrairement à l'adsorption sur charbon actif et célite où nous avons relevé une perte considérable du principe actif. Par ailleurs, les résultats montrent aussi une amélioration de la pureté des cristaux obtenus en utilisant les membranes à base triacétate de cellulose.

Mot clés : Ultrasons – Artemesinin – Artemisia annua L – membrane - Malaria

Abstract :

Artemisinin, a sesquiterpene lactone, represents the active pharmaceutical ingredient against malaria in *Artemisia annua* L. and is the main precursor to produce derivatives Artemisinin-based Combination Therapies (ACT).

In this work, we were interested in the use of ultrasound for the recovery of artemisinin from *Artemisia annua* L. leaves. The results have shown that a significant increase in yields and extraction rate in comparison to the conventional technique (hot maceration). In addition, the application of a membrane-based purification process with a tailored pore size as regards to artemisinin molecular size. The results indicate that triacetate cellulose membranes have engendered the removal of chlorophyll without hindering the recovery of artemisinin unlike adsorption with charcoal and celite where a lot of loss is encountered. Furthermore, using these membranes helped an improvement in the purity of the crystals.

Keywords : ultrasound – Artemesinin – Artemisia annua L – membrane - Malaria

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers :

A ma mère

A mon père

A mes frères et mes sœurs

A mes nièces et mes neveux

A toute la famille AISSA

Merci pour votre patience et vos encouragements

Abdellah

Remerciements

Avant d'exposer les résultats de cette étude, je tiens à rendre grâce à DIEU qui m'a donné la force et les capacités de surmonter toutes les épreuves le long de ma vie estudiantine, et à exprimer ma profonde et sincère gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont œuvré pour la réalisation de cet ouvrage.

Ce travail a été effectué au centre de recherche scientifique et technique en analyse physico-chimique (CRAPC) sous la direction du docteur **Smain CHEMAT**, directeur de recherche et chef de la division santé au centre. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire et sa prise en charge, avec efficacité et ténacité, pour son suivi de ce travail et la sollicitude constante avec grande compétence scientifique qu'il m'a témoigné lors de l'accomplissement de ce travail. Je le remercie également pour le soutien scientifique qu'il m'a accordé, et pour avoir facilité l'achèvement de cette thèse dans de meilleures conditions et surtout pour sa disponibilité toutes les fois que le besoin se faisait sentir.

J'adresse mes très respectueux remerciements à Monsieur **Omar AROUS**, Directeur de Recherche au CRAPC, qui a dirigé la partie membranaire de ce travail avec une attention constante, sa grande disponibilité, son encadrement assidu, sa grande compétence scientifique, son aide permanente, ses encouragements ont permis de mener à bien ces recherches. Je le remercie infiniment pour toute l'attention qu'il a portée à ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur **Nabil MAMERI**, professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique (ENP), pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, et de m'avoir fait l'honneur d'être le président de jury.

Je suis particulièrement reconnaissant à Monsieur **Hakim LOUNICI**, Professeur à l'université de Bouira, pour l'honneur qu'il me fait en accédant à ma demande pour juger ce mémoire.

J'aimerais aussi remercier très sincèrement Monsieur **Elhadi BENYOUCEF**, professeur à l'ENP, pour bien vouloir être membre de ce jury.

Je tiens aussi à remercier **M^{me} Nassima CHEMAT**, pour sa patience et le temps qu'elle a consacré pour l'analyse par HPLC de mes échantillons, Je la remercie infiniment pour toute l'attention qu'elle a portée à mon travail, je vous suis infiniment reconnaissant.

Mes sincères remerciements à **Abdenmour BOUMECHHOUR** pour son aide précieuse et pour ses conseils, surtout dans la partie extraction et analyse.

J'exprime mes remerciements à tous les ingénieurs et les techniciens du CRAPC, pour l'aide et l'atmosphère amicale qu'ils ont su créer et pour les encouragements qu'ils m'ont toujours manifestés.

Je dédie enfin ce travail à mes amis et à tous ceux qui m'ont aidé tout au long de ma vie.

Sommaire

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux	iii
Abréviation	iv
Introduction.....	1

CHAPITRE I : L'Artemisinin

I.1. Généralités.....	3
I.2. Prévention contre le paludisme.....	3
I.3. Le traitement du paludisme.....	4
Les schizonticides:	5
Les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétaboliques:.....	5
Les gamétocides:	5
I.4. Développement de résistance aux antipaludiques.....	5
I.5. Associations médicamenteuses.....	6

CHAPITRE II : *Artemisia annua* L

II.1. Historique.....	8
II.2. Description de la plante d' <i>Artemisia annua</i> L.	8
II.2.1. Données botaniques.....	8
II.2.2. Données phytochimiques.....	9
II.2.2.1. Généralités.....	9

II.2.2.2. Etude de la composition chimique.....	10
a- Les terpenoïdes.....	11
b- Les huiles essentielles.....	11
c- Les flavonoïdes et les coumarines :	11
d- Composés divers.....	11
II.3. L'artémisinine.....	12
II.3.1. Production.....	12
II.3.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	13
II.4. Les procédés d'extraction d'artémisinine.....	15
II.4.1. Les procédés d'extraction par solvants conventionnels.....	15
II.4.1.1. Extraction par l'hexane.....	16
II.4.1.2. Extraction par l'éthanol.....	16
II.4.2. Les procédés d'extraction par solvants alternatifs.....	16
II.4.2.1. Extraction par liquide ionique.....	16
II.4.2.2. Extraction avec CO ₂ supercritique.....	17
II.4.2.3. Extraction par l'hydrofluorocarbon HFC-134a.....	17
II.4.2.4. Comparaison de l'efficacité d'extraction pour différents solvants.....	18
II.4.3. Procédés d'extractions innovants.....	20
II.4.3.1. Le Soxhlet.....	21
II.4.3.2. Extraction assistée par micro-onde.....	21
II.4.3.2.Extraction par ultrasons.....	21
a- Principe.....	22

b- Mode d'action.....	23
c- Les ultrasons dans l'extraction.....	24
II.5.Purification de l'artémisinine.....	26
II.5.1.Purification par cristallisation.....	26
II.5.2.Purification par partition liquide-liquide.....	27
II.5.3.Purification par charbon actif.....	28
II.5.4.Purification par la technique chromatographique.....	28
II.5.5.Purification par procédés membranaires.....	29
II.5.5.1. Classification des membranes.....	30
1. Nature.....	30
Membranes minérales :	30
Membranes organiques :	30
2. Porosité.....	30
Membranes poreuses :	30
Membranes denses :	31
Membranes liquides:	31
3. Fabrication.....	31
Membranes isotropes (symétriques) :	31
Membranes anisotropes (asymétriques) :	31
Membranes composites	31
4. Géométrie.....	32
Module plan :	32
Module tubulaire :	32
Module spirale :	
Module creux :	33
II.5.5.2.Types de procédés membranaires.....	33
a. Les procédés baro-membranaires.....	33

La microfiltration :	33
L'ultrafiltration :	33
La nanofiltration :	34
b. Les procédés électro-membranaires.....	34
c. Les procédés chimio-membranaires (dialyse)	35
d. Les procédés thermo-membranaires (distillation sur membrane)	35
II.5.5.3. Avantages et limitations des méthodes de séparations membranaires.....	35

Chapitre III : PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. Matériel	38
III.2. Méthodes.....	38
III.2.1. Techniques d'extraction conventionnelle (macération à chaud)	38
III.2.2. Extraction sous ultrasons.....	38
III.2.3. Traitement de l'extrait.....	39
III.2.4. Elaboration des membranes.....	41
III.2.4.1. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)	41
III.2.4.2. Caractérisation de la membrane élaborée par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR):	42
III.2.4.3. Caractérisation par diffraction de rayon X.....	44
III.2.5. Techniques d'analyses de l'artémisinine.....	44
III.3. Résultats et discussion.....	46
III.3.1. Courbe d'étalonnage.....	46
III.3.2. Influence de la technique et de la température sur le rendement d'extraction.....	46
III.3.3. Etude cinétique.....	48

Sommaire

III.3.3.1. Energie d'activation.....	49
III.3.4. Purification de l'artémisinine.....	50
III. 3.4.1. Traitement par charbon actif et cérite.....	50
III.3.5. Traitement par les procédés membranaires.....	51
III.3.5.1. Membrane commerciale de polypropylène.....	51
III.3.5.2. Traitement par la membrane de triacétate de cellulose.....	52
III.4. Modélisation des données cinétiques.....	55
III.4.1. Calcul du coefficient de diffusion.....	55
Conclusion.....	60
Référence	61

La liste des figures

Figure (1) : feuille de la plante d' <i>Artémisia annua</i> L.....	9
Figure (2) : Champs de culture de l' <i>Artemesia annua</i> L. en chine.....	9
Figure (3) : Schéma représentant le rôle des métabolites secondaires dans la plante.....	10
Figure (4) : Structure de l'artémisinin.....	12
Figure (5) : comparaison multi-objectifs des technologies d'extraction d'artémisinine.....	19
Figure (6) : domaines d'utilisation des ultrasons en fonction de fréquence.....	22
Figure (7) : progression de l'onde sonore dans un milieu.....	23
Figure (8) : Schéma d'un dispositif à ultrason : bac (a) et sonde (b).....	26
Figure (9) : Schéma résumant la procédure industrielle de purification de l'artémisinine....	27
Figure 10 : Sélectivité d'une membrane.....	30
Figure 11 : Différents types de membranes selon leur structure.....	32
Figure 12 : Système d'extraction sous ultrasons avec contrôle de température du réacteur...39	
Figure 13 : description du procédé d'extraction et de purification.....	40
Figure 14 : La formule chimique semi-développée du plastifiant dioctylephtalate (DOP)....	41
Figure 15 : la morphologie de la membrane TAC observée par MEB.....	42
Figure 16 : Spectre FTIR de la membrane TAC+DOP.....	43
Figure 17 : Spectre de diffraction-X de la membrane TAC+DOP.....	44
Figure 18 : Courbe d'étalonnage de l'artémisinin.....	46
Figure 19 : Influence de la température et la technique sur la cinétique d'extraction.....	47
Figure 20 : Les pertes d'artémisinin dans les étapes de purification par le charbon actif et la célite.....	50

Figure 21 : Influence de la membrane commerciale en polypropylène sur le rendement de purification des différents extraits par la technique conventionnelle.....51

Figure 22 : Influence de la membrane commerciale en polypropylène sur le rendement de purification des différents extraits par la technique d’ultrason.....51

Figure 23 : Influence de la membrane élaborée en triacétate de cellulose sur le rendement de purification des différents extraits par la technique conventionnelle.....53

Figure 24 : Influence de la membrane élaborée en triacétate de cellulose sur le rendement de purification des différents extraits par la technique d’ultrasons.....53

Figure 25 : Tracé du $\ln(C_{\infty}/C_{\infty}-C)$ en fonction du temps.....58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de l'artémisinine.....	14
Tableau 2 : Solubilité d'artémisinine à différentes températures.....	15
Tableau 3 : Comparaison entre différents solvants d'extraction.....	19
Tableau 4 : Applications des ultrasons de puissance dans l'industrie agroalimentaire.....	24
Tableau 5 : Procédés Baro-membranaire.....	34
Tableau 6: Quelques caractéristiques des trois membranes utilisées.....	41
Tableau 6: Quelques caractéristiques des trois membranes utilisées.....	41
Tableau 7 : Attribution des groupements fonctionnels correspondants aux longueurs d'ondes.....	43
Tableau 8 : Influence de la température sur les rendements d'extractions à l'équilibre.....	47
Tableau 9 : Résultats du calcul de l'énergie d'activation (E_a) des deux systèmes.....	49
Tableau 10 : Résultats des analyses de puretés des cristaux d'artémisinine.....	52
Tableau 11 : Résultats de pourcentage de pureté des cristaux d'artémisinine issus de traitement par la membrane TAC.....	54
Tableau 12 : Coefficient de diffusion de l'artémisinine pour les techniques utilisées.....	59

Abréviation

US : ultrason

Conv : conventionnelle

ACT : artémisinin-based Combination Therapy (combinaison thérapeutique à base d'artémisinin)

MII : moustiquaires imprégnées d'insecticides

OMS : organisation mondiale de la santé.

DDT : dichloro-diphényl-trichloroéthane

HFC : hydrofluorocarbon

PS : polysulfones

PAN : polyacrylonitriles

PVDF : polyfluorures de vinylidène

pH : pouvoir d'hydrogène

BC : before Christ (avant Jésus-Christ)

MEC : les membranes échangeuses de cations

MEA : les membranes échangeuses d'anions.

PP : polypropylène.

PTFE : poly-tetrafluoro-éthylène

HPLC: High-performance liquid chromatography

UV: ultraviolet.

TAC : triacétate de cellulose

DOP : dioctylephtalate.

MEB : microscopie électronique à balayage.

FTIR : Fourier transform infrared spectroscopy (la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier)

DRX : diffraction des rayons X

HPLC-ELSD: chromatographie liquide à haute performance avec détecteur à évaporation de lumière.

HPLC-UV : chromatographie liquide en phase liquide a haute performance avec détecteur à ultraviolet.

ELSD : detecteur Evaporative Light Scattering Detectors (détecteur de dispersion de lumière par évaporation)

RI : infra-rouge

LC-MS : chromatographie liquide couplé au spectrométrie de masse.

RMN : résonance magnétique nucléaire.

CRAPC : centre de recherche scientifique et technique et analyse physico-chimique:

Ea: Energie d'activation

V : vitesse d'extraction mg/g/ml

C : concentration en mg/g

K : constante de vitesse.

K⁰ : constante de vitesse à l'étape initiale.

R : constante des gaz parfaits $8,314 \text{ j.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$;

D : coefficient de diffusion

Introduction

Au cours des dernières années, l'utilisation de produits commercialisés renfermant des principes actifs naturels (phytosanitaires, suppléments et additifs alimentaires, préservatifs, colorants, agents cosmétiques, ...), est en progression constante. En raison d'une demande croissante par des consommateurs exigeants, de plus en plus de substances issues de synthèse chimique sont substituées par des analogues d'origine naturelle, soit pour des raisons de santé, ou bien pour des contraintes d'ordre économique et environnemental.

Parmi les plantes médicinales sources de principes actifs, on peut citer le cas de l'*Artemisia annua* L. renfermant en son sein de l'artémisinine, un agent anti-malarien puissant. Cette molécule est obtenue par extraction à partir des feuilles et représente, seule ou en combinaison, l'un des traitements les plus efficaces contre le paludisme.

En effet, plusieurs étapes de purification onéreuses sont indispensables afin d'améliorer la pureté de l'artémisinine et de diminuer les pertes lors de longues étapes de séparations. Pour cela, les techniques membranaires, qui sont déjà largement adoptées en industrie agro-alimentaire, pharmaceutique et dans les traitements des eaux, se présentent comme des méthodes alternatives justifiant d'une grande appréciation au milieu industriel du fait de leur grande sélectivité et leur faible consommation énergétique. En outre, les conditions particulièrement douces de fonctionnement de température et l'absence de changement d'états font partie des avantages de ces procédés. Néanmoins, ces procédés appliqués à l'industrie pharmaceutique doivent être considérés comme des technologies avancées. Leur installation et leur mise en œuvre a besoin d'une expertise particulière afin d'obtenir des procédés industriels extrêmement performants, reproductibles et économiques.

Dans la première partie de cette étude, nous nous sommes intéressés à utiliser les ultrasons comme une méthode alternative à la méthode conventionnelle utilisant un chauffage classique lors de l'extraction de l'artémisinine à partir des feuilles d'*Artemisia annua* L.

Par ailleurs, nous avons fait appel dans la seconde partie de notre travail à des procédés membranaires dans l'objectif d'améliorer le rendement de purification et ceci en adaptant la taille des pores de ces membranes avec ceux de nos principes actifs en utilisant des données issues de calculs théoriques du volume moléculaire du principe actif en l'occurrence l'artémisinine. Dans cet esprit, les résultats relevant de la purification et de la cristallisation permettront aussi de distinguer les avantages de chaque méthode d'extraction.

CHAPITRE I

L'Artemisinin

I.1. Généralités

Le paludisme est une maladie parasitaire potentiellement mortelle transmise par des moustiques. On pensait à l'origine que cette maladie provenait des zones marécageuses, d'où le nom paludisme dérivé du non ancien « palud » qui signifie « marais ». Par ailleurs, le mot malaria, dérivé du mot italien « mal aria » qui signifie « mauvais air », trouve son explication dans la maladie étant provoquée par la respiration des aires éventée autour des marais.

Ce n'est qu'en 1880 que les scientifiques ont pu découvrir la véritable cause du paludisme, en l'occurrence un parasite unicellulaire du genre *plasmodium*. Ils ont ensuite découverts que ce parasite était transmis d'une personne à une autre par des piqûres d'un moustique anophèle femelle, qui a besoin de sang pour nourrir ces œufs.

Parmi les espèces relevant du genre *Plasmodium*, on distingue l'espèce la plus courante et la plus étudiée : *Plasmodium falciparum*, où l'infection par ce parasite est très répandue en Afrique subsaharienne avec un taux de mortalité extrêmement élevé (**K. Mendis et al., 2001**).

Avec le SIDA et la tuberculose, c'est actuellement l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité dans le monde. Actuellement, environ 40% de la population mondiale sont exposés au paludisme, englobant essentiellement les pays de faible produit intérieur brut (PIB). Le paludisme touche aujourd'hui les régions tropicales et subtropicales et il est responsable chaque année de plus de 300 millions de cas de maladie aiguë (225 millions en 2009) et d'au moins un million de décès (781000 en 2009), dont 90% des ces décès surviennent en région subsaharienne d'Afrique.

I.2. Prévention contre le paludisme

La prévention est l'un des piliers de la stratégie mondiale contre le paludisme. En l'absence de vaccin efficace contre le paludisme, elle repose sur la lutte contre les vecteurs et sur la chimio-prophylaxie limitée par la résistance aux médicaments.

Le principal objectif de la lutte anti-vectorielle contre le paludisme réside dans la réduction à la fois le nombre d'individus infectés et le taux d'infection par le parasite, ainsi que les épisodes cliniques en luttant contre le moustique vecteur et en réduisant et/ou en interrompant sa transmission. Dans ce cas, les principales interventions opérationnelles consistent à la distribution des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MII) ; environ 289 millions d'MII ont été distribués entre 2008 et 2010 en Afrique sub-saharienne afin de couvrir 76% des 765

millions de personnes à risque de paludisme. En 2010, on estimait qu'au moins 42% des ménages en Afrique possédaient au moins une MII, et que 35% des enfants ont dormi sous une MII, nettement au-dessous de l'objectif fixé par l'Organisation mondiale de la Santé de 80% (OMS, 2010).

D'autres préventions anti-vectorielles existent aussi, on peut citer par exemple la pulvérisation intra-domiciliaire avec des insecticides. Les données indiquent que le recours à cette méthode a augmenté considérablement ces dernières années, avec une augmentation importante de personnes protégées en Afrique sub-saharienne et ceci de 13 millions en 2005 à 75 millions en 2009, ce qui correspond à la protection d'environ 10% de la population à risque de paludisme en 2009 (OMS, 2010).

Néanmoins, les méthodes actuelles de lutte contre le vecteur de paludisme sont très dépendantes d'un seul type d'insecticide, en l'occurrence « les pyrétrinoïdes ». En effet, le pyrétrinoïde est exceptionnellement sans danger et favorable pour l'environnement (OMS, 2010). Pourtant, l'utilisation générale d'une seule classe d'insecticide engendre le risque de développement de résistances par ces moustiques ce qui pourrait conduire à un problème majeur de la santé publique.

Dans ce contexte, l'utilisation du DDT comme insecticide pour la pulvérisation intra-domiciliaire a été limitée du fait de son interdiction en agriculture par la convention de Stockholm, suite à ces effets irritants et toxiques. Cependant, certains pays l'utilisent encore dans la nécessité mais son utilisation doit être régie par les conditions des directives et les recommandations de l'OMS, jusqu'à la disponibilité d'autres alternatives rentables et non offensives (OMS, 2009).

I.3. Le traitement du paludisme

Un traitement antipaludique, doit être efficace, accessible, bien toléré et peu onéreux, car les populations majoritairement concernées ont de faibles revenus avec un accès limité au soin.

Les antipaludiques actuels peuvent être classés selon leur mode d'action en **schizonticides**, actifs sur la phase asexuée d'érythrocytes, **les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétaboliques** ou bien en **gamétocytocides** actifs sur la phase sexuée érythrocytaire.

Les schizonticides: Ce groupe comprend les dérivés quinoléiques et les dérivés d'artémisinin

Les dérivés quinoléiques comprennent les amino-4-quinolines et les amino-alcools. Ces molécules interfèrent avec la digestion de l'hémoglobine dans la vacuole nutritive en inhibant la formation de l'hémozoin, qui se génère par la polymérisation des dimères appelé : hème. En résumé, ces principes actifs génèrent des hèmes qui sont toxiques pour le parasite.

L'artémisinin, est obtenu à partir des feuilles d'armoise chinoise, *Artemisia annua*. L'artémisinin et ses dérivés interfèrent aussi dans la digestion de l'hémoglobine, par libération de radicaux libres, toxique pour le parasite.

Les inhibiteurs des acides nucléiques ou antimétaboliques: Ces produits ont la propriété de bloquer la division du noyau de l'hématozoaire. Ce groupe comprend les antifolates, les naphtoquinones et les antibiotiques.

Les antifolates sont réparties en deux familles, les antifoliques et les antifoliniques. Ils agissent au niveau de la voie de synthèse des folates qui sont indispensables pour la synthèse des acides nucléiques.

Pour les naphtoquinones, on peut citer l'atovaquone qui est un inhibiteur puissant des fonctions mitochondriales en bloquant la chaîne de transfert d'électrons au niveau de son enzyme-clé, la dihydroorotate déshydrogénase.

Quant aux antibiotiques, on retrouve les tétracyclines, les macrolides pouvant bloquer la synthèse protéique par inhibition de certaines fonctions de l'apicoplaste.

Les gamétocides: Ils se distinguent par leur action de destruction de formes sexuées du parasite permettant ainsi d'interrompre la transmission de l'infection au parasite.

I.4. Développement de résistance aux antipaludiques

Les microorganismes ont su déjouer, au cours de leur évolution, les pièges qui leur sont tendu par l'environnement et notamment par leur hôte. L'émergence et la diffusion de la résistance pose un sérieux problème pour la santé publique.

Dans notre cas, le *Plasmodium falciparum* justifie d'une aptitude extrêmement rapide pour développer des résistances aux antipaludiques, ce qui nécessite un effort continu dans la

recherche de nouvelles molécules. En effet, les échecs prophylactique et thérapeutique entraînent une réémergence de paludisme et s'accompagne d'une augmentation de la transmission de la morbidité et de la mortalité. Malgré les efforts déployés pour la découverte de nouveaux médicaments antipaludiques et la mise en place par les systèmes de santé des combinaisons thérapeutiques pour le traitement antipaludique, *P.falciparum* s'adapte en permanence et développe des résistances. Ceci s'explique par la grande diversité génétique de *P.falciparum* due à un taux élevé de mutation dans son génome et par la masse très importante du parasite porté par les individus infectés.

On peut résumer les principaux facteurs favorisant l'émergence de la résistance come suit:

- Une mauvaise utilisation des antipaludiques par les individus infectés (automédication abusive, mauvaise observance) conduisant a des traitements incomplets.
- Une indisponibilité des médicaments efficaces ou le déploiement inadéquat des médicaments sous forme de monothérapie.
- La consommation de médicaments contrefaits (placébos) ou sous dosés, facteur permettant à des parasites viables de survivre à des concentrations sub-optimales d'antipaludique et d'être sélectionné par leur aptitude à résister.

I.5. Associations médicamenteuses

Face à l'apparition de la résistance à la quasi totalité des médicaments, et en vu d'améliorer l'efficacité et de diminuer l'effet secondaire des médicaments ; les chercheurs ont fait recourt à la combinaison thérapeutique qui consiste à associer au moins deux médicaments dont les modes d'action sont indépendants et dont les cibles biochimiques sont différent afin d'améliorer leur efficacité et d'éliminer ou de retarder le développement de la résistance à chacun des constituants. Ces combinaisons thérapeutiques sont soit fixe telle que atovaquone-proguanil et chloroproguanil-dapsone, ou bien libre lorsqu'on associe l'artémisinine ou l'un de ces dérivés, pour donner les ACT : artémisinine-based Combination Therapy.

En 2001, l'OMS considérait que l'artémisinine était le grand espoir mondial contre le paludisme. Les dérivés d'artémisinine d'hémisynthèse (l'arésunate, l'artéméthère) sont efficaces et agissent très rapidement tout en étant très bien tolérés, cependant leurs recrudescences sont plus fréquentes. En raison de leur courte demi-vie, il est recommandé de les utiliser en association (ACT) ce qui permet de réduire la durée du traitement et la probabilité d'apparition de résistance. **(B. Pradines et al., 2010)**

CHAPITRE II

Artemisia annua L.

II.1. Historique

L'artémisinine présente comme étant une découverte récente d'une herbe ancienne. La documentation historique liée à cette plante a été trouvée dans une recette datée de 168 (BC) dans une fouille archéologique d'un tombeau. Cette recette montre qu'il a été utilisé pour le traitement de l'infection intestinale et les hémorroïdes comme agent anti-inflammatoire. Ce n'est que dans les années (281-340) que le premier enregistrement de l'artémisinine pour le traitement de la malaria (fièvre) a été prescrit par Ge Hong dans le manuel des ordonnances. Néanmoins, ce traitement a été perdu avec le temps; mais vers les années 1960, le parasite *Plasmodium* développe une résistance contre les médicaments anti-malariales et diffusa rapidement en Asie de Sud-est et en Afrique. Pendant cette période, les médicaments existants tels que la quinine, chloroquine,... sont devenus moins efficace. En 1967, un programme impliquant des chercheurs scientifiques chinois est instauré pour prendre ce défi où une partie de ce programme a essayé d'explorer la médecine traditionnelle chinoise dont plus de 1000 échantillons à partir de différentes herbes ont été extraites et étudiés par des méthodes modernes. Vers la fin des années 1970, ce groupe de phyto-chimistes ont attiré une attention particulière à la plante d'*Artemisia annua* L., pour l'extraction de son principe actif et prouver son efficacité antimalariale in vivo et clinique (X.T. Liang et al., 2006).

II.2. Description de la plante d'*Artemisia annua* L.

II.2.1. Données botaniques

Artemisia annua L. est une plante herbacée annuelle, originaire de Chine, où elle est connue sous le nom de *qinghao*. La plante est d'origine asiatique qui est également présente dans le centre et le sud de l'Europe et en Amérique du nord (J. Bruneton., 2009).

C'est une espèce qui peut atteindre jusqu'à 2 m de hauteur. Ses rameaux et ses feuilles sont alternes, de 2,5 à 5,0 cm de long, elles sont glabres, segmentées, dentées et pourvues d'un appareil sécréteur aromatique (figure 1, 2). Ses fleurs, réunies en capitule, sont jaunes et de très petites tailles, 2 à 3 mm de diamètre, et les capitules sont assemblés en panicules verdâtres à jaunâtres. Les ovaires sont infères et uniloculaires, chacun donnant un akène, sans pappus, d'environ 1mm de diamètre. Les trichomes glandulaires, présents dans les feuilles et les fleurs, contiennent une huile volatile. C'est précisément dans ces trichomes que l'on peut trouver de l'artémisinine (B. Blanc. et al., 2008).

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Asteridae*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Genre : *Artemisia*



Fig (1) feuille de la plante d'*Artemisia annua*L.

II.2.2. Données phytochimiques

II.2.2.1. Généralités

Les chercheurs ont pu relever une propriété intrinsèque des plantes qui réside dans leurs capacités à synthétiser et à stocker une large variété des composés de faible poids moléculaire appelés métabolites secondaire (figure 3). Contrairement aux métabolites primaires, à savoir : les glucides, les lipides (triglycérides) et les peptides, qui contribuent à la vie des cellules, les métabolites secondaires, comme les terpènes, les flavonoïdes, les coumarines et les composés phénoliques, constituent des réserves et se produisent dans un nombre limité des plantes, indiquant qu'ils ne sont pas essentiels pour le métabolisme primaire (anabolisme ou catabolisme) (M. Wink., 2010).



Figure (2) : Champs de culture de l'*Artemisia annua* L. en chine

Les caractéristiques biochimiques et physico-chimiques des métabolites secondaires sont en corrélation avec leur fonction. Ces derniers servent souvent comme outils de défense contre les animaux herbivores (insectes, mollusque, mammifère), contre les microbes (bactéries, champignon), les virus ou les plantes concurrentes pour la lumière, l'eau et les nutriments.

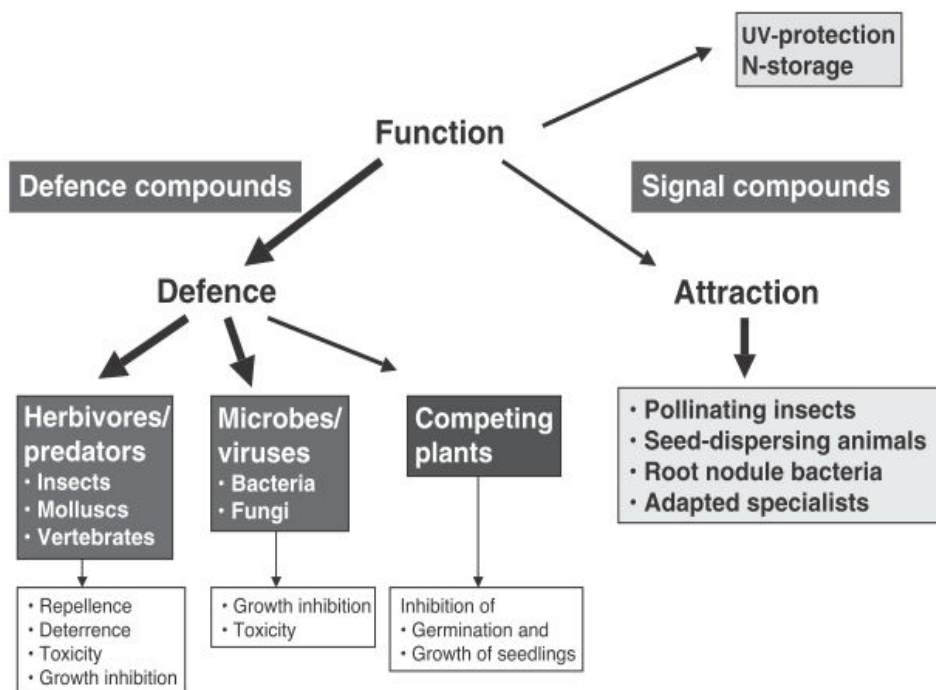


Figure (3): Schéma représentant le rôle des métabolites secondaires dans la plante

II.2.2.2. Etude de la composition chimique

L'analyse d'échantillons d'*Artemisia annua* L. d'origine variée confirme l'existence d'au moins deux chimiotypes: le premier chimiotype « Chine » (mais aussi l'Europe et Nouveau-monde) étant pauvre en artémisinine et riche en dihydroartémisinine et en acide artémisinique ; cependant le second chimiotype « Vietnam », est riche en artémisinine et en acide dihydroartémisinique mais pauvre en acide artémisinique. Il est important de signaler que selon Bruneton (**J. Bruneton., 2009**), les plantes riches en acide artémisinique sont également riches en artéannuine-B et en épi-désoxyartéannuine B, tandis que celles riches en acide dihydroartémisinique renferment uniquement de la dihydro-épi-désoxyartéannuine B.

Après la découverte de son effet, l'*Artemisia annua* est devenu l'une des plantes les plus étudiées. En tenant compte de la présence de l'artémisinine, elle est identifiée dans toutes les

plantes d'*artemisia annua*, néanmoins sa teneur varie selon la région productrice et le stade de développement de la plante. Cette plante comporte aussi des huiles essentielles, des flavonoïdes, des coumarines et des terpenoïdes où on trouve de l'artemesinin qui est une sesquiterpène lactone. L'étude phytochimique systématique de différents composés issus d'*Artemisia annua* L. incluant les feuilles, les fleurs et les racines montre que plus de 150 produits naturels sont enregistrés.

a- Les terpenoïdes

En 2004 les chercheurs ont réussi à purifier et identifier 57 sesquiterpènes dont plusieurs sont des précurseurs dans la biogénèse de l'artémisinine. En plus des sesquiterpènes, plusieurs mono-, di-, triterpénoïdes ont été obtenus à partir d'*Artemisia annua* L. (X.T. Liang et al., 2006)

b- Les huiles essentielles

Selon leur origine géographique, le pourcentage en huiles essentielles dans l'*Artemisia annua* L. s'étale de 0.02% à 0.49% de poids frais et de 0.04% à 1.9% de poids sec (X.T. Liang et al., 2006). La technique d'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) a été utilisée pour identifier la composition chimique des huiles essentielles, et plus de 70 composés sont identifiés (X.T. Liang et al., 2006). La teneur et la composition de l'huile essentielle, varient selon l'origine : le chimiotype chinois avec une teneur de 40mL/Kg est caractérisé par la présence de monoterpènes irréguliers alors que le chimiotype vietnamien ne renferme qu'une teneur de 14ml/Kg essentiellement majoritaire en camphre et germacrène D (J. Bruneton., 2009).

Les huiles essentielles de la plante *Artemisia annua* L. pourraient être potentiellement utilisées dans les parfums, en cosmétique et en dermothérapie.

c- Les flavonoïdes et les coumarines :

Pour cette classe de produits, on recense 46 flavonoïdes qui ont été isolés à partir de la plante *A.annua* ; et environ 7 coumarines (X.T. Liang et al., 2006).

d- Composés divers

Plusieurs composés hétérogènes ont été isolés de la plante *Artemisia annua* L. dont deux dérivés de chromène, un nouveau cytokinin, deux composés phénoliques, deux composés à structure polyacétylène, un lipide, et un dipeptide (X.T. Liang et al., 2006).

En résumé, environ 150 métabolites secondaires ont été isolés de l'*Artemisia annua* L. A ce jour, toutes les études en relation avec *A.annua* ont abouti à plus de 60 sesquiterpène, et 16 mono-, di- et triterpènes, 46 flavonoïdes, 7 coumarines, 9 composés divers et 13 produits endophyte. (X.T. Liang et al., 2006)

II.3. L'artémisinin

L'artémisinin ou qinghaosu (extrait de qinghao) représente le principe actif majeur de la plante *Artemisa annua* L (figure 4). C'est une lactone sesquiterpénique peroxydée, sans couleur avec des aiguilles en forme cristalline et une saveur cruelle. Cette molécule est active lors de la phase endo-érythrocytaire du cycle de parasite. Aujourd'hui, l'artémisinin est utilisé aussi pour produire des dérivés utilisés en chimiotérapie en première ligne et ceci pour son grand effet antiplasmodial et sa faible toxicité ainsi que dans des combinaisons thérapeutiques (ACT).

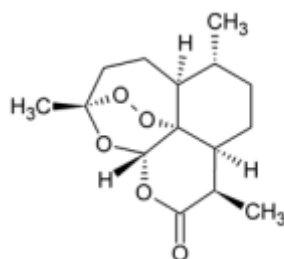


Figure (4) : Structure de l'artémisinin

II.3.1. Production

Actuellement, la production de l'artémisinin se fait exclusivement par extraction à partir des armoises cultivées en Asie (Chine, Vietnam) ou en Afrique (Tanzanie, Kenya) récoltées au début de floraison et séchées au soleil. En moyenne, le rendement d'extraction serait de 5 Kg d'artémisinin par tonne d'armoise sèche (J. Bruneton., 2009). Parmi les trois espèces du genre *Artemisia* contenant de l'artémisinin on distingue *A.lanceolata*, *A.apicea* et *A.annua*, Ce dernier semble être le plus intéressant contenant approximativement 0.1% à 0.2% d'artémisinin dans le type sauvage (M. Wink., 2010). En plus, on rapporte que sa concentration dans la partie aérienne sèche varie de 0.01% à 0.8% en fonction de l'origine des

conditions climatiques et de la période de végétation. Dans ce sens, il a été montré sur des plantes cultivé au Vietnam que le rendement maximal en Artemisinin à partir des feuilles est obtenu au stade végétatif précoce et qu'il décroît ensuite (**J. Bruneton., 2009**).

Différentes méthodes ont été développées pour augmenter la production d'artémisinine, entre autres la synthèse totale de l'artémisinine ; cependant son rendement reste faible et son industrialisation guère envisageable. Ces dernières années, l'hémisynthèse à partir de l'acide artémisinique (issu de plantes ou de culture cellulaire) est devenue nettement plus favorable (**N.Q.Liu et al., 2011 ; J. Bruneton., 2009**). Toutes ces tentatives s'avèrent actuellement non économique, et la solution la plus économique reste celle de l'extraction à partir de l'*Artemisia annua* L. par solvant suivi par plusieurs étapes de purification (**M. Wink., 2010**).

Dans l'objectif d'assurer un bon approvisionnement du marché d'artémisinine avec un prix raisonnable, l'OMS s'est lancé un défi en appelant à concentrer les recherches dans les objectifs suivants :

- augmenter la concentration en artémisinine par l'optimisation des conditions de la culture et de la récolte, par la sélection des cultivars ayant un grand rendement, ou bien la création des plantes transgéniques,
- augmenter l'efficacité des processus d'extraction et de purification d'artémisinine

En effet, l'évaluation de l'efficacité d'extraction des métabolites secondaires doit prendre en considération quatre aspects major : récupération total élevé, pureté élevé et rentabilité élevé avec un effet réduit sur l'environnement. Il est également important de prendre en compte des considérations d'hygiène et de sécurité telles que la toxicité des solvants, les risques d'explosion et pollution de l'environnement (**N.Q.Liu et al, 2011**). Ceci nécessite en premier lieu l'étude ses caractéristiques physico-chimiques d'artémisinine.

II.3.2. Caractéristiques physico-chimiques

L'artémisinine est une molécule stable dans les solvants neutres, mais sensible dans des milieux acide ou basique. En comparaison avec les autres peroxydes, l'artémisinine est thermiquement stable même à sa température de fusion qui s'élève à 154-156°C, où elle ne se décompose seulement qu'après la fusion ; cependant, il tend à induire une décomposition spontanée. D'une autre coté, cette molécule est faiblement soluble non seulement dans l'eau mais aussi dans l'huile (Tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de l'artémisinine (Lapkin et al., 2006)

Parameter	Value
Molecular weight / g·mol ⁻¹	282.3
Melting point / °C	156-157
Thermal stability in non-polar solvents / °C	150
Solubility in water @ pH 7 / g·L ⁻¹	0.063
Solubility in water @ pH 7, 37 °C / g·L ⁻¹	0.048 [*]
Solubility in ethanol @ 21 °C / g·L ⁻¹ ,	12
Solubility in ethyl acetate @ 20 °C / g·L ⁻¹	100
Solubility in hexane @ 40 °C / g·L ⁻¹	0.46
Solubility in hexane – ethyl acetate (5 %vol) / g·L ⁻¹	33
Solubility in N,N-dimethylethanolammonium octanoate / g·L ⁻¹	82
Solubility in bis(2-methoxyethyl)ammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide / g·L ⁻¹	110
Octanol/water partitioning coefficient / log P	2.94

Pour choisir le solvant approprié et afin d'optimiser le processus de séparation, les données de la solubilité d'artémisinine dans différents solvants est nécessaire et très importante. Cette solubilité est déterminée expérimentalement à pression atmosphérique sur une gamme de température (283.15 à 323.15K) par l'utilisation des méthodes gravimétriques avec une technique d'observation et de surveillance au laser. Le tableau 2 regroupant ces données montre que la solubilité augmente avec l'augmentation de la température, et que la polarité de solvant a une certaine influence sur la solubilité d'artémisinine. Ainsi, les solvants à polarité moyenne soulèvent un bon pouvoir de dissolution, par contre l'artémisinine a une solubilité modérée dans des solvants de faible polarité comme le méthanol et l'acétonitrile ou bien les solvants non-polaires comme le cyclohexane (A. Lapkin P. Plucinski., 2006).

A partir de sa structure, il est clair que l'artémisinine a une faible polarité, donc sa solubilité dans des solvants à polarité moyenne est relativement grande. D'autres chercheurs se sont intéressés à sa solubilité dans des mélanges de solvants binaires où ils ont rapportés une solubilité plus élevée dans ces mélanges par rapport à chacun des ces solvants purs. L'étude de la solubilité qui couvre un large domaine de polarité a montré que la solubilité maximale a été enregistrée dans des mélanges relativement de faible polarité. Ainsi que la solubilité d'artémisinine a diminué considérablement avec l'augmentation de la concentration en eau dans les mélanges, qui suggère l'utilisation de l'eau comme anti-solvant dans la cristallisation d'artémisinine pour sa purification (Q. Haiyan et al., 2010).

Tableau 2 : Solubilité d'artémisinine à différentes températures (A. Lapkin P. Plucinski., 2006).

T/K	$10^4(x_T^{exp})$		T/K	$10^4(x_T^{exp})$
		Methanol		Ethyl Acetate
283.15	5.5871		283.15	52.5294
288.15	7.7347		288.15	78.6100
293.15	11.0950		293.15	116.8526
298.15	14.5088		298.15	152.8011
303.15	19.4804		303.15	204.6851
308.15	26.6922		308.15	282.0574
313.15	37.5218		313.15	376.7422
318.15	47.7480		318.15	498.8313
323.15	62.2157		323.15	656.6532
		Acetone		Acetonitrile
283.15	38.8060		283.15	1.9782
288.15	50.9541		288.15	2.5700
293.15	67.2883		293.15	3.5637
298.15	86.3055		298.15	5.1757
303.15	114.0663		303.15	7.2319
308.15	145.2396		308.15	10.2887
313.15	180.6762		313.15	14.3215
318.15	223.4925		318.15	19.6368
323.15	278.2854		323.15	26.9605
		Cyclohexane		Toluene
283.15	4.4012		283.15	374.5060
288.15	5.8504		288.15	435.4345
293.15	7.4502		293.15	519.5632
298.15	10.5903		298.15	602.8861
303.15	13.6961		303.15	710.5086
308.15	17.0979		308.15	815.3558
313.15	20.9175		313.15	936.9766
318.15	26.4545		318.15	1069.5903
323.15	34.1159		323.15	1224.2806
		Chloroform		
283.15	486.8483		308.15	1569.6479
288.15	612.5478		313.15	1926.2803
293.15	794.6997		318.15	2359.3246
298.15	1013.1789		323.15	2865.2702
303.15	1268.8714			

II.4. Les procédés d'extraction d'artémisinine

II.4.1. Les procédés d'extraction par solvants conventionnels

Les méthodes traditionnelles d'extraction des produits naturels tels que l'enflourage ou l'extraction par solvant, présentent plusieurs inconvénients ; ils prennent beaucoup de temps, sont laborieuses, avec faible sélectivité/ et ou faible rendement d'extraction, en outre ces techniques utilisent une grande quantité de solvants toxiques.

En raison des propriétés de l'artémisinine comme la faible stabilité chimique et thermique de la fonction peroxyde, la faible polarité et par conséquent, une faible solubilité dans l'eau, son extraction avec des solvants non polaires est recommandée mais elle est forcément liée à l'extraction simultanée des huiles essentielles, des chlorophylles, et des cires.

Le choix de solvant d'extraction va s'avérer très délicat d'autant que la législation sur les produits à destination agroalimentaire ou médicinal est extrêmement rigoureuse.

Plusieurs solvants ont été rapportés dans la littérature, leur adoption différent par leur mécanisme d'action, la durée d'extraction et l'effet de se solvant sur l'environnement.

II.4.1.1. Extraction par l'hexane

L'extraction par de l'hexane est la méthode la plus simple, les feuilles séchées et broyées sont mises en contact avec l'hexane dans 30 à 40 pendant 10 à 48 heures sous agitation ou bien à l'aide d'un système Soxhlet. L'efficacité d'extraction avec de l'hexane a pu être améliorée par l'ajout de petites quantités d'acétate d'éthyle, ce qui augmente significativement la solubilité d'artémisinine dans le mélange.

L'extraction est suivi par l'élimination de solvant à partir de la biomasse épuisée par une simple évaporation suivie de sa condensation pour qu'il soit réutilisé ce qui permet de réduire l'impact du solvant sur l'environnement (A. Lapkin P. Plucinski., 2006).

II.4.1.2. Extraction par l'éthanol

L'éthanol se présente comme un solvant potentiel et attractive du fait de sa large disponibilité à partir de matières premières renouvelables, ceci est économiquement important pour les procédés utilisant principalement une source locale de matière première. Cependant, il existe dans son utilisation des préoccupations similaires à l'hexane, car c'est un solvant inflammable avec une toxicité élevée engendrant de grands risques lors de son utilisation.

II.4.2. Les procédés d'extraction par solvants alternatifs

II.4.2.1. Extraction par liquide ionique

Le liquide ionique est une technologie émergente, elle se caractérise par une pression de vapeur négligeable, des composés non inflammables et une possibilité de régler la propriété de solvation sur une large gamme de produits. Le potentiel d'optimisation d'un solvant à une extraction spécifique voulu est très attractif où plusieurs procédés d'extraction basés sur le liquide ionique ont été déjà commercialisés. Le solvant DMEA oct, (N,N-diméthylethanolammonium octanoate) a donné un rendement d'extraction en artémisinine similaire à celui obtenu avec de l'hexane à la même température (A. Lapkin P. Plucinski., 2006).

II.4.2.2. Extraction avec CO₂ supercritique

Un fluide est considéré dans état supercritique, lorsque la température et la pression de celui-ci atteint des valeurs supérieures à ceux du point critique. Ces fluides ont des propriétés intermédiaires entre celle des liquides et des gaz ; d'un point de vue cinétique, la viscosité des fluides supercritique est 5 à 20 fois supérieure à celle des liquides, ce qui entraîne des valeurs de coefficients de diffusion des solutés dans ce fluide à l'état supercritique plus grandes que celles mesurées dans un liquide. Cette propriété entraîne une meilleure pénétration des fluides supercritiques dans les matériaux poreux et une cinétique rapide. D'un point de vue thermodynamique, la masse volumique d'un fluide supercritique est 100 à 1000 fois plus grande que celle d'un gaz, ce qui lui confère un grand pouvoir solvant. Le pouvoir solvant des fluides supercritiques peut être manipulé par changement de la pression et/ou de la température, ce qui permet d'obtenir, suivant les paramètres choisis, une extraction plus ou moins sélective vis-à-vis de certains composés.

En extraction, le CO₂ est le fluide le plus communément utilisé car son point critique est facilement accessible (T=31,3°C, et P=73,8 bar). En pratique, il s'agit de mettre la matière végétale à extraire dans une enceinte dans laquelle circule le CO₂ à l'état supercritique, qu'il va se charger en molécules solubles. Le CO₂ chargé en soluté, est ensuite détendu dans un séparateur pour devenir gazeux, état où son pouvoir solvant est nul, le soluté par la suite précipite et tombe au fond du séparateur. Ensuite, le CO₂ gazeux se liquéfie par passage à travers un échangeur froid et retourne vers la pompe qui le renvoie dans l'extracteur d'où provient son avantage majeur.

En effet, des essais à l'échelle laboratoire de l'extraction de l'artémisinine à partir de l'*Artemisia annua* L. avec CO₂ supercritique est rapide avec une grande sélectivité. Cependant, la littérature rapporte une grande variabilité dans l'efficacité d'extraction qui dépend de l'échelle d'extraction, l'utilisation de co-solvant, la température et la pression d'extraction ainsi que le débit de solvant dans l'extracteur.

II.4.2.3. Extraction par l'hydrofluorocarbon HFC-134a

Le solvant Hydrofluorocarbon HFC-134a (1,1,1,2 tétrafluoroéthane) ou simplement appelé R-134a est un réfrigérant halo-alkane, et non inflammable. Il a été parmi les solvants les plus étudiés pour diverses applications, pour laquelle, il y existe une étude sur l'impact de son cycle de vie à été réalisée par McCulloch et Lindley (**A. McCulloch et A. Lindley, 2003**).

En Europe, en USA et au Japon, le HFC est accepté par les organismes de normalisation pour l'usage comme un solvant d'extraction des arômes alimentaires, cependant l'inconvénient est son facteur élevé de pouvoir de réchauffement de la terre qui est 1300 fois plus grand que celle de CO₂, donc le captage et le réutilisation de ce solvant est d'une grande importance (**A. Lapkin et P. Plucinski, 2006**).

Le HFC est un gaz dans les conditions normales et se liquéfie relativement à basse pression. En raison des conditions de température et de pression nécessaire pour le fonctionnement, l'énergie demandée au cycle continu de pression/dépression est relativement faible et est considérée comme un solvant approprié dans un processus continu d'extraction.

II.4.2.4. Comparaison de l'efficacité d'extraction pour différents solvants

Afin de comparer les différentes techniques d'extraction, il est nécessaire de comparer la durée complète d'un cycle d'extraction, le rendement d'extraction, le capital investi et les frais de fonctionnement, la sécurité et les risques, la performance environnementale (émission de gaz à effet de serre) ainsi que les risques pour la santé humaine. Ceci peut être illustré dans le tableau3 et la figure (5).

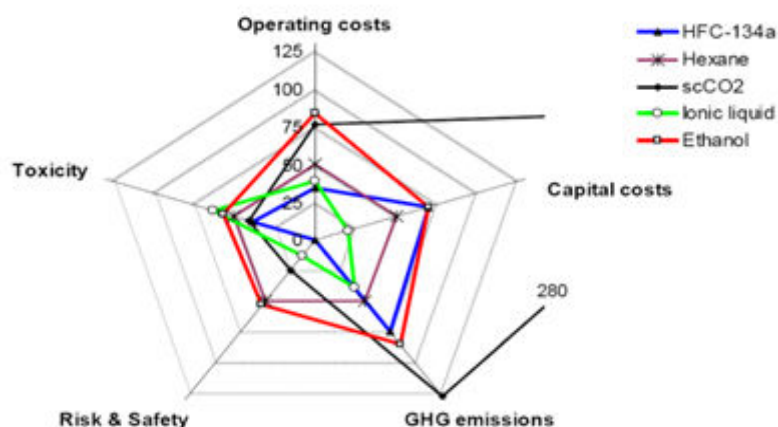
En terme de rendement d'extraction, le coût de fonctionnement, ainsi que le cout d'investissement, l'extraction utilisant le HFC ou le liquide ionique apparais meilleure que celle réalisée avec de l'hexane. Ces deux technologies engendrent relativement moins de danger pour la santé et pour l'environnement (dans le cas de capture complète et la réutilisation de solvant). Il est important de noter que l'émission des gaz à effet de serre dans le cas des HFC est du au solvant résiduel dans la matière épuisé après extraction. En outre, l'extraction avec l'hexane et l'éthanol n'est pas rentable du fait des longues durées d'extraction exigées. Cependant, le HFC donne un extrait beaucoup plus propre avec une concentration élevée en artémisinine, ce qui aboutit à une simple récupération d'artémisinine à partir de l'extrait primaire (**A. Lapkin P. Plucinski., 2006**).

Tableau 3 : Comparaison entre différents solvants d'extraction (Lapkin et al. 2006)

	Extraction efficiency / %	Duration of extraction cycle / h	Running cost / €·kg ⁻¹	Capital cost for 2.5·10 ⁶ kg (biomass)·annum ⁻¹ / m€
Hexane	60	8-10	28	0.7
Ethanol	73	7	47	1.0
Ionic liquids	79	2.5-6	22	0.3-1.0
scCO ₂	82	3-6	42	4.1
HFC-134a	>62	6	19	1.0

Des recherches récentes ont montré l'efficacité de l'éthanol de l'artémisinine avec un rendement de l'ordre de 95% une réduction significative de la quantité de solvant nécessaire à l'extraction. Néanmoins, mais l'extrait contient plus d'impuretés que l'extrait d'hexane, ce qui inhibe la cristallisation à partir de l'extrait mère. Les sucres et les pigments sont les deux impuretés majeures nécessitant de longues étapes de purification basé sur une seconde extraction liquide-liquide avec un solvant non polaire (N.Q.Liu et al. 2011).

En ce qui concerne le liquide ionique, il montre un potentiel considérable en attendant l'évolution de la recherche dans ce domaine vers un liquide ionique spécifique, qui combine à la fois entre l'efficacité et la vitesse d'extraction. Cependant, le problème actuel est la régénération de liquide ionique et sa récupération à partir de la biomasse.

**Figure (5)** : comparaison multi-objectifs des technologies d'extraction d'artémisinine

Par ailleurs, le CO₂ supercritique montre une efficacité et une vitesse d'extraction élevée mais trouve ses limites dans les coûts initiaux d'investissement et de fonctionnement ainsi que le besoin à une maîtrise professionnelle à cause des pressions de fonctionnement élevées, ce qui

limiterais son utilisation dans de grandes installations de multi-extraction (**A. Lapkin P. Plucinski., 2006**).

II.4.3. Procédés d'extractions innovants

Depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations dont l'hydrodistillation-extraction simultanée, l'extraction par soxhlet, l'extraction assistée par ultrasons ou par micro-ondes en sont les principales.

II.4.3.1. Le Soxhlet

C'est un appareil conçu spécialement pour l'extraction continu solide-liquide, qui se base sur la percolation de la matière à traiter, contenue dans une cartouche de cellulose, par des vapeurs de solvant condensé. Le contact entre le solvant et la matière dure pendant l'accumulation du solvant dans le réservoir avant d'atteindre un certain niveau et amorce le siphon avant de retourner vers le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs jusqu'à épuisement de la biomasse.

Ce système est utilisé pour l'extraction de diverses catégories de molécules. En effet, l'artémisinine a été extraite par ce système avec différents solvants. La littérature rapporte pour une durée de six heures un rendement d'extraction de 75.2% et 60% pour l'éther de pétrole et l'huile de solvant d'extraction N°6 respectivement (**J. y. Hao et al., 2002**).

II.4.3.2. Extraction assistée par micro-onde

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, dont la fréquence est comprise entre 300 MHz et 30GHz, soit une longueur d'onde entre 1m et 1mm ; la fréquence généralement employée est de 2450 MHz soit une longueur d'onde de 12.2cm (**S. Chemat., 2009**)

Le mécanisme du chauffage diélectrique repose sur le fait que les molécules polaires telle que l'eau, ont des extrémités positives et négatives, ce sont des dipôles ; en l'absence de champ électrique, les dipôles d'un milieu diélectrique se trouve orienté au hasard sous l'effet de l'agitation thermique du milieu. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules s'orientent dans la direction du champ électrique. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de fréquence f , les dipôles s'orientent dans la direction de champ sur une demi-alternance, et se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la

seconde demi-alternance : c'est la rotation dipolaire ; cet énergie cinétique se convertis en énergie électrique.

L'extraction par micro-onde regroupe plusieurs procédés parmi les quelles : l'extraction par solvant assisté par micro-onde, hydrodistillation par micro-onde sous vide, et l'extraction par micro-onde sans solvant.

Le procédé d'extraction par micro-ondes consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée ou non, et cela en présence d'un solvant adsorbant fortement les micro-ondes pour l'extraction de composés apolaires, ou bien en présence d'un solvant n'adsorbant pas les micro-ondes pour l'extraction de composés polaires.

Jin-yu Hao et al. ont étudié l'extraction d'artémisinine en présence de plusieurs solvants. Ils ont montré que le meilleur rendement est donné par l'huile de solvant d'extraction No.6, ce rendement augmente avec l'augmentation de rapport solvant/matière végétale, avec l'augmentation de degré de broyage de matière végétale, ainsi qu'avec l'augmentation de la constante diélectrique du mélange de solvants. La durée de radiation de 12 min donne un meilleur rendement d'extraction, car au delà de cette durée, les radiations peuvent causer la perte d'artémisinine (**J. y. Hao et al., 2002**).

II.4.3.2.Extraction par ultrasons

Le terme ultrasons est utilisé lorsqu'on se réfère à des ondes vibratoires dont la fréquence est supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16kHz). Les ultrasons peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leur fréquence figure (6) :

Ultrasons de diagnostic : ces ultrasons son aussi appelés US de basse intensité ou de haute fréquence (2 à 10MHz) ; les applications sont nombreuses dans le domaine médical comme outil de diagnostic et de contrôle.

Ultrasons de puissance : aussi appelé US de haute intensité ou de base fréquence (20 kHz à 100 kHz). Ils sont appliqués à des domaines industriels variés comme le nettoyage des surfaces, la production d'émulsion, l'accélération des réactions chimiques en milieu hétérogène et l'extraction des produits naturels. Contrairement aux US de diagnostique, ces US sont capables de générer des bulles de cavitation.

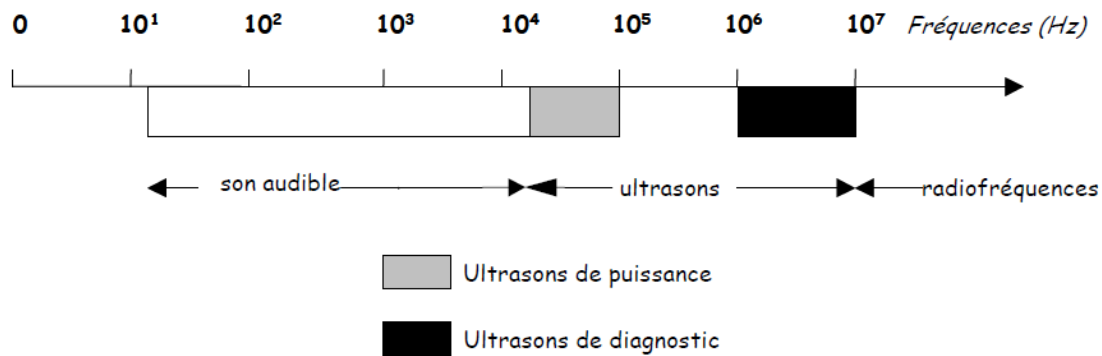


Figure (6) : domaines d'utilisation des ultrasons en fonction de fréquence

a- Principe

La technique d'extraction par ultrasons est basée sur le principe de cavitation. La propagation d'une onde ultrasonore dans le milieu donne lieu à des régions de compression et de dépression, qui implique des mouvements moléculaires induisant des distensions et des rapprochements entre des groupes de molécules. Chaque milieu liquide a une distance moléculaire critique, au-dessous de cette distance le liquide reste intacte, mais au-dessus de ce seuil caractéristique les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues ce qui engendre la formation des bulles de cavitation (figure 7).

Lorsque la pression atteint des valeurs très faibles, il peut se former des bulles d'air ou de vapeurs de liquide appelé : cavité, ce phénomène ne peut avoir lieu que si l'intensité acoustique locale est suffisamment importante pour vaincre les forces de cohésion du liquide. Dans certains cas, la puissance nécessaire pour atteindre le seuil de cavitation est moins importante, et ceci, lorsque les microbulles d'air existent dans un liquide au repos, emprisonné dans des crevasses à la paroi du récipient ou dans des impuretés solides, qui joue le rôle de nucléis pour les bulles de cavitation.

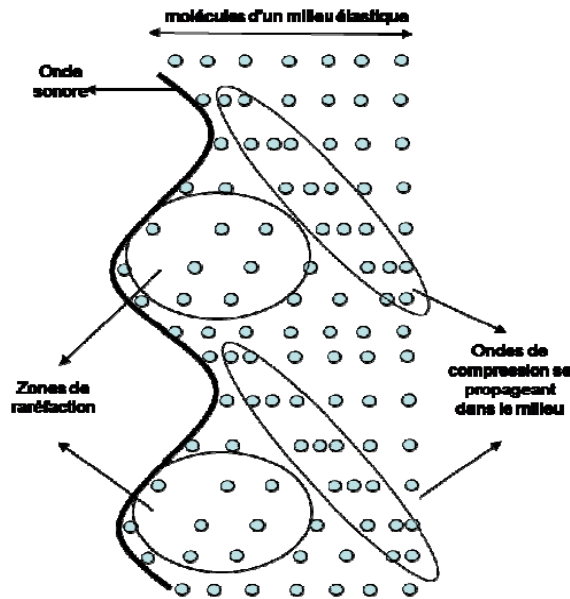


Figure (7) : progression de l'onde sonore dans un milieu

b- Mode d'action

Le comportement des bulles de cavitation dépend de l'intensité acoustique dans le milieu liquide. On distingue deux types de cavitation: la cavitation stable produite sous faible intensité ultrasonore ($1 \text{ à } 3 \text{ W/cm}^2$) où ces bulles ont des durées de vie assez longues. Elles vibrent pendant plusieurs cycles avant d'imploser ou de disparaître et leurs effets sont faibles. D'autre part, il y a la cavitation instable ou transitoire ($> 10 \text{ W/cm}^2$) dont la durée de vie de ces bulles ne dépasse pas un cycle de vie ultrasonore. Durant ce cycle, les bulles peuvent atteindre une taille très importante et implose violemment à la fin de la phase de compression, où les valeurs locales de pression et de température peuvent être très élevées (quelques milliers de degrés et quelques centaines de barres) ; c'est la théorie de points chauds qui a été proposée par Notling et Nipperas (1950), et reprise par Suslick (**K.S. Suslick., 1988**). Le comportement des bulles dépend de leur taille et de la nature de champ ultrasonore local qui détermine leur stabilité ou leur implosion.

Les ultrasons ont des actions mécanique et physique notamment lors de l'explosion des bulles de cavitation, qui est la production des micro-jets dirigés vers une surface solide lors de l'implosion des bulles de cavitation, ces micro-jets peuvent atteindre des vitesses considérables (plus de 120 m/s) et ils pourraient avoir une influence prépondérante dans les dégâts induits par la cavitation et dans l'augmentation de l'agitation à l'interface obstacle/milieu réactionnel.

En plus de leurs effets mécaniques et physiques, les ultrasons produisent des effets chimiques qui résultent encore une fois du phénomène de nucléation produit par la cavitation. Lorsqu'une solution aqueuse est irradiée, on se trouve en présence d'une importante source de chimie radicalaire du fait de la décomposition de l'eau en radicaux libres. Ces entités peuvent ensuite réagir avec des espèces en solution ou se recombinaison pour former de l'hydrogène, de l'eau oxygénée ou d'autres radicaux. Si la nature des espèces chimiques est fortement dépendante des gaz dissous, la fréquence influence considérablement la cinétique des réactions (S. Chemat, 2009).

c- Les ultrasons dans l'extraction

L'introduction d'ultrasons à diverses étapes des procédés conventionnels d'extraction de molécules d'origines végétales semble avoir débuté il y a environ une trentaine d'années. L'extraction assistée par ultrasons consiste en une macération du matériel végétal dans un solvant, le tout placé sous ultrasons. Les résultats obtenus en terme de rendement et de qualité apparaissent comme plutôt positifs et supérieurs à ceux obtenus par des techniques conventionnelles d'extraction par solvant.(S. Chemat, 2009).

Cependant, les ultrasons peuvent ainsi être utilisés dans d'autre domaine (figure 4)

Tableau 4 : Applications des ultrasons de puissance dans l'industrie agroalimentaire

Effets mécaniques	Effets chimiques et biochimiques
<ul style="list-style-type: none"> - Surgélation - Cristallisation des graisses et sucres - Dégazage, découpe - Mélange et homogénéisation - Extraction des arômes - Filtration et séchage 	<ul style="list-style-type: none"> - Oxydation et vieillissement accéléré - Altération de l'activité des enzymes - Action bactéricide - Traitement des effluents - Désactivation des bactéries et spores - Stérilisation des équipements

Des études réalisées par Horomàdkova et al. (Z. Horomàdkova et al., 1999) sur l'effet des ultrasons dans l'extraction des composés majeurs de la sauge officinale, montrent une meilleure extraction du 1,8-cinéole, α -thujhone et bornéol (sous ultrasons à sonde) avec 60% de rendement en moins de 2 h et à une température allant de 8 à 33°C. Dans les mêmes

conditions, **Vinatoru et al. (M. Vinatoru et al., 2001)** ont comparé l'extraction des composés majeurs des graines d'aneth (*Anethum vulgarea*) par macération à celle réalisée sous ultrasons. Ils ont confirmé l'apport des ultrasons dans l'amélioration du rendement et la réduction du temps d'extraction, en produisant des quantités minimales d'acides gras. Ils ont conclu que l'avantage primaire de la sonification en extraction par solvant serait un processus d'hydratation accélérée et une meilleure pénétration du solvant qui intervient simultanément avec la fragmentation du tissu végétal. Par conséquent, l'intensification du transfert de matière permet de réduire les temps d'extraction et sa facilité de mise en œuvre représente un atout intéressant de cette technique.

On peut produire des ondes ultrasonores de forte intensité de différentes manières. L'énergie sonore est obtenue par conversion d'une autre forme d'énergie au moyen d'un transducteur. On peut distinguer des générateurs mécaniques (diapason, sifflet, sirène, ...) et des générateurs électromécaniques (piézo-électriques et magnétostrictifs).

Les plus souvent utilisés en milieux liquides sont de type piézo-électrique (**Figure 8**). De nombreux problèmes techniques subsistent cependant. Ainsi, les générateurs électriques, par exemple, s'ils sont simples et peu coûteux à réaliser à hautes fréquences (entre 100 kHz et 1 MHz), deviennent beaucoup plus onéreux à 20 kHz. Ils comportent trois parties :

- Un générateur électrique qui permet de transformer l'énergie électrique de faible fréquence en énergie électrique de fréquence plus importante.
- Un convertisseur (transducteur) qui permet de transformer l'énergie électrique de haute fréquence en énergie mécanique vibratoire de même fréquence.
- Un élément applicateur qui transmet la vibration vers le milieu réactionnel et l'amplifie éventuellement.

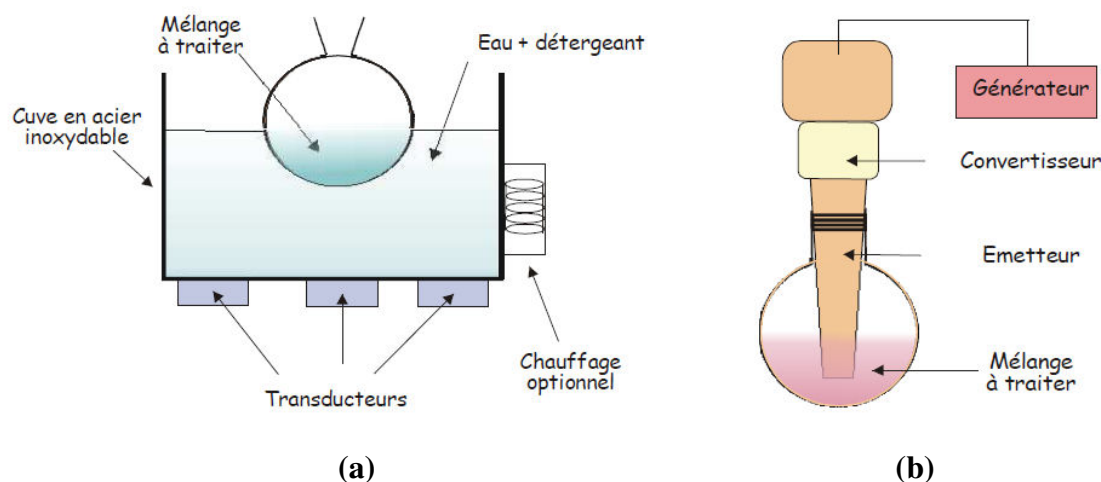


Figure (8) : Schéma d'un dispositif à ultrason : bac (a) et sonde (b)

II.5.Purification de l'artémisinine

La purification est la seconde étape de la production d'artémisinine après l'extraction; en effet, il y a trois méthodes valables pour la purification d'artémisinine ; partition liquide-liquide, purification chromatographique, purification par charbon actif, et charbon actif suivi par cristallisation (N. Q. Liu et al, 2011).

L'isolation avec une grande pureté reste un défi devant la complexité du mélange de produits présents dans l'extrait brut. De ce fait, l'étape de purification nécessite une connaissance adéquate de tous les produits qui constitue l'extrait ainsi que leur séparation, beaucoup d'autres ont une structure similaire à celle d'artémisinine, en plus de la chlorophylle, les cires, les huiles essentielles et d'autres composés. (A. Lapkin, P. Plucinski., 2006)

II.5.1.Purification par cristallisation

L'étape d'extraction doit être suivie par une étape de purification de l'artémisinine à partir de l'extrait brut. Cette étape est achevée en général par une cristallisation séquentielle à partir de la solution d'alcool. Cependant cette étape de purification est commune dans tous les procédés d'extraction.

Au sens général du terme, la cristallisation est le changement d'état dans un milieu liquide ou gazeux qui conduit à la formation d'une phase solide cristalline, caractérisée par une structure géométrique régulière. La cristallisation est une opération de séparation et de purification, parmi les plus efficaces ayant été utilisée dans l'industrie chimique. Elle est également effectuée dans le but de séparer une impureté se trouvant dans un solide (E. Koller., 2001)

La cristallisation peut s'effectuer directement à partir de l'extrait brute, après l'extraction, le solvant existant dans le milieu ou contenu dans la biomasse épuisée doit être éliminé, par une simple évaporation par convection à l'aire libre ou bien par évaporation, condensation récupération, et réutilisation de solvant. Après évaporation à 10% de volume initial, l'extrait brut est soumis à un cycle de cristallisation et de lavage par l'hexane chaud pour éliminer les cires et les autres impuretés puis des re-cristallisations à partir du mélange eau/éthanol en présence du charbon actif pour éliminer le reste des impuretés et est ensuite achevée par une cristallisation (figure 9) (A. Lapkin, P. Plucinski., 2006).

L'optimisation de cette technique nécessite une identification et une élucidation structurale des impuretés qui coexiste avec l'artémisinine dans les cristaux récupérés (Q. Haiyan., et al, 2010).

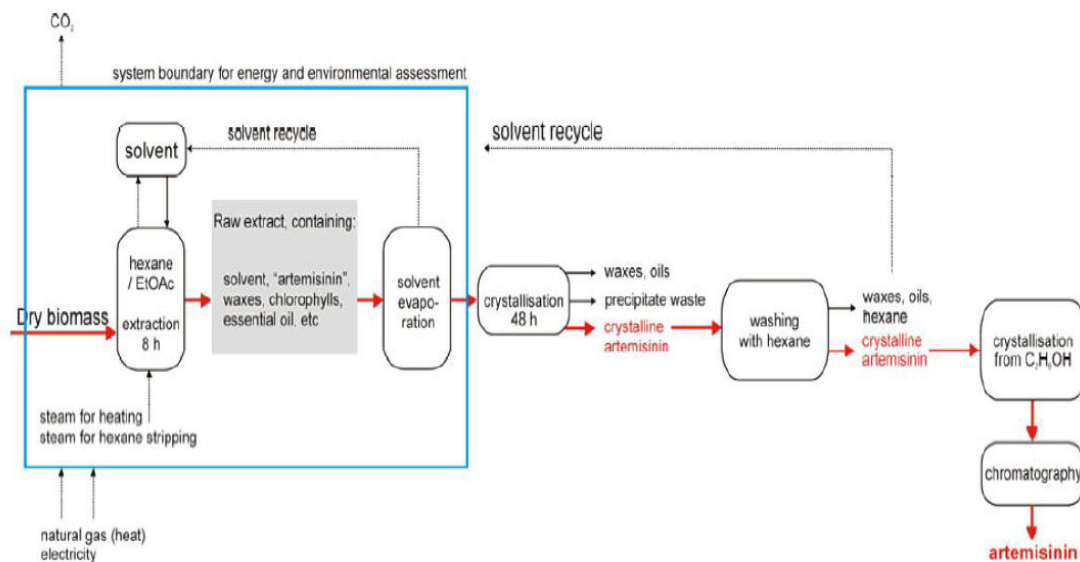


Figure (9) : Schéma résumant la procédure industrielle de purification de l'artémisinine

II.5.2.Purification par partition liquide-liquide

Parmi les techniques de purification, on peut citer l'extraction liquide-liquide de l'artémisinine par de l'hexane et de l'acétonitrile. Cette technique n'est pas utilisée à cause de l'effet néfaste de l'acétonitrile pour l'environnement et pour la santé humaine (A. Lapkin, P. Plucinski., 2006). Ceci a été réalisé aussi à partir de l'extrait éthanolique avec de l'hexane (F. El-Ferally and S. El-Sohly., 1990). Par ailleurs, elle a été conduite en deux étapes par l'acétate de plomb puis par le chloroforme (R. M. S Celeghini et al., 2006).

En effet, la partition liquide-liquide peut enlever successivement une grande quantité d'impuretés, mais l'utilisation de grands volumes de ou des solvants organiques peut augmenter le coût donc les frais de production d'artémisinin.

II.5.3.Purification par charbon actif

Le charbon actif est une forme de charbon qui a été traitée pour le rendre très poreux et d'avoir une plus grande surface spécifique disponible pour l'adsorption et l'assimilation. Le charbon actif est utilisé en général pour la désinfection, le traitement du goût, de l'odeur ou de la couleur, d'où son utilisation pour le traitement des extraits végétaux purs pour l'élimination de la chlorophylle et les pigments. En effet, le charbon actif a montré son efficacité dans l'élimination de la chlorophylle et les pigments à partir de l'extrait brut d'*artémisia annua* (**R.A.F. Rodrigues et al., 2006**); mais un excès de charbon actif peut adsorber aussi une grande quantité d'artémisinin (**N. Q. Liu et al., 2011**).

Mais la technique de cristallisation directe à partir de l'extrait brut, n'est pas faisable dans certains cas comme le cas de l'extrait éthanolique qui est plus riche en impuretés surtout en sucres ce qui inhibe la cristallisation par rapport à l'extrait d'hexane, (**N. Q. Liu et al., 2011**).

II.5.4.Purification par la technique chromatographique

Plusieurs tentatives de purification par chromatographie ont été rapportées. Par exemple, on peut citer l'extraction par éther de pétrole et suivi par la purification chromatographique en gel de silice avec élution par un mélange de d'acétate d'éthyle et du chloroforme (**D. L. Klayman et al., 1984**). Par ailleurs, la purification de l'extrait par hexane a été conduite sur une colonne en gel de silice et éluee par un mélange d'acétate d'éthyle et d'hexane (**A. Singh et al., 1988**). L'inconvénient majeur de cette technique reste son coût, qui nécessite une quantité très importante en adsorbant (taux élevé de soluté: gel de silice, 1:44) qui est trop chère (**S. Kumar et al., 2004**).

Une étude comparative entre la purification par chromatographie sur colonne de gel de silice, sur colonne de florisil et une purification par extraction liquide-liquide a permis de montrer que la purification sur une colonne de florisil reste la plus rapide, la plus efficace et la plus économique avec un grand pourcentage de récupération d'artémisinin (**R. M. S. Celeghini et al., 2006**).

En pratique, la combinaison de deux ou trois techniques de purification a été employée pour obtenir des cristaux purs d'artémisinine. D'autres chercheurs ont pu développer une méthode combinée de purification à partir de l'extrait éthanolique, par l'ajout de la diatomite suivie de purification sur colonne de gel de silice. Les cristaux obtenus sont re-dissouts et re-cristallisés plusieurs fois en présence du charbon actif pour obtenir de cristaux plus purs. (**N. Q. Liu et al, 2011**),

La combinaison de la technique de cristallisation avec la technique de séparation par chromatographie sur colonne, a permis d'isoler de l'artémisinine avec une grande pureté. En effet, les impuretés ayant une solubilité similaire à celle d'artémisinine ce qui a amené les chercheurs à combiner l'effet synergique de la chromatographie sur colonne (CC) et de la cristallisation dans l'amélioration de l'efficacité de processus de purification.

Après fractionnement de l'extrait brut sur colonne de gel de silice, les fractions contenant l'artémisinine sont collectées et sont purifiées par cristallisation en ajoutant un anti-solvant en deux étapes, la première pour éliminer le 1-nonadécaneol qui a une caractéristique chromatographique similaire à celle d'artémisinine mais leurs solubilités sont différentes; et la deuxième étape pour l'obtention de l'artémisinine par sa re-cristallisation (**Q. Haiyan et al, 2010**).

Par ailleurs, des chercheurs ont développé une méthode combinée mais qui évite la CC à cause de son coût. Après l'extraction dans le méthanol, l'extrait est purifié par la technique de chromatographie liquide-liquide, par un mélange de l'hexane et de l'eau, l'artémisinine migre vers l'hexane et les impuretés migrent vers l'eau. Ensuite, le mélange organique de l'hexane est traité par du charbon actif pour éliminer la chlorophylle, suivi d'une cristallisation à froid pour obtenir l'artémisinine en grande pureté (**S. Kumar et al, 2004**).

II.5.5.Purification par procédés membranaires

Une membrane peut être définie comme une barrière séparant deux compartiments et permettant le passage préférentiel d'au moins une espèce parmi les autres sous l'action d'une force de transfert (figure 10) (**R. Audinos, 2001**).

Dans des procédés de séparations, ces membranes permettront de concentrer, de purifier ou de fractionner une solution en contrôlant et en orientant les échanges de matière à travers la barrière sélective que constitue la membrane pour réaliser des séparations spécifiques dans divers secteurs de l'industrie.

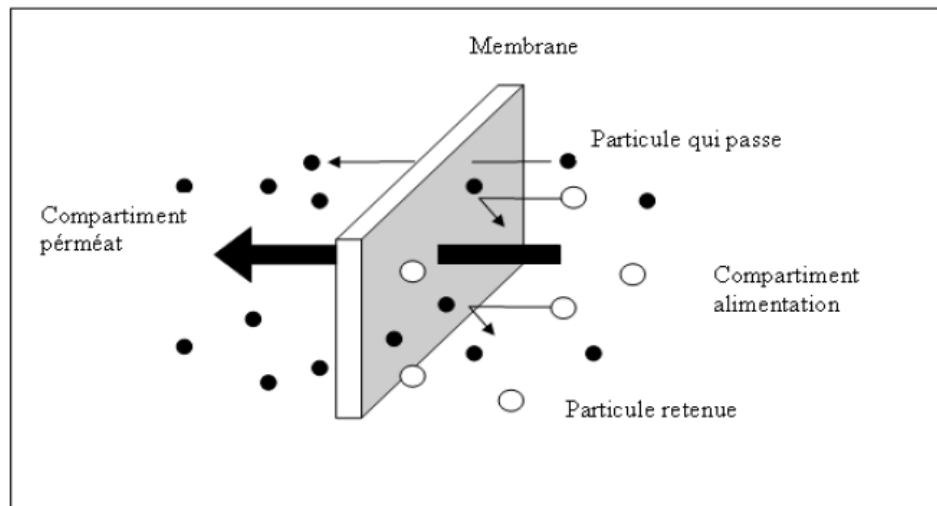


Figure 10 : Sélectivité d'une membrane (adapté à partir des travaux de Malleval et al., 1996).

II.5.5.1. Classification des membranes

On peut classer les procédés membranaires selon la nature, la structure et la forme physique de la membrane, ainsi que selon la force motrice ou bien la nature des phases. (A. Arzat, 2008)

1. Nature

Membranes minérales : ou céramiques, elles sont de type composite, (zircon ZrO_2 ou oxyde de titane TiO_2 , sur support carbone macroporeux ou bien sur de l'alumine Al_2O_3). Elles sont largement répandues et utilisées du fait de leur grande sélectivité et perméabilité. D'autre part, elles présentent une bonne résistance chimique, mécanique et surtout thermique, et peuvent être soumises facilement à des procédés de nettoyage assez agressifs sans trop être altérées.

Membranes organiques : sont fabriquées à partir des polymères. Les dérivés cellulosiques restent encore très utiles, ainsi que les polyamides. D'autres polymères tels que les polysulfones (PS), les polyacrylonitriles (PAN), les polyfluorures de vinylidène (PVDF) sont de plus en plus répandus car ils résistent mieux à l'oxydation, au pH où à la température.

2. Porosité

Membranes poreuses : Ce type de membranes est similaire par sa structure au filtre conventionnel. La séparation du soluté par des membranes poreuses est principalement réalisée en fonction de la taille moléculaire, de la distribution et de la taille des pores.

Généralement, en vue d'une meilleure sélectivité, une membrane poreuse est confectionnée de façon à comporter une distribution des diamètres des pores centrés autour d'une seule valeur (micropores, mésopores, ou macropores).

Membranes denses : Elles consistent en un film dense à travers lequel le perméât est transporté par diffusion sous l'effet d'une force de pression, de concentration ou de gradient de potentiel électrique. La séparation des composés d'un mélange est directement liée à leur diffusivité et à leur solubilité à travers la membrane. Ainsi, une membrane dense peut séparer des composés de taille voisine si leur solubilité (concentration dans la membrane) diffère.

Membranes liquides: C'est un système dont le concept a été développé vers la fin des années soixante aux Etats unis. Il est constitué de trois phases liquides, deux phases complètement miscibles entre elles (phase d'alimentation A et phase de réception R), séparées par une phase membranaire M, appelée membrane liquide, non miscibles avec les deux premières phases. L'objectif est de transférer un ou plusieurs solutés S de l'alimentation A vers la réception R.

3. Fabrication

Pour obtenir une perméabilité sélective élevée compatible avec un usage industriel, il est nécessaire que la barrière soit la plus mince possible. Il en résulte une certaine fragilité qui a été palliée par la consolidation de la barrière mince par différents moyens que ce soit un support de même nature ou de nature différente. Dans ce cas, on peut distinguer (figure 11) :

Membranes isotropes (symétriques) : Ce sont des membranes denses ou poreuses qui ont la même structure le long de leur épaisseur.

Membranes anisotropes (asymétriques) : Elles sont formées d'une couche très fine déposée sur un support poreux plus épais. Les propriétés de séparation et de perméabilité sont assurées par la fine couche extérieure alors que la structure interne assure le support mécanique. Dans ce cas, des flux élevés sont souhaités pour des raisons économiques, donc des membranes aussi fines que possible sont recommandées.

Membranes composites : Ce type de membranes est de nature organique et anisotrope. Elles sont caractérisées par une structure asymétrique dont la peau est beaucoup plus fine que celle des membranes classiques non composites et aussi par la superposition de plusieurs couches différenciées par leur nature chimique ou bien par leur état physique. Elles peuvent être organiques (superposition de polymères organiques différents), organo-minérales ou minérales (association de carbone ou d'alumine comme support et de métaux tels que le zircon, l'aluminium ou le titane). Ces membranes sont formées d'une matrice au centre sur

laquelle est déposée une couche anisotrope de polymères poreux qui supporte une fine couche de polymères ajoutés attribuant à la membrane ces propriétés de rétention et de flux.

Membranes à charge électrique : Souvent utilisés électrodialyse et en osmose inverse, ces membranes peuvent être denses ou poreuses dont les parois sont chargées d'ions positifs ou négatifs ce qui peut favoriser le passage de cations ou d'anions. De ce fait, la séparation est basée principalement sur la répulsion des ions de même charge ainsi que sur la taille des pores. La séparation est contrôlée par la charge et la concentration de l'ion.

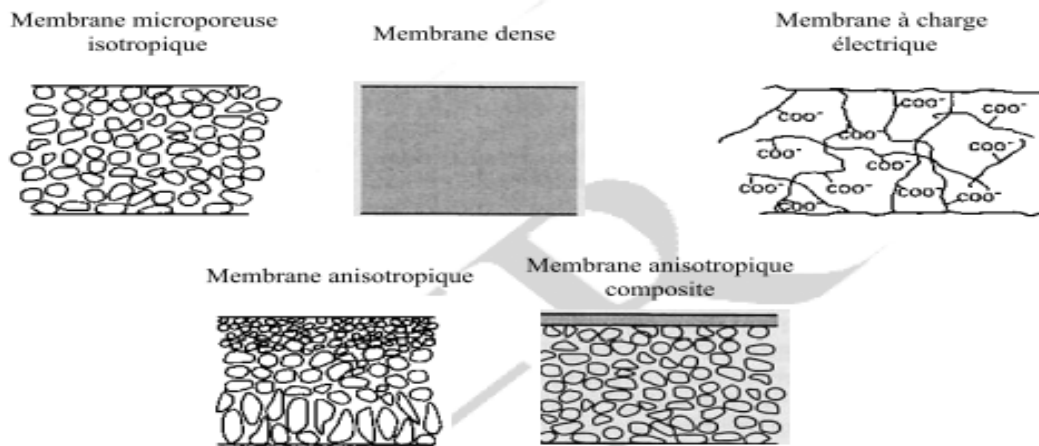


Figure 11 : Différents types de membranes selon leur structure.

4. Géométrie

Selon la littérature, quatre types de modules sont disponibles actuellement pour des applications industrielles: (**J.M. BERLAND et C. JUERY., 2002**).

Module plan : les membranes en feuilles sont montées de part et d'autre de cadres rigides. Ces membranes sont empilées en mille-feuilles séparées par des cadres intermédiaires afin d'assurer la circulation des fluides.

Module tubulaire : les membranes se présentent sous forme de tubes regroupés en parallèle dans un module. L'eau à traiter circule à l'intérieur de ces tubes et le perméât est recueilli à l'extérieur des tubes. Ces derniers constituent des canaux d'écoulement tangentiels.

Module spirale : ce type de membranes est composé d'un tube poreux sur lequel sont enroulés successivement une membrane, une grille fine en plastique, une membrane, une grille plus grossière en plastique. En résumé, on obtient ainsi un cylindre multicouche où le perméât s'écoule selon un chemin spiralé vers le tube poreux tandis que l'alimentation circule axialement à travers les canaux.

Module creux : ce type de module se présente comme un ensemble de fibres creuses regroupées dans une enveloppe et sont assemblées en parallèle suivant deux configurations selon où le perméât est collecté, soit à l'extérieur ou bien à l'intérieur des fibres.

II.5.5.2. Types de procédés membranaires

Les membranes sont généralement caractérisées par leur taille des pores, leur seuil de coupure relatif à une masse moléculaire critique, leur sélectivité ainsi que par leur perméabilité à l'eau pure dans des conditions standards (A. ARZAT, 2008 ; J.M. BERLAND. et C. JUERY, 2002).

On peut classer les membranes selon la force motrice. La force motrice peut être provoquée par un gradient de pression (procédés baro-membranaires), de température (procédés thermo-membranaires) de potentiel chimique (les procédés chimio-membranaires) ou de potentiel électrique (procédés électro-membranaires).

Les mécanismes de filtration diffèrent d'un procédé à un autre. Pour les membranes poreuses, les mécanismes mis en jeu sont la convection et la diffusion tandis que la convection domine en microfiltration. Par ailleurs, on retrouve le mécanisme de diffusion dans le cas de la nanofiltration. Pour l'osmose inverse, la membrane est dense et le mécanisme est une solubilisation puis une diffusion dans le matériau membranaire où seules les substances solubles dans la membrane sont susceptibles de la traverser (A. ARZAT., 2008).

a. Les procédés baro-membranaires

Ces procédés permettent de séparer les particules qui traversent la membrane. Le passage des particules dont la taille est inférieure à celle des pores de la membrane est sous la force de la pression qui doit vaincre la pression osmotique. Selon la porosité de la membrane et la pression appliquée, on peut distinguer :

La microfiltration : Ce procédé de séparation met en œuvre des membranes dont le diamètre de pores est compris entre 0,1 et 10 μm . Il permet la rétention des particules en suspension, des bactéries et indirectement des colloïdes et certains ions après fixation de ces derniers sur de plus grosses particules obtenues par complexation, par précipitation ou par floculation.

L'ultrafiltration : elle utilise des membranes microporeuses dont les diamètres des pores sont compris entre 1 et 100 nm. De telles membranes laissent passer les petites molécules (eau, sels) et arrêtent les molécules de masse molaire élevée (polymères, protéines, colloïdes)

(A. MAUREL., 1993). Pour cette raison, elle est utilisée pour l'élimination de macro-solutés présents dans les effluents ou dans les eaux à usage domestique, industriel ou médical.

La nanofiltration : Cette technique se situe entre l'osmose inverse et l'ultrafiltration. Elle permet la séparation de composants ayant une taille en solution voisine de celle du nanomètre (soit 10 \AA). Il est important de noter que les sels ionisés monovalents et les composés organiques non ionisés de masse molaire inférieure à environ (200 – 250) g/mol ne sont pas retenus par ce type de membrane. Par contre, les sels ionisés multivalents (calcium, magnésium, aluminium, sulfates...) et les composés organiques non ionisés de masse molaire supérieure à environ 250 g/mol sont, par contre, fortement retenus (A. MAUREL., 1993).

L'osmose inverse : Dans cette technique, on utilise des membranes denses, semi-perméables et qui ne laissent passer que de l'eau (le soluté ne passe pas) afin d'équilibrer les concentrations. La différence de concentration crée une pression, appelée pression osmotique. Pour inverser le passage du solvant et augmenter la différence de concentration, il faut appliquer une pression supérieure à la pression osmotique.

Le tableau 5 résume les caractéristiques des quatre différents procédés Baro-membranaire.

Tableau 5 : Procédés Baro-membranaire.

	microfiltration	ultrafiltration	Nanofiltration	Osmose inverse
Caractéristique de la membrane	Poreuse Convection	Poreuse Convection	Poreuse Solubilisation/diffusion +convection	Dense Solubilisation/diffusion
Perméation de	Solvants et espèces dissouts	Solvants, sels petites molécules	Solvants, ions monovalents, petites molécules	solvants
Rétention de	Colloïdes	Macromolécules et colloïdes	Petites molécules, $M > 300 \text{ g/mol}$, ions	sels
Pression et débit d'opération usuel	0,2 à 2 bar 150 à 1500 $\text{l/h}\cdot\text{m}^3$	2 à 10 bar 50 à 300 $\text{l/h}\cdot\text{m}^3$	7 à 40 bar 50 à 100 $\text{l/h}\cdot\text{m}^3$	30 à 80 bar 10 à 60 $\text{l/h}\cdot\text{m}^3$
Application	Purification de l'eau. stérilisation.	Purification de mélange moléculaire (grosse molécule)	Purification de mélange moléculaire (taille faible).	Dessalement de l'eau de mer

b. Les procédés électro-membranaires

La force motrice de ce procédé d'électrodialyse est le potentiel électrique dans laquelle des espèces ionisées minérales ou organiques dissoutes, telles que les sels, les acides ou les bases sont transportées à travers des membranes chargées et dotées d'une perméabilité sélective. Sous l'action d'un champ électrique, les cations migrent vers la cathode et les anions migrent vers l'anode en traversant sélectivement les membranes échangeuses de cations (MEC) et les membranes échangeuses d'anions (MEA). Grâce à une disposition alternée des membranes, les ions capables de traverser les membranes cationiques sont arrêtés par les membranes anioniques et réciproquement, il en résulte une séparation des anions et des cations dans des compartiments différents. L'électrodialyse est utilisée lors de:

- * La séparation des ions métalliques et la concentration des acides minéraux.
- * La déminéralisation des effluents liquides industriels (lactosérum en industrie alimentaire)
- * La régénération d'acide et de base à partir d'un sel.
- * et du dessalement des eaux saumâtres, et la production de saumures à partir de l'eau de mer.

c. Les procédés chimio-membranaires (dialyse)

La dialyse est un procédé où des solutés ioniques ou non peuvent être transportés à travers une membrane organique selon leur gradient d'activité (du compartiment le plus concentré vers le moins concentré jusqu'à l'égalité des potentiels chimiques). La pervaporation est une technique basée également sur le potentiel chimique, mais cette technique permet aussi de séparer des mélanges liquides en vaporisant l'un des composants à travers une membrane dense.

d. Les procédés thermo-membranaires (distillation sur membrane)

La plupart des procédés membranaires sont isothermes. Quand la membrane sépare deux phases maintenues à des températures différentes, il se produit alors un transfert de chaleur de la phase à haute température vers la phase à basse température. Les membranes utilisées dans cette technique dite distillation par membranes sont préparées à base de polypropylène (PP) ou bien du poly-tetrafluoro-éthylène (PTFE). Les solutions ne doivent pas mouiller la membrane sinon les pores seront remplis. Cela implique qu'une membrane hydrophobe poreuse non mouillée doit être utilisée dans le cas des solutions aqueuses. Les principales applications sont la production d'eau pure et le dessalement de l'eau de mer.

II.5.5.3. Avantages et limitations des méthodes de séparations membranaires

Plusieurs avantages sont dénombrés pour ces procédés de séparation à base de membranes. Leur utilisation permet de travailler dans les conditions favorables suivantes :

- Une température modérée favorable à la séparation de composés thermosensibles.
- Un caractère compact et modulaire des installations et par conséquent une construction sur mesure par ajout d'éléments standards et une maintenance relativement simple.
- Une extraction de produits en continu des milieux entièrement isolés de l'extérieur par le film séparateur et donc l'élimination de toute contamination croisée entre l'amont et l'aval.
- Une sélectivité élevée.
- Un coût d'exploitation modéré.
- Un temps de séparation relativement réduit.
- Un grand respect pour l'environnement :
 - L'absence d'ajout de produits chimiques.
 - Un très faible rejet de polluant.
 - Un besoin énergétique restreint.

Malgré les nombreux avantages déjà cités, les méthodes membranaires souffrent encore de certaines limitations et plusieurs inconvénients :

- Un coût d'investissement à l'échelle industrielle relativement élevé.
- Un traitement spécifique à certains types d'effluents.
- Le colmatage, par des particules ou des microorganismes et donc la diminution des flux transmembranaires et la nécessité de mettre en œuvre des opérations de lavage.
- La durée de vie limitée des membranes.

Toutefois, les possibilités qu'offrent ces procédés n'ont pas encore été toute explorées, en particulier, leur couplage avec d'autres procédés de séparations (distillation par exemple).

Chapitre III

PARTIE EXPERIMENTALE

III.1. Matériel

La plante *Artemisia annua*, est fournie par la fondation MundoSano (Argentine). Afin de faciliter l'extraction, la plante est séchée et broyée, après elle est mise en contact avec le solvant d'extraction dans un réacteur à double paroi. Dans notre cas, un mélange d'hexane/acétate d'éthyle (95/5) est utilisé. Par ailleurs, du fait de la grande solubilité de l'artémisinine dans l'acétonitrile, ce dernier est utilisé pour la préparation des solutions étalons ainsi que pour l'extraction des composés retenus sur la membrane de Triacétate de cellulose (TAC).

III.2. Méthodes

III.2.1. Techniques d'extraction conventionnelle (macération à chaud)

Elle consiste à mettre la plante séchée et broyée *Artemisia annua* L en contact direct avec le mélange de solvants sous agitation magnétique pour un meilleur contact solide-liquide. L'extraction est réalisée à l'aide d'un réacteur à double paroi lié à un bain thermostaté afin de garder la température d'extraction fixe. Dans notre cas plusieurs températures ont été testées à savoir 20, 30 et 40°C. Ces températures ont été choisies selon les données rapportées par la littérature (Lapkin et *al.*, 2009) et la sensibilité de l'artémisinine aux températures élevées.

Pour cela, une quantité de 20g de la plante est introduite avec 120 mL de mélange de solvant (hexane : acétate d'éthyle 95:5) dans une proportion de 1/6 de masse/volume. En plus, une cinétique d'extraction a été conduite en suivant la teneur en artémisinine (exprimée en mg/g de plante séchée) au cours du temps jusqu'à atteindre l'équilibre.

III.2.2. Extraction sous ultrasons

En parallèle, des essais sous ultrasons sont conduits avec un système à ultrasons **REUS, France** (Figure 12). Dans ce cas, l'échantillon est mis en contact avec le solvant, dans les mêmes proportions que celle de la technique conventionnelle, dans un réacteur à double paroi lié à un bain thermostaté qui permet de fixer la température à 20, 30, et à 40°C, dans lequel on introduit une sonde liée à un générateur d'ultrasons opérant à une fréquence de 25 kHz et qui permet d'émettre des vibrations sonores dans la solution avec une intensité de $1\text{W}/\text{cm}^2$.

III.2.3. Traitement de l'extrait

Après l'étape de l'extraction, l'extrait obtenu pour chaque technique (conventionnelle ou sous ultrasons) est traité par charbon actif à 1% (1% masse/volume, g/ml). Cet adsorbant est connu pour son efficacité dans l'adsorption et l'élimination des pigments (**R.A.F.Rodrigues et al., 2006**). Dans notre situation, cette étape permettra de purifier l'extrait en éliminant la chlorophylle, étant co-extraite avec le principe actif du fait de la présence de l'acétate d'éthyle dans notre mélange de solvants. Après 30 minutes d'agitation, on ajoute à la même solution de la célite (celite[®] 545) avec un rapport de 2%, (2g pour 1mL de solution), suivi d'une agitation pendant 30 min, afin d'éliminer les impuretés tels que les acides gras et quelques terpènes.



Figure 12 : Système d'extraction sous ultrasons avec contrôle de température du réacteur

Ce mélange est filtré sur papier filtre Watman (90 mm de diamètre et 40 μ m de diamètre) afin de récupérer un extrait de meilleure pureté tout en éliminant les traces des adsorbants utilisés, le charbon actif et la célite. Il est important de noter que des échantillons ont été pris au fur et à mesure de chaque étape et soumis pour analyse HPLC afin de suivre l'influence de chaque procédé sur la teneur en artémisinine.

Par ailleurs, des essais de cristallisation de l'artémisinine ont été conduits afin de déterminer la pureté des cristaux obtenus. Dans cette partie, l'échantillon récupéré est évaporé à l'aide d'un rotavapeur jusqu'à une quantité de 5-10 mL puis récupéré dans un flacon. Ce dernier est stocké dans un réfrigérateur à 4°C pendant plusieurs jours afin d'atteindre un équilibre de

crystallisation. Après, on procède à la filtration de l'échantillon sur une membrane en nylon d'un diamètre de 0,22 μm à l'aide d'une unité de filtration sous vide. Les cristaux d'artémisinine récupérés dans le filtre sont soumis à un séchage avant d'être soumis pour analyse par HPLC pour déterminer leur pureté (figure 13).

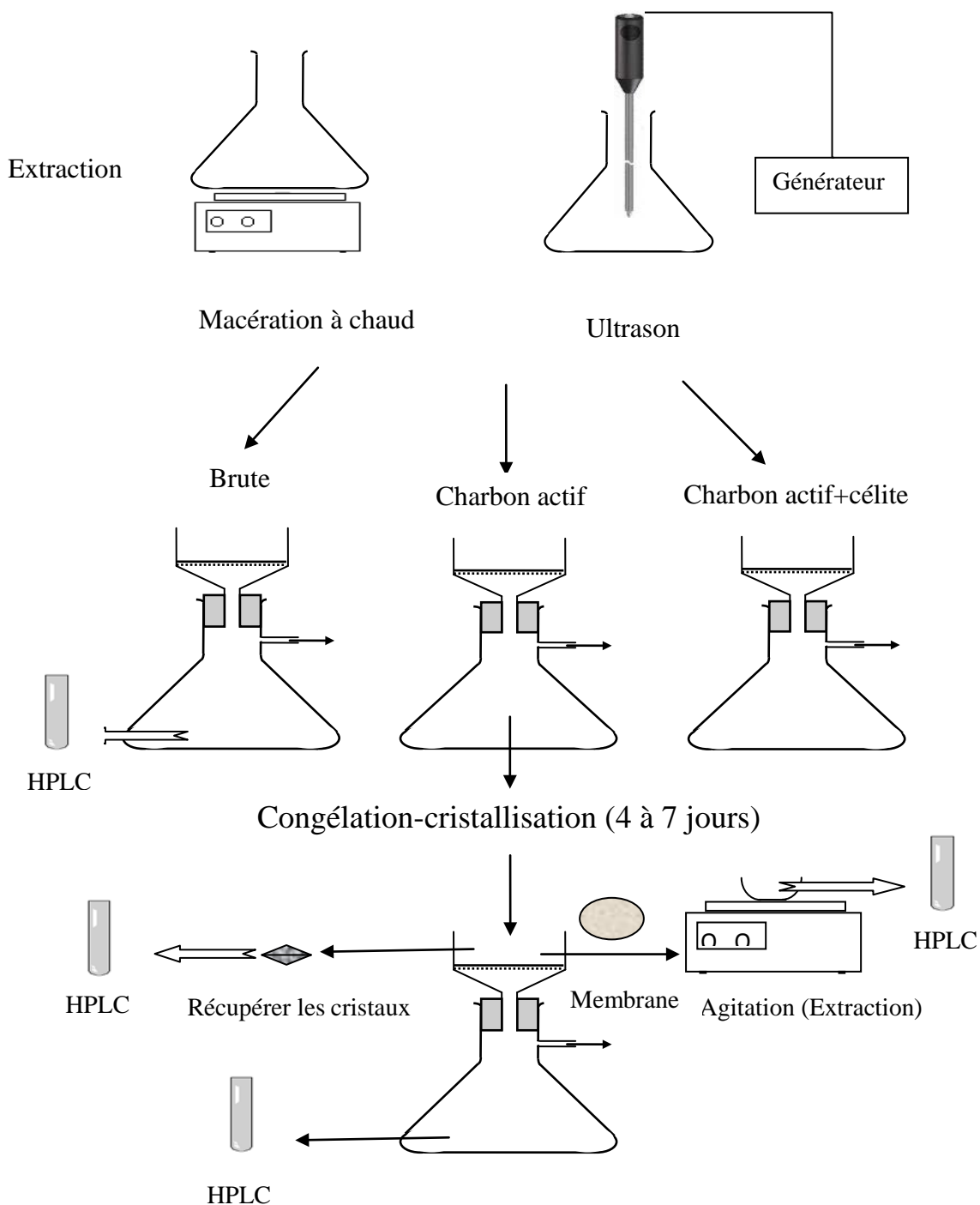


Figure (13) : description du procédé d'extraction et de purification

III.2.4. Elaboration des membranes

Pour la synthèse de la membrane de triacétate de cellulose (TAC), on procède en premier lieu à dissoudre une quantité de 0,4 g de TAC dans 40 mL de chloroforme sous agitation pendant 5 h. Puis on rajoute 0,1 mL du plastifiant le dioctylephtalate (DOP) (**figure 14**). Le mélange obtenu est laissé sous agitation pendant 1 heure. La solution obtenue est versée sur des surfaces différentes permettant l'obtention des membranes à des épaisseurs différentes, et par conséquent à porosités différentes. Le solvant est laissé s'évaporer lentement pendant au moins 24 heures. La membrane formée est ensuite enlevée en rajoutant quelques gouttes d'eau distillée, puis séchée avec un papier absorbant.

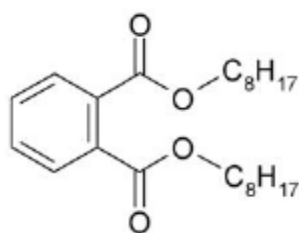


Figure 14 : La formule chimique semi-développée du plastifiant dioctylephtalate (DOP).

Les caractéristiques des trois différentes membranes utilisées au cours de ce travail sont regroupées dans le tableau 6.

Tableau 6: Quelques caractéristiques des trois membranes utilisées.

Membrane	Epaisseur (μm)	Porosité (%)	Diamètre des pores (μm)
Polypropylène (Celgard 2500)	25	45	0.04
Triacétate de Cellulose (TAC)	15	50	0.5-2
Triacétate de Cellulose plastifié (TAC+DOP)	22	15	0.01-0.1

III.2.4.1. Caractérisation par microscopie électronique à balayage (MEB)

L'analyse par microscopie électronique à balayage est une technique qui peut fournir le maximum d'informations sur l'état de surface et sur l'homogénéité des matériaux synthétisés, l'appareil utilisé est de type JOEL JSM-6360 LV. La figure représente les morphologies des différentes membranes observées en surface.

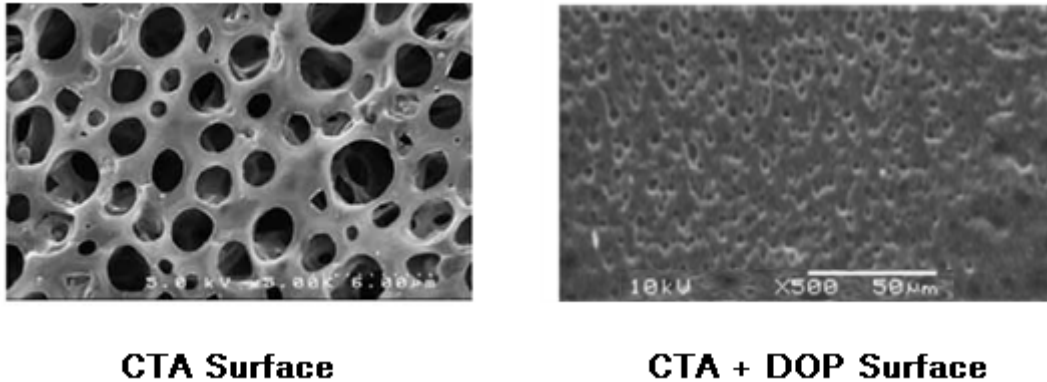


Figure 15 : la morphologie de la membrane TAC observée par MEB

Nous constatons que le diamètre moyen des pores de la membrane élaborée à partir du polymère triacétate de cellulose (TAC) varie entre $0.5\mu\text{m}$ et $2\mu\text{m}$ avec une porosité de 50%. Concernant la membrane constituée du polymère TAC plastifiée par le dioctylphthalate (DOP) la porosité avoisine les 15% et le diamètre moyen des pores varie entre 0.01 et $0.1\mu\text{m}$, donc c'est une membrane ce situ dans le domaine d'ultrafiltration, et pour la membrane synthétique de polypropylène ce situ dans le domaine de microfiltration ; et la pression appliqué pendant la filtration sur les deux type de membrane commercial à base de polypropylène et la membrane synthétique (TAC+DOP) est de l'ordre de $0,3\text{ bar}$.

III.2.4.2. Caractérisation de la membrane élaborée par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR):

La Spectroscopie Infra Rouge à Transformée de Fourier (FTIR) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Le domaine infrarouge est compris entre 4000 cm^{-1} et 400 cm^{-1} ($2.5\mu\text{m} - 25\mu\text{m}$) correspond au domaine d'énergie de vibration des molécules. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques d'identifier les fonctions chimiques présentes dans le matériau. Lorsque la longueur d'onde (l'énergie) apportée par le faisceau lumineux est voisine de l'énergie de vibration de la molécule, cette dernière absorbe le rayonnement et une diminution de l'intensité transmise est enregistrée.

La caractérisation et l'étude qualitative de la membrane synthétisée (TAC+DOP), par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier, a été effectuée à l'aide d'un appareil de

marque Perkin Elmer (Spectrum one), avec un nombre de balayage égal à 10 et une résolution de 2 cm^{-1} . La figure 16 représente le spectre FTIR de la membrane préparée.

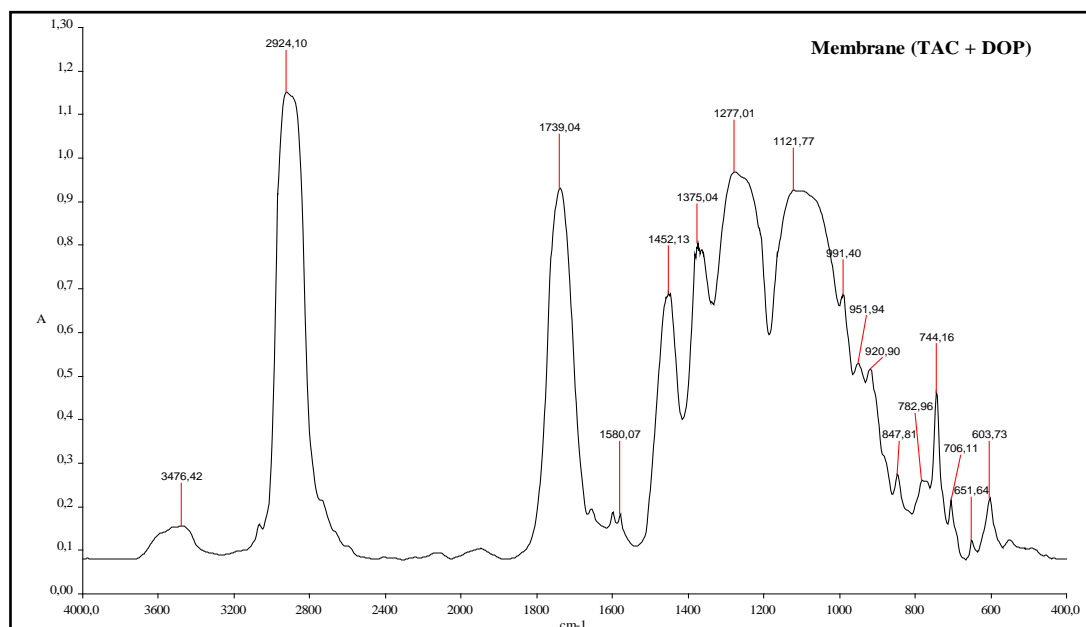


Figure 16 : Spectre FTIR de la membrane TAC+DOP.

Le traitement du spectre FTIR a permis de déduire les principales fonctions pour cette membrane. Le tableau 7 résume les valeurs des pics correspondants aux principales fonctions des deux constituants de la membrane. Ce tableau permet de constater la présence de toutes les fonctions du polymère et du plastifiant confirmant ainsi que le film homogène obtenu (membrane) contient le TAC et le DOP.

Tableau 7 : Attribution des groupements fonctionnels correspondants aux longueurs d'ondes

Membrane	Longueur d'onde du pic (cm^{-1})	Radical correspondant
TAC + DOP	3476	O – H (TAC)
	2924	C – H (TAC- DOP)
	1739	C = O (TAC- DOP)
	1657	C = C (DOP)
	1452	– CH ₂ (TAC- DOP)
	1375	– CH ₃ (TAC- DOP)
	1277	C – O – C assym (TAC- DOP)
	1121	C – O – C sym (TAC - DOP)

Ce résultat confirme que dans la membrane élaborée, le polymère englobe dans sa matrice le plastifiant.

III.2.4.3. Caractérisation par diffraction de rayon X

La caractérisation par diffraction des rayons X est une analyse permettant de prévoir le mécanisme du transport à travers les membranes synthétisées. Selon la littérature, deux mécanismes de transport peuvent exister :

- Le mécanisme par saut d'un site moléculaire à un autre quand la membrane est cristalline.
- Le mécanisme par diffusion lorsque la membrane est amorphe.

La figure 17 représente le diffractogramme DRX de la membrane synthétisée. Nous remarquons que la membrane TAC+DOP est un matériau amorphe et ne présente aucune diffraction.

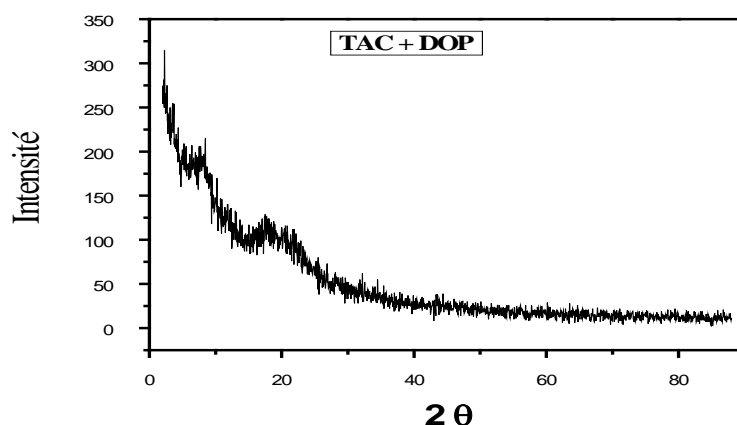


Figure 17: Spectre de diffraction-X de la membrane TAC+DOP

III.2.5. Techniques d'analyses de l'artémisinine

Avec l'augmentation du nombre de fournisseur de l'artémisinine dans le marché, et l'amélioration de la qualité du matériel d'extraction, plusieurs techniques d'analyse ont été utilisées pour la mesure de la teneur en artémisinine dans la biomasse et dans l'extrait purifié.

En effet, la détection par HPLC-UV se présente certainement comme une option viable pour la quantification d'artémisinine purifié, ayant une très bonne sensibilité et une meilleure limite de détection par rapport à HPLC-ELSD (détecteur à entraînement de lumière d'électrons) et

HPLC-RI (détecteur à indice de réfraction). Cependant, la détection par la méthode ELSD est plus performante dans le cas de l'extrait brut permettant une identification plus simple du pic de l'artémisinine, cette dernière montre une limite de détection similaire à celle de HPLC-RI. Dans cet esprit, une modification de la méthode LC-MS a été signalée, en fournissant une très grande sensibilité à l'artémisinine et ses analogues (**A. Lapkin et al., 2009**).

Par ailleurs, la technique RMN a été aussi proposée bien qu'aucune donnée de validation (limite de détection/ quantification et précision) n'a été rapportée.

En général, la méthode HPLC-ELSD apparaît plus fiable dans le cas d'analyse d'extrait brute, ainsi que lors de l'optimisation du protocole extraction/purification, alors que la méthode HPLC-UV s'avère très reproductible pour l'analyse de leur pureté (**A. Lapkin et al., 2009**).

Dans notre cas, la chromatographie liquide à haute performance avec détecteur UV/visible (HPLC-UV) avec une détection à 220nm a été sélectionnée pour l'analyse de nos échantillons. Les paramètres cités ci-dessous ont été déjà validés par des travaux antérieurs et par les travaux de recherches dans le CRAPC (**A. Lapkin et al., 2009 et A. Benmechour, 2010**).

Les conditions opératoires utilisées sont les suivantes :

- Appareille HPAgilent1100
- Phase mobile en isocratique: acétonitrile 65%, eau 35%.
- Phase stationnaire : Colonne C18 Hyper sil : 120°A ODS 3; (250x5,4)mm (id: 4,6µm).
- Débit de phase mobile: 0,8 mL/min.
- Détecteur UV: Longueur d'onde 220 nm.
- Température de la colonne : 40°C.

III.3. Résultats et discussion

III.3.1. Courbe d'étalonnage

L'étalon d'artémisinine utilisé est une poudre cristalline blanche pur à 99% (NeemBiotech, Royaume Uni). La solution étalon mère (C_0) a été préparée en pesant 40 mg d'artémisinine qui est dissoute dans 10mL d'acétonitrile pour donner lieu à une concentration de l'ordre de 4 mg/mL. D'autres solutions ont été préparées à partir de la solution mère (C_0) ayant les concentrations suivantes : 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25 et 0,125mg/mL. Le tracé de la concentration en fonction de la surface du pic d'artémisinine (figure 18) donne une droite linéaire avec un coefficient de corrélation de $R^2 = 0,999$.

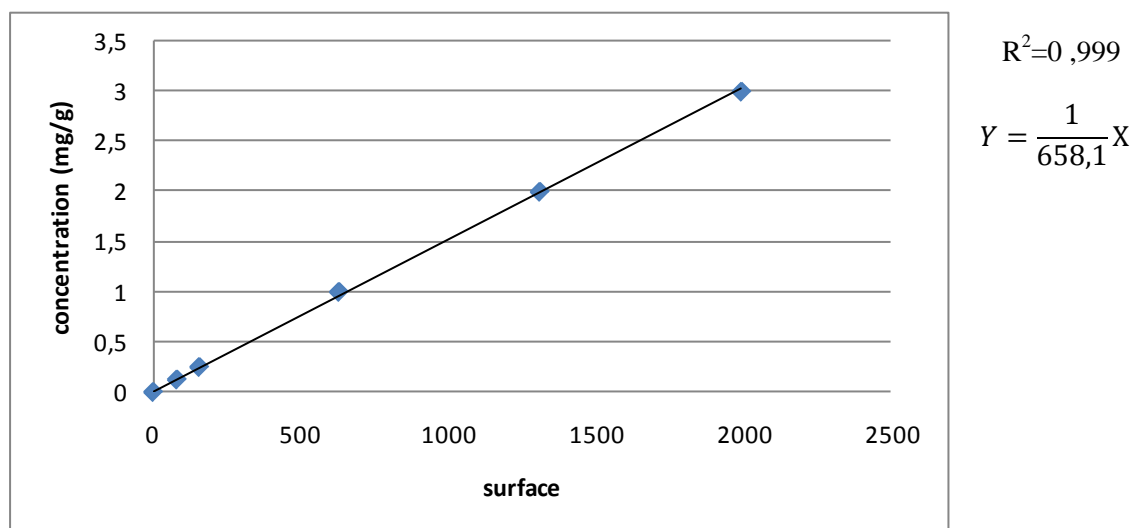


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de l'artémisinine (0,125 à 4 mg/mL)

Cette courbe d'étalonnage permet de déduire la concentration en artémisinine sous ses différents états : extrait brut, extrait purifié et cristaux dissous ainsi que pour évaluer l'efficacité des membranes utilisées.

III.3.2. Influence de la technique et de la température sur le rendement d'extraction

Dans l'objectif d'optimiser et d'améliorer le rendement d'extraction et de déterminer les conditions optimales d'extraction, nous avons conduits une étude comparative entre la technique conventionnelle (macération à chaud : CONV) et celles utilisant les ultrasons (US) et ceci à deux températures différentes 30°C et 40°C, en gardant les mêmes conditions opératoires.

Les résultats des cinétiques d'extraction pour les deux méthodes et dans les deux températures sont illustrés par la figure 19. Les résultats montrent de nettes différences dans l'allure des courbes de cinétiques d'extractions de l'artémisinine avec une vitesse d'extraction plus importante pour les ultrasons au début de l'extraction par rapport à la méthode conventionnelle avant d'atteindre un équilibre d'extraction à partir de 20 min.

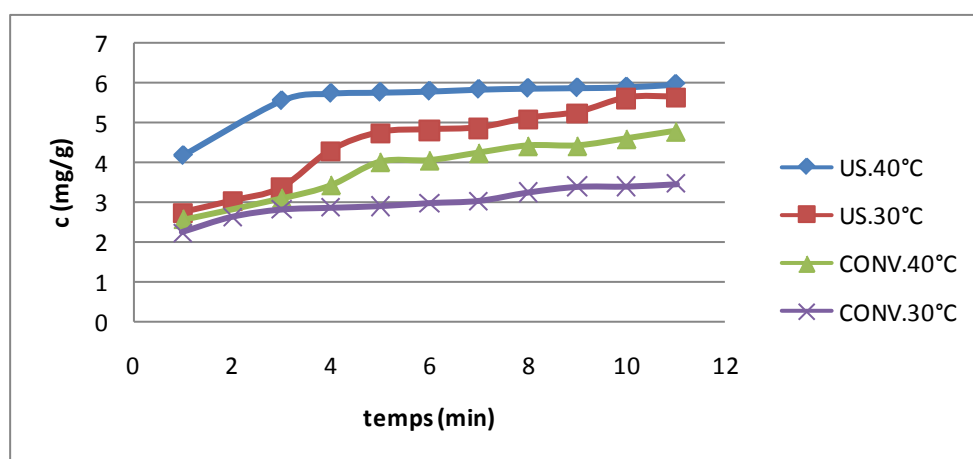


Figure 19 : Influence de la température et la technique sur la cinétique d'extraction

De plus, le rendement d'extraction a été amélioré avec l'augmentation de la température, ce qui signifie que le rendement dépend en partie de la température. Ceci est en partie évident à cause de l'augmentation de la solubilité avec l'augmentation de la température. Notons ici que le rendement d'extraction obtenu par les ultrasons à 30°C (5,65mg/g) est supérieur à celui obtenu à 40°C par la technique conventionnelle (4,95mg/g) (Tableau 8). Ceci prouve l'efficacité des ultrasons dans l'accélération de l'extraction, spécialement à des températures plus basses. Ainsi, nous pouvons constater aussi, à partir de la figure 8, qu'après 10 min d'extraction l'écart dans les rendements est devenu plus important entre les deux techniques.

Tableau 8 : Influence de la température sur les rendements d'extractions à l'équilibre

	Température (°C)	Artemisinin (mg/g)	Rendement d'extraction % *
Conventionnelle	40	4,95	82,5
	30	3,46	57,67
Ultrasons	40	5,98	99,67
	30	5,65	94,17

* Les rendements d'extraction sont calculés sur la base d'une quantité d'artémisinine maximale de 6 mg/g que peut contenir cette variété (J. y. Hao et al., 2002)

Les avantages apportés en termes de rendement et d'énergie sont évidents dans ce cas puisqu'on procède en ultrasons à une température moins de 10°C par rapport au procédé conventionnelle. Ces résultats sont en accordance avec ceux obtenus par Romdhane et al (**M. Romdhane., et al 2002**) relatifs à l'extraction sous ultrasons de la pyréthrine à partir des fleurs de *Chrysanthème* (*Chrysanthemum cineraria*), et ceux obtenus par Chemat et al. (**S.Chemat et al., 2004**), dans l'extraction sous ultrasons de la carvone et du limonène à partir du *Carum carvi* L. qui ont rapporté que les rendements sont nettement plus importants lorsque les ultrasons sont utilisés.

III.3.3. Etude cinétique

Les cinétiques d'extraction de l'artémisinine, représentées graphiquement par les courbes de la teneur y (mg/g) en fonction du temps t (min), sont illustrées par les figures 19. Nous remarquons que la vitesse d'extraction est très rapide au début de l'extraction pour les deux méthodes puis elle diminue graduellement avec le temps jusqu'à atteindre un palier d'équilibre pour donner des concentrations de l'ordre de 5,9 mg/g et 4,9 mg/g respectivement pour celle réalisée sous ultrasons et par la technique conventionnelle. En plus, il est important de noter que la vitesse reste toujours importante dans la méthode utilisant les ultrasons par rapport à celle utilisant le chauffage classique (macération). Par conséquent, la procédure assistée par les ultrasons à sonde présente une augmentation significative de rendement au cours de l'étape initiale d'extraction, sachant que près de 70% (4,42 mg/g) de notre principe actif est extrait dans les premières dix minutes. En parallèle, la même quantité n'a pu être recouverte qu'après 60 minutes d'extraction conventionnelle. L'accélération de l'extraction par les ultrasons peut être expliquée par l'intensification de transfert de matière à l'aide de l'effet mécanique des ultrasons permettant l'exsudation rapide dans le solvant jusqu'à atteindre un équilibre où l'étape soit gouverné par la diffusion.

Notons ici que l'effet mécanique est induit par un effet de cavitation et ceci indépendamment de l'élévation de la température. Par ailleurs, le phénomène appelé « hydration » qui a été soulevé par Povey et Mason (**M.J.W. Povey et T.J. Mason., 1998**) et Toma et al. (**M. Toma et al 2001**) contribue aussi à l'intensification du transfert de masse par suite à l'explosion des bulles de cavitation à l'interface des parois cellulaires. Ceci se traduit par une meilleure pénétration du solvant dans les cellules. Ces propositions ont été renforcées par les observations microscopiques des pétales d'amarante humectées et parfois fragmentés dans la procédure utilisant les ultrasons (**M.Toma et al., 2001**).

III.3.3.1. Energie d'activation

A partir des résultats de l'étude de la cinétique, nous avons pu déterminer l'énergie d'activation relevant de l'artémisinine pour chaque méthode. Cette valeur permettra d'apprécier la quantité d'énergie nécessaire pour le recouvrement de notre principe actif dans chaque méthode. En utilisant l'équation d'Arrhenius (Equation II), l'énergie d'activation E_a pour l'artémisinine a été déduite graphiquement en portant $\ln(k^0)$ en fonction $1/T$, où T représente la température absolue en Kelvin (K) et R la constante des gaz parfaits. Les valeurs déduites sont données au tableau 9.

$$d(\ln k^0)/d(1/T) = -E_a/R \quad \text{Equation II}$$

Par ailleurs, le tracé des courbes de $Y(t)$ en fonction de t correspond à un polynôme de troisième ordre, à partir duquel les vitesses initiales d'extraction $(dY/dt)_{t \rightarrow 0}$ peuvent être dérivées. Par conséquent, les constantes de vitesses à l'étape initiale de chaque extraction, k^0 (calculée d'après les résultats de l'effet de la température après 10 min d'essai), sont obtenues par l'application de l'équation de l'état quasi-stationnaire issue de la loi de vitesse d'une réaction d'ordre un :

$$K^0 = (1/Y_\infty) * (dY/dt)_{t \rightarrow 0} \quad \text{Equation III}$$

Le tableau 9 qui regroupe les valeurs des énergies d'activations pour les deux systèmes indique que la plus faible énergie d'activation est obtenue pour les essais sous ultrasons avec 7,38 kJ/g, en affichant avec k^0 plus élevée. Ce résultat peut expliquer l'accélération de l'extraction dans les expériences réalisées sous ultrasons à basse température par rapport à ceux conduites en conventionnelle.

Tableau 9 : Résultats du calcul de l'énergie d'activation (E_a) des deux systèmes

Méthode	Ultrasons		Conventionnelle	
	k^0 (10^{-4} min^{-1})	E_a (kJ.mol $^{-1}$)	k^0 (10^{-4} min^{-1})	E_a (kJ.mol $^{-1}$)
298	16,09	7,38	0,887	10,30
313	16,25		1,474	
323	18,16		1,885	

Par conséquent, l'application des ultrasons se propose comme une alternative profitable pour l'extraction des produits thermosensibles et des produits solubles dans l'eau à partir de plantes, comme la caféine extraite du thé noir (M.Spiro et al., 1992), de la vitamine C à partir du thé de cynorhodon de l'églantier (M. Spiro., 1993) et du 6-gingérol à partir des rhizomes de gingembre (M. Spiro et Kandiah M., 1998). Par ailleurs, ce résultat est d'une grande importance économique du fait que les procédés utilisant les ultrasons sont moins gourmands en énergies par rapport à ceux utilisant les techniques conventionnelles de macération à chaud.

III.3.4. Purification de l'artémisinine

III. 3.4.1. Traitement par charbon actif et célite

Pour éliminer les impuretés qui existent dans l'extrait brut, et pour augmenter la pureté des cristaux, les chercheurs ont proposé plusieurs traitements de cet extrait qui s'avère très chargé. Par conséquent, le charbon actif connu pour être efficace dans l'adsorption de la chlorophylle et la célite pour sa rétention d'impuretés nous a amené à choisir la combinaison de ces deux adsorbants.

Néanmoins, le traitement par le charbon actif et la célite, présente l'inconvénient d'adsorber une quantité d'artémisinine existante dans l'extrait brute qui varie de 30% à 60% dans le cas de traitement par charbon actif, et de 45% à 72% dans le cas de traitement par charbon actif et la célite (**figure 22**). Nous remarquons que les pertes de traitement sont plus importantes à de basses températures surtout pour le cas où on combine le charbon actif et la célite.

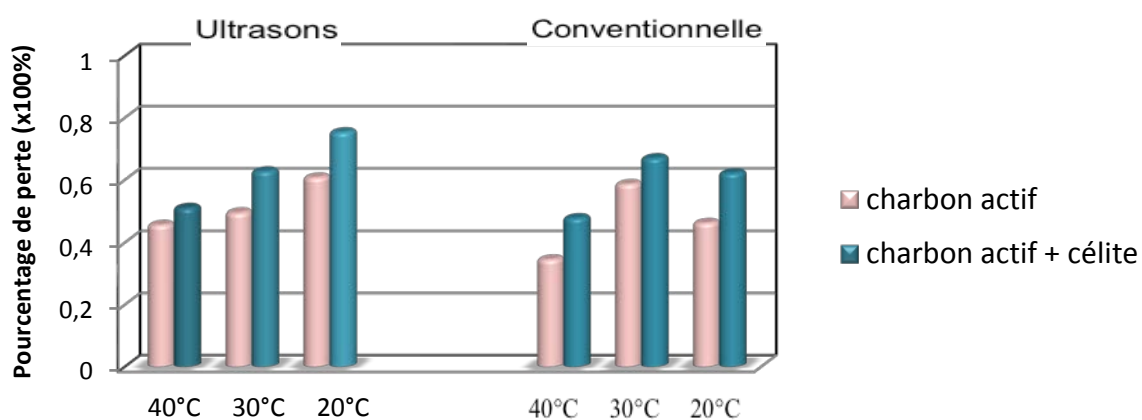


Figure 20 : Les pertes d'artémisinine dans les étapes de purification par le charbon actif et la célite

III.3.5. Traitement par les procédés membranaires

III.3.5.1. Membrane commerciale de polypropylène

Afin de palier aux problèmes de pertes en artémisinine lors de l'utilisation d'adsorbants, le traitement par les membranes a pour objectif d'augmenter le rendement et la pureté des cristaux. Dans ce cas, des solutions extraites à des températures différentes et par les deux méthodes d'extraction ont été traitées par une membrane commerciale en polypropylène. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 23 et 24 respectivement pour les extraits obtenues par voie conventionnelle et sous ultrasons.

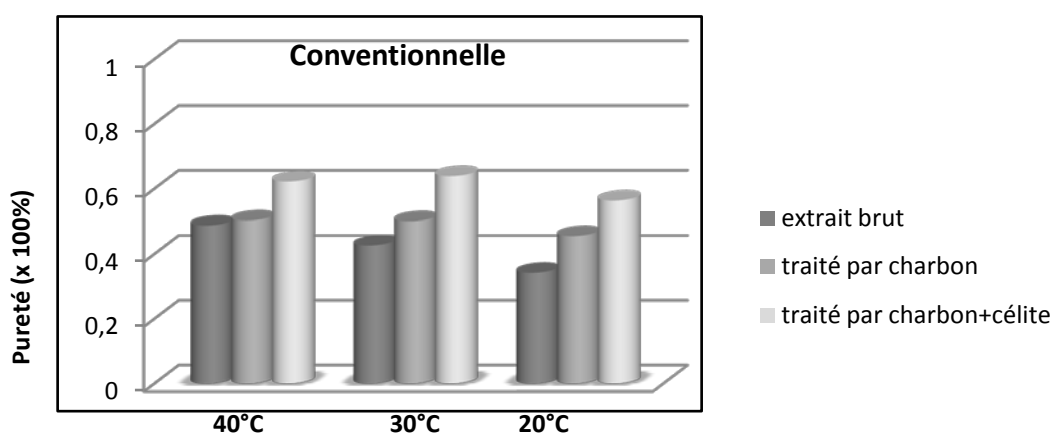


Figure 21 : Influence de la membrane commerciale en polypropylène sur le rendement de purification des différents extraits par la technique conventionnelle

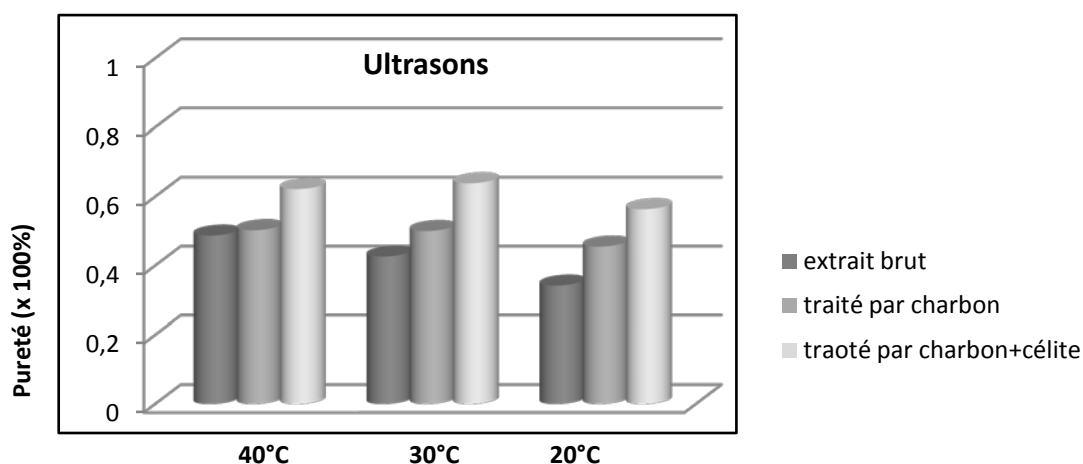


Figure 22 : Influence de la membrane commerciale en polypropylène sur le rendement de purification des différents extraits par la technique d'ultrason

Nous remarquons que la pureté augmente avec l'augmentation de la température, ainsi que cette pureté est plus élevée dans le cas de l'extrait traité par charbon actif et célite que celui traité par charbon actif seul. Cependant, l'extrait brut a donné le pourcentage le plus faible des puretés des cristaux. Ces résultats sont valables pour les deux techniques d'extraction conventionnelle et sous ultrasons.

A partir des résultats du tableau 10, représentant le pourcentage de pureté des cristaux d'artémisinine obtenues par cristallisation après évaporation, on remarque que la pureté la plus élevée dans le cas de l'extrait traité par charbon actif et célite réalisé à 40°C est de l'ordre de 63,86%. Ce pourcentage diminue avec la diminution de la température. Ce résultat est du même ordre obtenu à 40°C par Boumechhour (A. Boumechhour., 2010) évalué à 65,57%.

Ces résultats supposent que la membrane n'a probablement aucune influence sur ces extraits traités par charbon et célite. Cependant, le pourcentage de pureté des cristaux dans le cas d'extrait brute est relativement élevé 51,73%. Ce dernier résultat rapporte le rôle efficace de la membrane dans la rétention de petites quantités de chlorophylle et autres impuretés par la membrane ce qui a permis une meilleure cristallisation et une bonne pureté. Cependant, cette membrane n'a diminué que légèrement la concentration de la chlorophylle dans l'extrait brut selon nos constatations visuelles (couleur verdâtre).

Tableau 10 : Résultats des analyses de puretés des cristaux d'artémisinine

Température	Extrait Brute (%)	Traitement par charbon actif (%)	Traitement par charbon actif+célite (%)
20°C	47,01	50,15	55,04
30°C	50,96	53,73	59,01
40°C	51,73	53,75	63,86

III.3.5.2. Traitement par la membrane de triacétate de cellulose

Pour le même objectif d'atteindre des puretés de cristaux élevées, nous avons fait recours à une membrane synthétique à base de triacétate de cellulose (TAC). Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 25 et 26.

A partir de ces deux figures, les mêmes observations rapportent que la pureté augmente avec l'augmentation de la température, ainsi que la pureté la plus élevée est réalisée dans le cas des extraits traités par charbon actif et célite en par rapport aux extraits traités avec seulement du charbon actif. D'autre part, l'extrait brut donne le pourcentage le plus faible de pureté des cristaux. Par comparaison avec la membrane commerciale (polypropylène), nous notons une nette amélioration de la pureté dans le cas de la membrane TAC et ceci pour tout les extraits et à différentes températures.

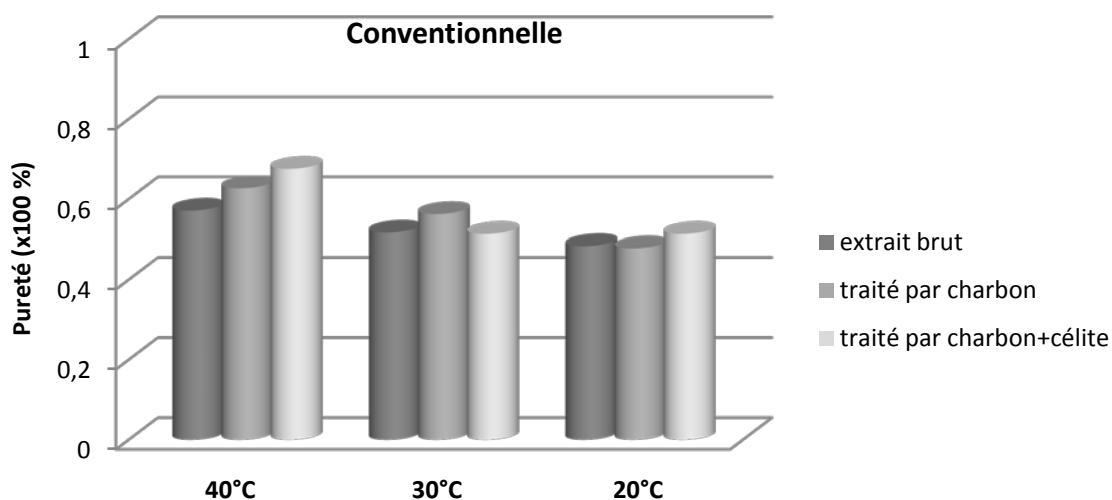


Figure 23 : Influence de la membrane élaborée en triacétate de cellulose sur le rendement de purification des différents extraits par la technique conventionnelle

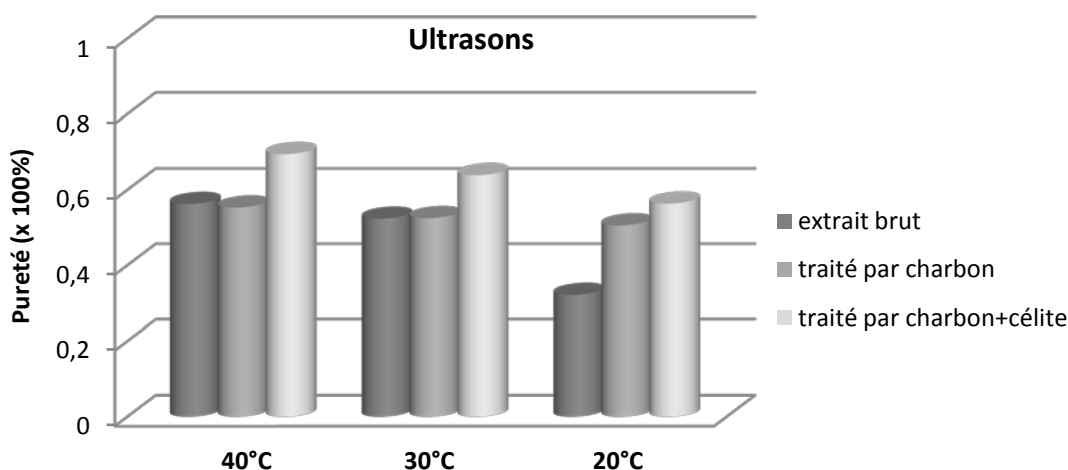


Figure 24 : Influence de la membrane élaborée en triacétate de cellulose sur le rendement de purification des différents extraits par la technique d'ultrasons

Le tableau 11, résumant les résultats de pureté des cristaux d'artémisinine issus du traitement par la membrane TAC, indique que les pourcentages de cristallisation pour les extractions réalisées à 40°C s'élèvent à 62,70% pour l'extrait traité par du charbon actif et de 69,48% dans le cas de combinaison de charbon actif + céélite. Ces résultats sont plus importants que ceux obtenus par la membrane commerciale ce qui signale une meilleure rétention d'impuretés par la membrane de TAC induisant une meilleure cristallisation du principe actif.

Tableau 11 : Résultats de pourcentage de pureté des cristaux d'artémisinine issus de traitement par la membrane TAC

Température	Extrait Brute (%)	Traitement par charbon actif (%)	Traitement par charbon actif+céélite (%)
20°C	48,36	50,56	56,35
30°C	52,35	52,51	63,89
40°C	57,16	62,70	69,48

En effet, même pour les extraits bruts, nous avons pu obtenir une bonne cristallisation de l'ordre de 57,16% à 40°C. Ceci est justifié par la rétention d'une grande partie de la chlorophylle selon nos constatations visuelles, et probablement aussi du à l'élimination d'autres impuretés qui influençait sa cristallisation.

Cependant, malgré la rétention d'une grande partie de la chlorophylle qui existait dans l'extrait brut, la membrane s'avère transparente à l'artémisinine ce qui conforte la réussite de notre étape de synthèse basée sur la taille moléculaire de l'artémisinine où l'objectif était de synthétiser une membrane permettant la rétention des impuretés et laissant passer l'artémisinine pour pouvoir le cristalliser aisément.

Dans ce contexte, **E. Deslandes. et al.(2007)** ont réussi à purifier deux molécules à intérêt thérapeutique extraites à partir d'une algue rouge *Mastocarpus stellatus* : la floridoside et l'acide iséthionique et ceci par l'utilisation de deux membranes dont la taille des pores est différente.

III.4. Modélisation des données cinétiques

III.4.1. Calcul du coefficient de diffusion

Afin de valoriser les données expérimentales obtenues lors de l'étude de la cinétique d'extraction et pour une meilleure compréhension des phénomènes d'extraction mises en jeu par ces technologies innovantes, nous nous sommes intéressés à la modélisation des extractions par l'application d'un modèle cinétique dit à un seul site.

Le processus d'extraction par la technique conventionnelle et la technique d'US est analysé par un modèle mathématique (Crank, 1975), dérivé à partir de la seconde loi de diffusion de Fick. Ce modèle est basé sur les hypothèses suivantes :

- Les particules solides sont considérées comme des plaques planes, avec une longueur de deux fois L (2L).
- Le solide poreux est considéré comme un milieu pseudo-homogène.
- La distribution du principe actif dans le solide est initialement uniforme
- La teneur en principe actif à la surface est homogène
- L'équilibre thermodynamique est établi à l'interface.

L'application du modèle de l'état stationnaire selon Spiro et Jago (1982) conduit à l'équation du premier ordre (Equation III) pouvant être utilisé pour le calcul de la constante de vitesse:

$$\ln\left(\frac{c_{\infty}}{c_{\infty} - c}\right) = k_{\text{obs}} \cdot t$$

Equation IV

C : la concentration à l'instant t, C_{∞} : la concentration à l'équilibre, K_{obs} : la constante de vitesse globale observé

Par ailleurs, l'application de la seconde loi de Fick (Crank, 1975) nous conduis à l'équation suivante (Equation IV) :

$$D_j \left[\frac{\partial^2 C_j}{\partial x^2} \right] = \frac{\partial C_j}{\partial t}$$

Equation V

Si C désigne la concentration à l'intérieur d'une plaque plane, les conditions initiales et aux limites de l'expérience sont :

- $t = 0 \quad -L \ll x \ll L \quad C = C_0$
- $\forall t > 0 \quad x = \pm L \quad C = C_i$ (teneur constante à l'interface)
- $\forall t > 0 \quad \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} = 0$ (coefficient de diffusion constant)

De ce fait, la solution générale de l'équation IV est donnée par (Crank, 1975) comme suit (Equation V):

$$\frac{C - C_0}{C_i - C_0} = 1 - \left[\frac{4}{\pi} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{(-1)^n}{2n+1} \cos \frac{(2n+1)\pi x}{2L} \exp \left(-\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4L^2} Dt \right) \right] \quad \text{Equation VI}$$

C : dénote la concentration à t, à une distance x du centre de la plaque ($x = \pm L$), où l'axe des x est orienté selon la direction du transfert

Par l'intégration de la concentration sur l'épaisseur, la masse du principe actif (M) transférée à un temps (t) relative à la quantité totale transférée après un temps infinis M_{∞} peut être exprimée come suit (Equation VI):

$$\frac{M}{M_{\infty}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left(-\frac{(2n+1)^2 \pi^2}{4L^2} Dt \right) \quad \text{Equation VII}$$

Dans notre cas, nous supposons M_{∞} comme étant la teneur maximale que peut contenir la plante en prince actif. Dans cette situation, nous pouvons considérer la masse transférée à un temps t égale à la concentration dans la solution (C) puisque l'équilibre thermodynamique à l'interface est établi. La littérature rapporte la résolution de l'équation VI en donnant la formule suivante :

$$\ln \left(\frac{C_{\infty}}{C_{\infty} - C} \right) = 0.210 + \frac{9.87Dt}{4L^2} \quad \text{Equation VIII}$$

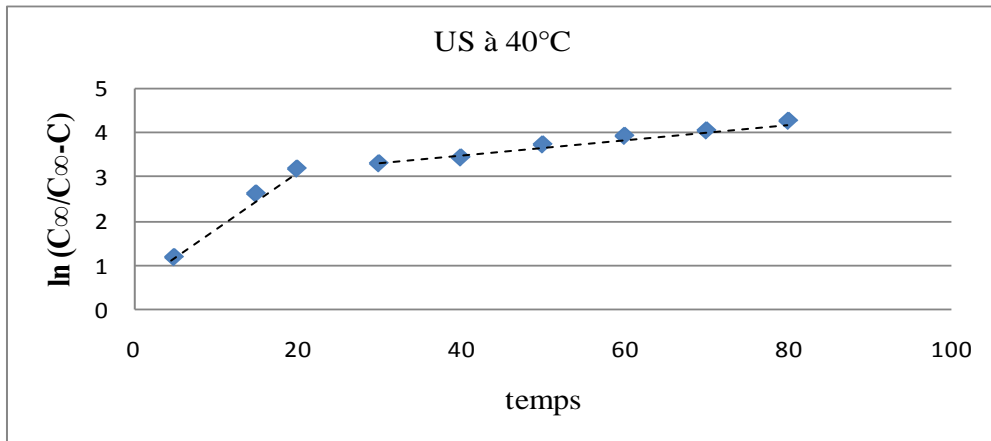
Où D représente le coefficient de diffusion du principe actif et L la mi-longueur de la plaque (plante). En portant la fonction $\mathbf{Ln} (C_{\infty}/(C_{\infty} - C))$ en fonction du temps (t), on pourra facilement déduire le coefficient de diffusion D, généralement exprimée en cm^2/s .

La figure 16 représente le tracé du $\ln\left(\frac{C_{\infty}-C}{C_{\infty}-C_0}\right)$ en fonction du temps pour les deux températures 30 et 40°C et pour les deux techniques d'extraction ultrasons (US) et macération à chaud (CONV).

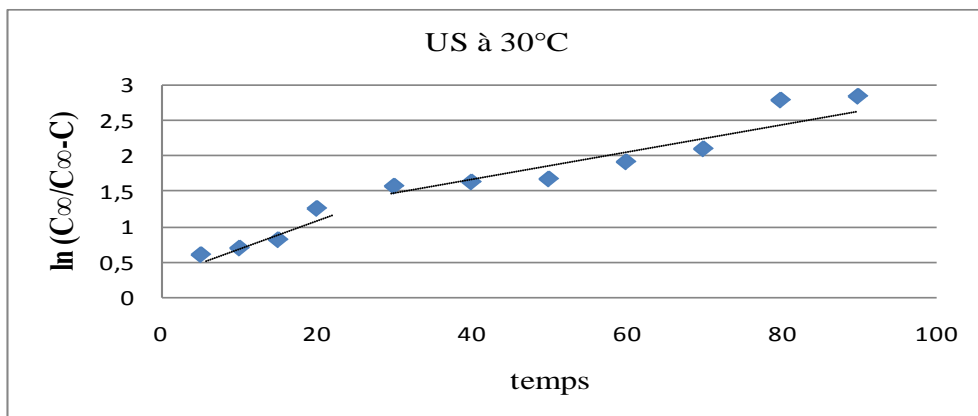
Nous avons pu observer que la courbe $\ln\left(\frac{C_{\infty}-C}{C_{\infty}-C_0}\right)$ en fonction du temps est d'une forme exponentielle. Néanmoins, elle montre la présence de deux étapes distinctes. La première étape d'extraction rapide, pouvant être présentée par une ligne droite avec une pente relativement grande et une deuxième étape d'extraction lente pouvant être représentée par une ligne droite avec une pente plus faible. Cette observation est valable pour les deux techniques d'extraction.

Donc, on peut supposer que le transfert des composés actifs à partir de la biomasse peut être décrit comme suit :

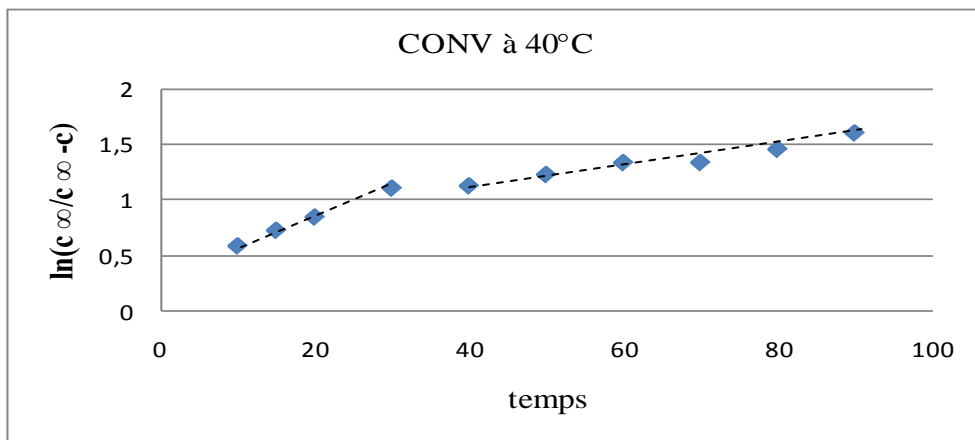
- Un transfert solide-liquide incluant l'extraction de l'artémisinine situé dans les glandes exogènes à la surface des particules par un simple lavage. Ce dernier se déroule rapidement.
- Diffusion moléculaire de l'artémisinine à travers les particules poreux de la biomasse ; l'extraction de cette fraction est lente et dépend essentiellement du temps.



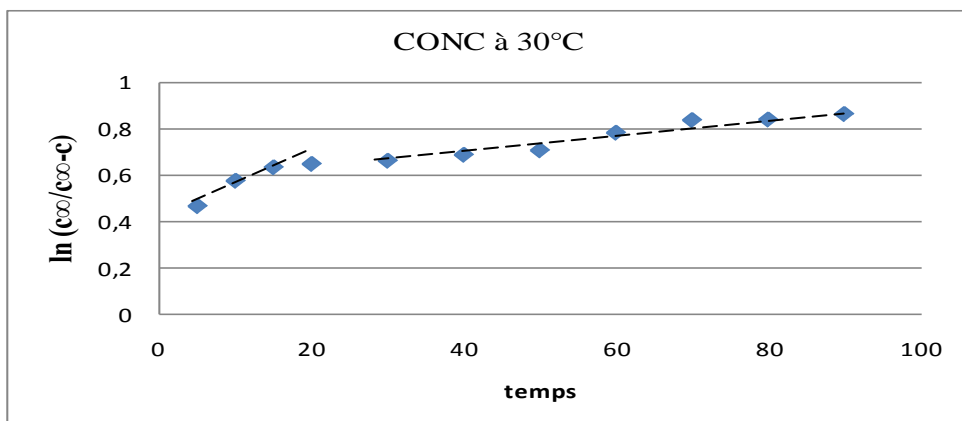
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 25 : Tracé du $\ln(C_{\infty}/C_{\infty}-C)$ en fonction du temps

A partir du tableau 12, on remarque que le coefficient de diffusion est plus important pour la technique d'ultrasons par rapport à la technique conventionnelle. Ce coefficient s'avère étroitement lié à la température et ceci pour les deux techniques.

Tableau 12 : Coefficient de diffusion de l'artémisinine pour les techniques utilisées

Technique	0 – 20 min	20 - 90 min
	D (cm ² /min) x 10 ⁻⁵	D (cm ² /min) x 10 ⁻⁵
Ultrasons 40°C	21,66	3,12
Ultrasons 30°C	7,01	3,41
Conventionnelle 40°C	4,22	2,58
Conventionnelle 30°C	1,96	0,55

En effet, dans les première 20 min, la valeur du coefficient de diffusion pour la technique d'US à 40°C s'élève à 21,6 x10⁻⁵ cm²/min, qui est cinq fois plus grande que celle de la technique conventionnelle. Toutefois, au-delà des premières 20 min, le coefficient de diffusion pour la technique US chute à 3,12x10⁻⁵ cm²/min, cependant il reste légèrement plus important que celui relevant de la technique conventionnelle (2,58x10⁻⁵ cm²/min).

Même constat à 30°C, le coefficient de diffusion pour la technique d'US dans les premières 20 min est de 7,01 x10⁻⁵cm²/min, soit 5 fois plus grand que celui en conventionnelle.

Ces résultats signalent la présence de deux étapes distinctes lors de l'extraction de l'artémisinine. La première est rapide et est gouvernée par la cinétique de désorption et la seconde lente et est contrôlée par la diffusion puisque le gradient de concentration entre le solide et le solvant est négligeable.

De plus, ceci confirme le rôle des ultrasons dans l'accélération et l'augmentation du rendement d'extraction, contrairement aux techniques conventionnelles qui s'avèrent très lentes.

Conclusion

Les données résultantes de cette étude rendent compte de l'influence de la méthode d'extraction et de la température sur le rendement et la qualité des cristaux obtenus lors de la cristallisation à basse température de l'artémisinine, un agent anti-malarial très efficace. Le procédé d'extraction assistée par les ultrasons à 40°C produit un extrait plus riche en artémisinine avec un rendement d'extraction plus élevé de l'ordre de 5,98 mg/g, comparativement à celui obtenu par la méthode conventionnelle (macération à chaud à 40°C) avec 4,95 mg/g.

D'autre part, l'étude cinétique nous a permis de déduire l'énergie d'activation et du coefficient de diffusion de notre principe actif pour les deux techniques utilisées. Les données montrent que le coefficient de diffusion augmente avec la température et qu'il est plus important dans le cas des ultrasons. De plus, ces résultats nous ont permis de constater la présence de deux étapes distinctes lors de l'extraction de l'artémisinine. Une première étape rapide qui est gouvernée par la cinétique de désorption et une seconde étape lente qui est contrôlée par la diffusion jusqu'à atteindre l'équilibre.

Par ailleurs, le procédé de purification membranaire proposé à base de triacétate de cellulose (TAC) qui se présente comme un procédé vert ne nécessitant pas de grands investissements dans les installations existantes. De plus, cette méthode se caractérise par une bonne préservation de l'environnement, par l'absence de l'ajout d'aucun produit chimique, ce qui a un grand intérêt économique.

Les résultats découlant de cette étude restent très prometteurs du fait de l'amélioration de la pureté des cristaux jusqu'à 69,48%. Nous comptons continuer sur ce volet en optimisant la taille des pores de ces membranes afin de ne laisser passer que de l'artémisinine. D'autres combinaisons peuvent être indiquées telles que la technique de re-cristallisation pour obtenir des cristaux plus purs sans aucune perte de notre molécule, contrairement à la technique de purification par le charbon actif et la célite où nous avons relevé des taux de pertes en artémisinine importants et ceci indépendamment de la méthode d'extraction utilisée. En plus, une autre proposition qui consiste à utiliser une deuxième membrane dont la taille des pores est inférieure par rapport à la première membrane.

Références bibliographiques

- A. Arzate, 2008; procédés de séparation membranaire et leur application dans l'industrie alimentaire ; revue de littérature ACER.
- A. Boumechhour. 2010 ; Etablissement d'un procédé d'extraction sous ultrason et de purification de l'artémisinine à partir de l'*Artemisia annua* L. USTHB
- A. Lapkin, P. Plucinski. 2006; Comparative Assessment of Natural Product Extraction of Artemisinin From *Artemisia annua* L. Biomass Using Ethanol, Heptane and HFC-134a. Department of Chemical Engineering University of Bath.
- A. Lapkin, A. Walker, N. Sullivan, B. Khambay, B. Mlambo, S. Chemat. 2009; Development of HPLC analytical protocols for quantification of artemisinin in biomass and extracts. 49. 908–915.
- A. MAUREL. 1993 ; Techniques séparatives à membranes : osmose inverse, nanofiltration, ultrafiltration, microfiltration tangentielle – Considérations théoriques, in Techniques de l'Ingénieur. 1-24.
- A. McCulloch, A Lindley. 2003; From mine to refrigeration: a life cycle inventory analysis of the production of HFC-134a. International Journal of Refrigeration.
- A. Singh, R.A. Vishwakarma, A. Husain. 1988; Evaluation of *Artemisia annua* strains for higher artemisinin production. *Planta Med.* 54, 475–477.
- B. Blanc, B. Weniger et J.-P. Nicolas. 2008 ; Réflexions autour de la culture d'*Artemisia annua* et de la production d'artémisinine. *Ethnopharmacologia*, dossier spécial : les parasitoses tropicales, n°41, p. 82-87.
- B. PRADINES, H. VIAL, P. OLLIARO. 2003 ; Prophylaxie et traitement du paludisme : problèmes, récents développements et perspectives *Med Trop*; 63 : 79-98,
- D. L. Klayman, A. J. Lin, N. Acton, J. P. Scovill, J. M. Hoch, W. K. Milhous. 1984; Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *Journal of natural products.* 47(4). 715-717.
- E. Koller. 2001 ; aide mémoire de génie chimique. Editeur : Dunod. 3e édition.
- E. Deslandes, C. Bodeau**, 2007 ; Composition cosmétique comprenant un extrait d'algue rouge comprenant une association de floridoside et d'acide iséthionique. Office européen des brevets. 03.
- F.S. El-Feraly, H.N. El-Sohly. Method for the isolation of artemisinin from *Artemisia annua*. US Patent 4952603

- J. Malleval, P.E. Odendaal, M.R. Wiesner, 1996; The emergence of membrane in water and waste water treatment, In: Water Treatment Membrane Process, Chapitre 1, Mc Graw-Hill. 10p.
- J.M. BERLAND et C. JUERY, 2002 ; Les procédés membranaires pour le traitement de l'eau.
- J. Bruneton . 2009 ; Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales ; 4e édition ; Edition médical internationales.
- J. y. Hao, W. Han, S.d. Huang, B.y. Xue, X. Deng. 2002; Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. Separation and Purification Technology. 28. 191–196.
- K. Mendis, B. Sina, P. Marchesini, R. Carter. 2001; The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. dans *Am J Trop Med*, vol. 64, pp.97-106.
- K. S. Suslick, 1988; Ultrasound: chemical, physical and biological effects, Wiley-VCH, London.
- M. Romdhane, C. Gourdon, 2002; Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound, *Chemical Engineering Journal*. 87. 11-19.
- M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, T. J. Mason, 2001; Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*. 8, 137-142.
- M. Spiro, 1993; *Food Chem*. 48: 39.
- M. Spiro, D. Jaganyiand M.C. Broom, 1992; *Food Chemistry*. 45. 333.
- M. Spiro, Kandiah M. *Intl J*. 1989; *Food Sci. Technol*; 24: 589.
- M. Wink. 2010; *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. 2e édition. publication: A JOHN WILEY et SONS, INC; WILEY INTERSCIENCE..
- M. Vinatoru, M. Toma, L. Paniwnyk, T. J. Mason, 2001; Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*. 8. 137-142.
- M. J. W. POVEY and T. J. Mason, 1998; *Ultrasound in Food Processing*, Blackie Academic & Professional. 119-125.
- N. Q. Liu, W. Schuehly, M. v. Freyhold , F. v. d. Kooy, 2011; A novel purification method of artemisinin from *Artemisia annua*. Science direct, industrial corps and products.
- OMS. 2010; World malaria report.
- Q. Haiyan, B. K. Christensen, C. X. Frette, F. Tian, J. Rantanen, et L. P. Christensen. 2010 ; A Novel Hybrid Chromatography-Crystallization Process for the Isolation and Purification of a

Natural Pharmaceutical Ingredient from a Medicinal Herb. the royal of chemistry. 14. 585–591.

R.A.F. Rodrigues, M.A. Foglio, S. Boaventura, A.D. Santos, V.L.G. Rehder. 2006; Optimization of the extraction and isolation of the antimalarial drug artemisinin from *Artemisia annua* L. *Quim.Nova* 29. 368–372.

R. AUDINOS. 1999; Technique de l'ingénieur; membranes semi-perméables – Généralités. K360. *Traité Constantes physico-chimiques*.

R. M. S. Celeghini, A. P. Silva, I. M. O. Sousa. M. A. Foglio. 2006; Evaluation of *Artemisia annua* L. clean-up methods for artemisinin quantification by HPLC. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*. 8.119-122.

S. CHEMT. 2005 ; Thèse de doctorat. Contribution à l'étude de l'extraction de la carvone et du limonène à partir des graines de Carvi selon des procédés conventionnels, ultrasons et chauffage micro-ondes : Application à l'extraction de polluants organiques de type PCBs et à l'oxydation des acides humiques. USTHB.

S Kumar, S.K. Gupta, D. Singh, M.M. Gupta, D.C Jain, A.P Kahol, S.P.S. Khanuja, G. Ram. 2004; Process for isolating artemisinin from *Artemisia annua*. US Patent 6685972.

S. CHEMAT, A.. LAGHA, H. AÏT-AMAR, P.V. BARTELS, F. CHEMAT. 2004; Comparison of classical and ultrasound-extraction of carvone and limonene from caraway seeds, *Flavour and Fragrance Journal*. 19. 188-195.

X.T. LIANG, W.S. FANG. 2006 ; Medicinal chemistry of bioactive natural products. Publication: A JOHN WILEY et SONS, INC; WILEY INTERSCIENCE.

Z. Hromádková, A. Ebringerová, P. Valachovic, 1999; Comparison of classical and ultrasound assisted extraction of polysaccharides from *Salvia Officinalis* L., *Ultrasonics Sonochemistry*. 5. 163-168.