

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Génie chimique

Option : Génie de la formulation

**EXTRACTION DES SAPONINES A PARTIR DE L'HEDERA
HELIX / FORMULATION ET CARACTERISATION D'UN
GEL ANTIBACTERIEN**

Présenté par :

Benbouaicha Khadidja
Djeghdjough Khadidja

Encadré par :

Docteur. Rebiha Mounia

Année universitaire 2016/2017



Dédicace

Merci Allah, pour m'avoir donné la force pour continuer ...

Je dédie ce travail à :

Ma très chère maman « Fatima », la lanterne qui éclaire mon chemin, tu présente pour moi le symbole de la bonté et le courage.

Mon père « Mohamed » , l'homme de ma vie, mon soutien moral ,et celui qui s'est toujours sacrifier pour me voir heureuse.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance, que dieu vous garde pour moi.

À ma grande sœur et ma deuxième mère « chahinez ».

À mes sœurs Zakia et khawla.

À mes frères Amine , Merzak, Abdelkader.

À mon binôme, ma meilleure amie « khadidja » merci pour votre patience dans les situations critiques que j'ai vécues ,

À mes amies Amel, Zahida, Malika, Selma, Fella, Soumia et tout les membres du groupe « espoir de Blida »

À tous ceux qui m'aiment et tous ceux qui ont cru en moi .

Khadidja. Djik





Dédicace

Je dédie ce travail de fin d'études :

A mes très chers **parents** :

Pour vos mains qui ont tant travaillées,

Pour votre cœur qui m'a tant donné

Pour votre sourire qui m'a tant réchauffé,

Pour vous qui m'avez tant aimé.

Pour votre encouragement tout au long de mes études,

A mes chères sœurs :

« **Fouzia, Nabila, Zohra, chahinez et Sarah** » et leurs enfants,

Et mon frère « **Billel** » et son épouse « **Adila** »

Que la vie leurs donne tout ce qu'elle a de meilleur.

A mes chères amies :

Pour leurs encouragements et leurs soutiens

« **Zahida, Selma, Amina et khadidja** »

A ma chère cousine « **Hayet** »

A toute ma famille.

A tout les membres du groupe

de bénévoles « **Espoir de Blida** ».

Khadidja Benbouaicha





Remerciements



Nous remercions tout d'abord « **ALLAH** » le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté, la santé et la patience de mener à terme ce présent travail.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et gratitude :

À Docteur. **REBIHA Mounia**, maître de conférences B à l'université Saad Dahlab de Blida, qui nous a confié ce travail. Sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de notre master nous ont permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions. Merci du fond du cœur pour son écoute et conseils précieux.

À nos honorables professeurs membres de jury, nos sincère gratitude pour bien vouloir siéger dans notre jury et évaluer notre travail.

À Mme. **SABRI Nadjia**, chargée de recherches au CRD Blida, pour sa contribution à l'élaboration de ce mémoire par ces conseils objectifs et ces efforts dans le travail expérimental durant lequel nous avons apprécié l'ampleur de ces connaissances alliées de grandes qualités humaines. Tous nos respects.

À Pr. **A. AOUABED**, directeur du laboratoire d'Analyses Fonctionnelles au niveau du département Génie des Procédés, à l'université Saad Dahlab de Blida, nous tenons à exprimer nos vifs remerciements pour avoir bien voulu nous accueillir au sein de son honorable laboratoire afin de réaliser notre travail expérimental.

À l'ensemble des enseignants du département de Génie des Procédés en particulier Mme **L. BELHADJI** et Pr. **BOUTOUMI**, une immense gratitude.

À tous les membres du laboratoire d'hygiène de Blida pour leurs aides et disponibilités.

À nos chers camarades du département de génie des procédés ; **Meriem, Wafa, Samira, Selma, Rabia, Lamiss** avec qui nous avons passé des moments agréables et Nos plus vifs remerciements s'adressent également à **Nassiba Moghni** pour l'aide qu'elle nous a donnée.

Notre sympathie et nos reconnaissances sont aussi exprimées à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin afin de faciliter la réalisation de ce mémoire.



ملخص

يهدف هذا العمل إلى تثمين أوراق اللبلاب المشترك أو الهديرا الحلزونية كأحد الموارد الزراعية الجزائرية التي تحتوي على مواد حيوية كبيرة يتم استخراج الصابونين من أوراق الهديرا الحلزونية بطريقتين: النقع بالتبريد و الاستخراج بواسطة فرن المايكروويف , المرودود من الصابونين المتحصل عليه على التوالي هو 1 و 1,22 بالمئة وقد تم تحديدها من قبل الطرق الفيزيوكيميائية: اللوني ذو الطبقة الرقيقة، الأشعة تحت الحمراء، التوتر السطحي ثم تم صياغة هلام مضاد للجراثيم على أساس زنتان وثلاثي الصابونين تيربين، ان التوصيف الريولوجي لهذا الهلام بتجربتيه الاثنتين، وهي اللزوجة والتدفق، قد أمكننا من معرفة كمية عامل التبلور الممكن استعماله ، من خلال مقارنة سلوكها مع هلام تجاري كمرجع، ودراسة استقرار هذا الهلام. الهلام النهائي المتحصل عليه يمكن الحكم عليه انه ذو نوعية فيزيوكيميائية ، بيولوجية و ميكروبيولوجية جيدة .

كلمات مفتاحية : الهديرا الحلزونية ، النقع ، الاستخراج بواسطة فرن المايكروويف, ثلاثي الصابونين تيربين ، صياغة، ريولوجيا .

RESUME

Ce travail vise la valorisation des feuilles de l'Hedera hélix .L'extraction des saponines à partir des feuilles d'Hederahélix a été réalisée par deux méthodes : la macération à froid et l'extraction assisté par micro onde, Le rendement en saponines obtenu est de 1% et 1.22% Respectivement. Elles ont été identifiées par des méthodes physico-chimiques : CCM, IR, tension superficielle. On a procédé ensuite à la formulation d'un gel antibactérien à base de xanthane et des saponines triterpéniques. La caractérisation rhéologique de ce gel par deux tests, à savoir la viscoélasticité et l'écoulement a permis de connaître la quantité de l'agent gélifiant à utiliser, et ce en comparant son comportement à un gel commercial pris comme référence, et d'étudier la stabilité de ce gel. Le gel final est jugé de bonne qualité physicochimique, rhéologique et microbiologique.

Mots clés : Hedera hélix, macération, MEA, saponines triterpéniques, formulation, rhéologie.

ABSTRACT

This work aims at the valorisation of the leaves of the *Hedera helix* as one of the Algerian agricultural resources containing substances of great potential bioactivity. The extraction of the saponins from the leaves of *Hedera helix* comprised two methods: cold maceration and microwave-assisted extraction. The incomes of saponins obtained are 1% and 1.22% respectively. They have been identified by physicochemical methods: TLC, IR, surface tension. We proceeded to the formulation of a xanthan-based antibacterial gel and triterpene saponins. The rheological characterization by two tests, recognizing the viscoelasticity and flow, made it possible to know the quantity of the gelling agent to be used, by comparing its behavior with a commercial gel taken as a reference, and to study the stability of this gel. The final gel is judged to be of good physicochemical, rheological and microbiological quality.

Key words : *Hedera helix*, maceration, MEA, triterpenesaponins., formulation, rheology.

LISTE DES ABREVIATION

- ATCC: American Type Culture Collection.
- CCM : Chromatographie par Couche Mince.
- CMC : Concentration micellaire critique.
- EA : Evaluation activité antibactérienne.
- GX: Gomme xanthane.
- IR : Chromatographie par Infra Rouge.
- MEA : Extraction assisté par micro onde.
- Rf : Rapport frontal .
- rpm : Rotation par minute.
- D : Densité.
- G' : Le module de conservation, il représente le caractère élastique de la crème, l'énergie emmagasinée dans le matériau.
- G'' : Le module de perte, qui représente le caractère visqueux de la crème et correspond à l'énergie dissipée.
- K : Constante de Cross et de carreau.
- P : Exposant de Cross et de carreau.
- pH : Potentiel hydrométrique.
- R^2 : Coefficient de corrélation.
- T : Température.
- TS : Tension superficielle.
- γ : La tension de surface.
- $\dot{\gamma}$: Vitesse de cisaillement [S-1].
- δ : Conductivité.
- η_0 : Viscosité à $\dot{\gamma} \rightarrow 0$ [Pa.s] (à vitesse de cisaillement nul).
- η_∞ : Viscosité à $\dot{\gamma} \rightarrow \infty$ [Pa.s] (à l'état infini).
- Π : Viscosité [Pa.s].
- μcm : Micro centimètre.
- τ : Contrainte de cisaillement [Pa].

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.1. produits chimique.	40
Tableau 5.1. les principaux résultats de l'extraction.	58
Tableau 5.2 : fréquence et vibrations du spectre IR de l'extrait de saponine	61
Tableau 5.3: Tension superficielle des saponines en fonction de ses concentrations.	62
Tableau 5.4: Paramètres rhéologiques G'_0 et le γ_L des tests viscoélastiques.	65
Tableau 5.5: Paramètres rhéologiques des deux modèles du produit de référence et des placébos.	67
Tableau 5.6: quantités des composants du gel final formulé.	68
Tableau 5.7. Paramètres rhéologiques du modèle de Carreau.	70
Tableau 5.8: Résultats de l'activité antibactérienne in vitro.	73

LISTE DES FIGURES

Figure1.1 : Schéma de formation d'un gel réversible	22
Figure 1.1 : Schéma de formation d'un gel réversible	23
Figure1.2 : Schéma d'un gel irréversible	24
Figure 1.3 :Formule développée du motif du xanthane	26
Figure 2.1 : La plante de Hedera Hélix (lierre grim pant).	29
Figure2.2 : composition des saponines.	31
Figure2.3 : Biosynthèse des squelettes de base des triterpènes.	32
Figure 3.1 :Transferts thermiques sous les deux modes de chauffage.	37
Figure 4.1 : Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.	42
Figure 4.2 : Représentation schématique de la séparation par ROTAVAPOR.	43
Figure 4.3 : Organigramme de purification des saponines.	46
Figure 4.4 : Schéma représentatif de laChromatographie sur couche mince.	49
Figure 5.1 : La mousse de saponine.	59
Figure 5.2 : Détection des saponines par la plaque CCM.	59
Figure 5.3 : Spectre IR de l'extrait de Saponine.	60
Figure 5.4 :Courbe de la variation de la tension superficielle en fonction de la concentration des saponines.	62
Figure 5.5 : Variation des modules de conservation G' et de perte G'' du gel de référence en fonction de la déformation à $T = 20^{\circ}\text{C}$ et $f = 1\text{Hz}$.	64
Figure 5.6 : Variation des modules de conservation G' des placébos et du gel de référence en fonction de la déformation à $T=20^{\circ}\text{C}$ et $f = 1\text{Hz}$.	65
Figure 5.7 : Courbes d'écoulement des essais du produit de référence.	66

Figure 5.8 : Courbe d'écoulement du gel formulé et du gel de référence.	69
Figure 5.9 : Test de fréquence du gel final.	70
Figure 5.10 : test de température du gel final.	72
Figure 5.11. Evaluation de G' en fonction de la température de refroidissement pour 4 géométries différentes [65].	72
Figure 5.12 : EA du gel sur <i>Escherichia coli</i> .	73
Figure 5.13. EA du gel sur <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	73
Figure 5.14. EA du gel sur <i>Staphylococcus Epidermidis</i> .	73
Figure 5.15. EA du gel sur <i>bacillus</i> .	73

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	16
CHAPITRE 1 :	
FORMULATION COSMETIQUES	
1.1. DEFINITION DE LA FORMULATION	19
1.2. LES DIFFERENTS DOMAINES DE LA FORMULATION.....	19
1.2.1. Formulation agro-alimentaires.....	19
1.2.2. Formulation pharmaceutiques.....	19
1.2.3. Formulation cosmétiques.....	20
1.3. LE COSMETIQUE.....	20
1.4. LES GELS.....	22
1.4.1. Généralité sur les gels.....	22
1.4.2. Les Types de gel.....	23
1.4.3. Gel de Xanthane.....	24
1.4.3.1. La gomme de Xanthane.....	24
1.4.3.1.1. Généralités.....	24
1.4.3.1.2. Structure chimique du motif.....	24
1.4.3.1.3. Propriétés de la gomme xanthane.....	24
1.4.3.2. Le xanthane en solution.....	25

CHAPITRE 2 :

LES EXTRAITS NATURELS

2.1. DEFINITION D'UN EXTRAIT.....	28
2.2. PROPRIETES DES EXTRAITS NATURELS.....	28
2.3. PRESENTATION DE LA PLANTE <i>Hedera Hélix</i> (LE LIERRE GRIMPANT)	29
2.3.1. Taxonomie de la plante.....	29
2.3.2. Histoire de l'utilisation du lierre grimpant en phytothérapie.....	30
2.3.3. Description botanique du lierre grimpant.....	30
2.4. LES SAPONINES.....	30
2.4.1. Les génines triterpéniques.....	31
2.4.2. Activités pharmacologique des saponines triterpéniques.....	32

CHAPITRE 3:

PROCEDES D'EXTRACTIONS

3. METHODES D'EXTRACTIONS DES PLANTES.....	35
3.1. Méthodes d'extraction conventionnelles.....	35
3.1.1. L'extraction par macération.....	35
3.1.2. Extraction par reflux et Soxhlet	36
3.2. Technologies d'extraction vertes.....	36
3.2.1. Extraction assistée par ultrasons (EAU)	36
3.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (EAM).....	37
3.2.3. Extraction accélérée par solvant.....	38

CHAPITRE 4 :

MATERIELS ET MEHTHODES

4.1. INTRODUCTION.....	40
4.2. MATERIELS.....	40
4.2.1. Matière végétale.....	40
4.2.2. Produits chimiques.....	40
4.2.3. Les appareils utilisés.....	41
4.3. METHODES.....	41
4.3.1. Détermination de la teneur en eau.....	41
4.3.2. Méthodes d'extraction.....	42
✓ Dégraissage par Soxhlet.....	42
✓ Macération.....	43
✓ Extraction par micro onde MAE.....	43
4.3.2.1. PURIFICATION.....	45
4.3.2.2. IDENTIFICATION.....	47
✓ Par analyse chromatographique.....	47
✓ Par Analyse spectroscopique Infra Rouge.....	49
✓ Mesure de la concentration micellaire critique(CMC).....	50
4.3.3. FORMULATION DU GEL ANTIBACTERIEN.....	50
4.3.4. CARACTERISATION.....	51
A. Caractérisation rhéologique du gel.....	51
✓ Etude en régime oscillant : Test de viscoélasticité.....	51
✓ Test d'écoulement.....	52
✓ Test de fréquence.....	53
✓ Rampe de Température.....	53
B .Evaluation de l'activité antibactérienne du gel formulé et du gel de référence par la méthode de disque sur milieu gélosé.....	53

CHAPITRE 5 :

RESULTATS ET DISCUSSION

5.1. DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU.....	57
5.2. RESULTATS DE L'EXTRACTION.....	57
5.2.1. Calcul du rendement de l'extraction.....	57
5.2.2. Identification des saponines.....	59
5.2.2.1. Détection des saponines.....	59
5.2.2.2. Analyse CCM.....	59
5.2.2.3. Spectrophotométrie IR.....	60
5.2.2.4. Mesure de la CMC.....	61
5.3. CARACTERISATION RHEOLOGIQUE DU GEL DE REFERENCE ET DE PLACEBOS.....	63
a. Test de viscoélasticité.....	63
b. Test d'écoulement des placebos et du produit de référence.....	66
5.4. FORMULATION DU GEL A BASE DE XANTHANE.....	68
5.5. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE.....	69
5.5.1. Mesure du pH.....	69
5.5.2. Résultats de la caractérisation rhéologique du gel optimal en présence de saponine.....	69
a. Test d'écoulement.....	69
b. Test de fréquence.....	70
c. Rampe de température.....	71
5.6. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE.....	73
5.7. Conclusion.....	74

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, l'homme qui vit cote à cote avec les plantes, est habitué à les consommer pour leurs propriétés médicinales et nutritives. Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie [1].

L'étude de la chimie des plantes est toujours d'une brûlante actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives [2].

Dans les pays en voie de développement, entre 70 et 95% de la population a recours aux plantes médicinales pour les soins primaires par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité. Il est estimé qu'au moins 25 % de tous les médicaments modernes sont dérivé, directement ou indirectement, à partir de plantes médicinales, principalement grâce à l'application des technologies modernes aux connaissances traditionnelles [3].

De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme [4].

La plante dont nous nous sommes intéressés est l'*Hedera Hélix* connu par le lierre grimpant, elle fait partie de la famille des Araliacées. Cette espèce est originaire d'Europe, et d'Asie occidentale et elle est largement répandue en Algérie [5].

Les feuilles du lierre pourraient constituer un véritable réservoir des principes actifs notamment les saponines triterpéniques qui sont responsables des activités biologiques de cette plante. Dans le domaine de la pharmacologie et de la cosmétique de nombreuses recherches ont été réalisées pour démontrer ses éventuelles propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes, antidiabétiques, antifongiques, anti cancérigènes et anti oxydantes [6].

Notre travail s'inscrit dans le cadre général des travaux visant la valorisation des ressources naturelles d'origine végétale. Dans ce contexte, l'objectif visé par cette présente étude consiste à valoriser les feuilles du lierre considérées, on s'intéresse particulièrement à l'extraction du principe actif de *Hedera hélix L* qui est les saponines

triterpéniques et son utilisation à la formulation d'un gel antibactérien à base de Xanthane qui est un biopolymère épaississant gélifiant, et rarement utilisé dans de telles formulations.

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

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dans laquelle, on présentera la plante et ses caractéristiques et d'autre part les différents procédés d'extraction. La seconde partie est une étude expérimentale dans laquelle on décrit les matériels et les méthodes abordées pour l'extraction, la formulation du gel et la caractérisation physico-chimique, rhéologique et biologique suivi d'une discussion des résultats obtenus.

Enfin, on terminera par une conclusion qui résumera l'ensemble des résultats du travail et présentera les perspectives envisageables à réaliser.

CHAPITRE 1 :

FORMULATION

COSMETIQUE

CHAPITRE 1 : FORMULATION COSMETIQUE

1.1. DEFINITION DE LA FORMULATION :

La formulation est «la Connaissance de la science des matériaux et de la chimie physique, jointe à l'art d'arriver à la meilleure combinaison de constituants. Alors que la chimie traite de la réaction chimique entre substances, la formulation traite de la coexistence de substances sans réactions chimiques » [7].

Elle est aussi «l'Ensemble des connaissances et des opérations mises en œuvre lors du mélange, de l'association ou de la mise en forme d'ingrédients d'origine naturelle ou synthétique, souvent incompatibles entre eux, de façon à obtenir un produit commercial caractérisé par sa fonction d'usage et en aptitude à satisfaire un cahier de charges préétabli » [8].

1.2. LES DIFFERENTS DOMAINES DE LA FORMULATION :

La formulation touche toutes les industries de transformation de la matière depuis les industries amont produisant les matières premières jusqu'aux industries aval, directement en contact avec l'utilisateur final (industriel ou grand public), qui fabriquent des formulations prêtes à l'emploi on site :

1.2.1. Formulation agro-alimentaires :

L'industrie alimentaire est basé sur quatre principe qui sont : la transformation des produits par cuisson ou fermentation, l'extraction, séparation ou bien la purification des constituants des produits naturels, d'effectuer des mélanges pour obtenir les goûts et les textures voulues, et enfin de stabiliser les produits de l'agriculture et de la pêche par séchage, traitement thermique ou frigorifique, etc.

1.2.2. Formulation pharmaceutiques :

Ce type de formulation consiste en générale au développement des médicaments en terme simple, c'est de transformer des idées en principes actifs potentiels pour le développement, l'objectif du développement étant de transformer un principe actif en un

médicament [9]. Le développement regroupe 3 étapes : pré-formulation, formulation et optimisation [10, 11-12].

1.2.3. Formulation cosmétiques :

Par définition, la cosmétique, terme générale appliqué à toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les divers parties superficielles du corps humains ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue exclusivement ou principalement de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de corriger les odeurs corporelles et/ou de les protéger ou les maintenir en bon état (CE 14/06/93) [13].

Dans ce qui suit, on va s'intéresser au domaine cosmétique.

1.3. LE COSMETIQUE :

Un produit cosmétique peut être qualifié de naturel que s'il ne contient aucun produit de synthèse (à l'exception de conservateurs, parfums ou propulseurs) [14]. Et un produit cosmétique biologique s'agit d'une famille de produits contenant un maximum d'ingrédients naturels, issus du règne végétal, ou les extraits de fruits, les huiles essentielles et les eaux florales. Les fabricants s'interdisent par ailleurs d'utiliser des substances indésirables [15].

On distingue quatre grandes classes de produits cosmétiques :

- Produits pour la peau
- Produits capillaires destinés aux soins et à l'entretien des cheveux.
- Produits pour les phanères ;

✓ Composition générale des produits cosmétiques :

Un produit cosmétique est composé de :

➤ Les excipients :

Le terme excipient est ambigu. Il vient du mot latin « excipere » qui veut dire transporter. Son rôle est de supporter le ou les ingrédients actifs et par sa composition, il peut avoir un rôle de protection par lui-même.

Certains excipients favorisent une action exclusivement superficielle, d'autre permettent le passage à travers la couche cornée, d'autres encore conduisent l'actif jusqu'au derme.

➤ **Les adjuvants**

Du latin « adjuvare » qui veut dire aider. Ce sont des substances ajoutées en petites quantités à la formulation pour compléter le rôle de l'excipient. Ils ne sont pas toujours indispensables, comme par exemple les stabilisants et les humectants qui empêchent la préparation de se dessécher.

➤ **Les additifs :**

Ce sont des substances ajoutées en petites quantités à la formulation. Ils sont généralement indispensables. Ce sont essentiellement des conservateurs, des antioxydants, des parfums et des colorants.

➤ **Les ingrédients actifs:**

Les ingrédients actifs apportent au produit cosmétique son efficacité. Ils sont donc réservés aux produits de soins.

Suivant la composition du produit cosmétique, ce dernier, après formulation, peut donner plusieurs formes finales :

- Solutions aqueuses ;
- Solutions huileuses ;
- Crèmes ;
- Gels ;
- Pâtes ;
- Dispersions ;
- Poudres ;
- Aérosols [15].

1.4. LES GELS:

1.4.1. Généralité sur les gels :

Les gels sont des réseaux tridimensionnels constitués par une faible quantité (0,1 à 10 %) d'une substance dans laquelle l'eau ou un autre solvant est retenue. Ils peuvent ainsi être obtenus à l'aide de tensioactifs, d'émulsions, de suspensions ou de polymères. Les gels dont il est question dans cette étude sont des hydrogels produits par réticulation à partir de chaînes de polymères.

Selon les interactions qui existent au sein du milieu, on classe les réseaux de macromolécules en deux principales catégories [16] : les gels non permanents ou réversibles et les gels permanents ou irréversibles.

- les gels non-permanents, les nœuds de réticulation sont des associations intermoléculaires dues à des liaisons faibles réversibles (énergie de liaisons comprise entre 1 et 40 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) [18] : ponts d'hydrogène (ex : $\text{H-O}\cdots\text{H}$), interactions électrostatiques de type Van der Waals, ponts ioniques (ex : $\text{COO}\cdots\text{Na}\cdots\text{OOC}$). Ces liaisons conduisent à la formation de zones de jonction ayant une structure plus ou moins ordonnée.

- Les gels permanents sont produits par liaisons covalentes (énergie de liaison comprise entre 150 et 900 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) [17] entre les chaînes linéaires préexistantes (vulcanisation) ou entre des unités de monomères dont certaines au moins ont une fonctionnalité supérieure à deux (polycondensation) ou encore par polymérisation en chaîne de monomères dont les groupes de réactifs sont des doubles liaisons.

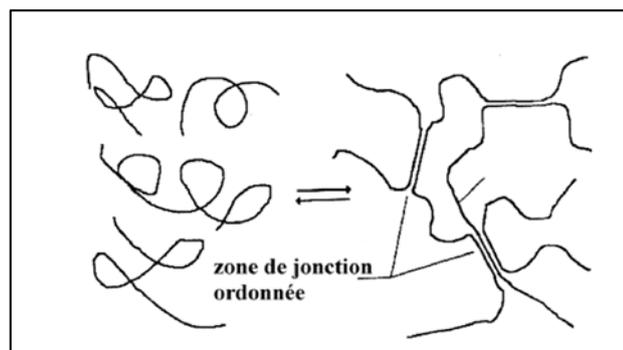


Figure 1.1: Schéma de formation d'un gel réversible [18]

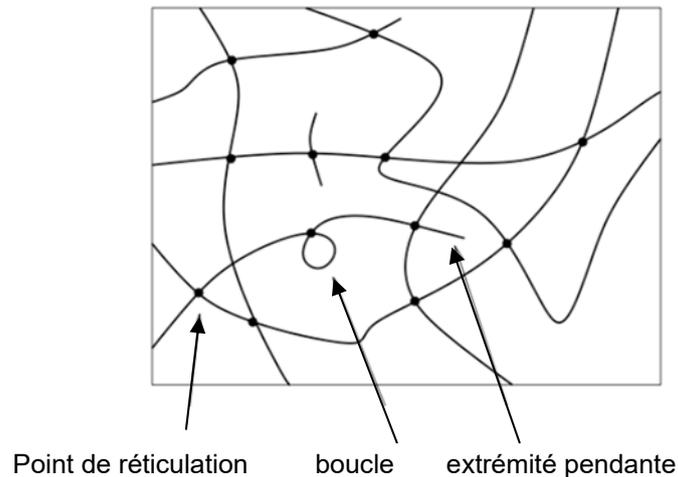


Figure 1.2 : Schéma d'un gel irréversible [19].

1.4.2. Les Types de gel :

Selon la Pharmacopée européenne, « les gels sont des liquides gélifiés à l'aide d'agents gélifiants » [19].

- les gels lipophiles : les excipients sont habituellement la paraffine liquide additionnée de polyéthylène ou d'huiles grasses gélifiées par de la silice colloïdale ou des savons d'aluminium ou de zinc.
- les gels hydrophiles : l'excipient est habituellement de l'eau, du glycérol ou du polyéthylèneglycol gélifiés par des poloxamères, de l'amidon, des dérivés de la cellulose, des carbomères ou des silicates de magnésium-aluminium.

On parle d'hydrogels si la phase liquide est l'eau et d'oléogels si elle est huileuse.

1.4.3. Gel de Xanthane :

1.4.3.1. La gomme de Xanthane :

1.4.3.1.1. Généralités :

Le xanthane (E 415) est un polysaccharide exocellulaire produit par une bactérie appelée « *Xanthomonas campestris* » intervenant dans le métabolisme de certains végétaux.

La gomme xanthane (GX) est obtenue par la fermentation aérobie de sucres par la bactérie *Xanthomonas campestris*[20]. La bactérie produit la gomme grâce à un organe spécifique à la surface de la cellule (procédé enzymatique complexe), et est ensuite

sécrétée dans le milieu environnant. La GX peut ensuite être précipitée avec de l'alcool isopropylique afin de la récupérer. Puis, une succession d'étapes est nécessaire : séchage, broyage, purification, différents traitements..., afin d'obtenir la GX sous la forme d'une poudre utilisable.[20]

1.4.3.1.2. Structure chimique du motif :

La composition chimique de référence du motif a été établie par Jansson et al en 1975 et confirmée par Melton et al en 1976 [21]. Il existe de multiples travaux antérieurs mais l'ensemble des références plus récentes semble s'accorder sur le motif décrit par Janson représenté sur la figure (1.1).

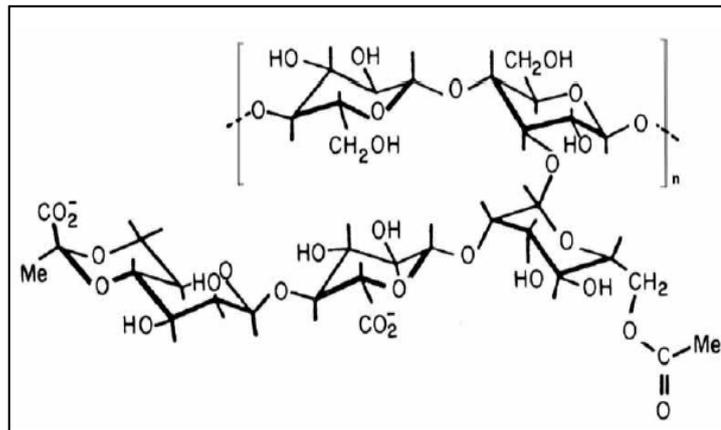


Figure 1.3 : Formule développée du motif du xanthane [21].

Trois fonctions apparaissent sur les cycles de la chaîne latérale du motif :

- un groupement acétate sur le cycle le plus proche du squelette principal.
- un acide glucuronique sur le cycle intermédiaire.
- un acide pyruvique sur le cycle terminal.

1.4.3.1.3. Propriétés de la gomme xanthane :

- le polymère a un caractère anionique, de masse molaire très élevée : entre $1,5 \times 10^6$ et 5×10^6 g/mol selon la fermentation, souvent neutralisé dans les produits alimentaires par la présence de cations.

- la gomme xanthane est soluble dans l'eau froide (dès 10 à 20 °C). La solubilisation se fait en deux étapes. La première étape est la dispersion des grains constituant la poudre (l'individualisation des particules). La dispersion sera d'autant plus rapide que la taille des

grains est élevée. La deuxième étape est l'hydratation. Les molécules d'eau se fixent progressivement sur les macromolécules et réduisent de ce fait les interactions soluté-soluté, jusqu'à l'individualisation des macromolécules.

- La gomme xanthane est insoluble dans la plupart des solvants organiques.

- la gomme xanthane accepte bien les mélanges avec des sels et d'autres hydrocolloïdes; elle forme des gels de consistance diverse avec les galactomannanes. Longtemps, seule la gomme xanthane a été autorisée pour les applications alimentaires comme agent épaississant, gélifiant, stabilisant et suspensif. [22].

1.4.3.2. Le xanthane en solution :

A l'état dilué, les macromolécules peuvent être considérées comme des cylindres indépendants semi-rigides (« worm-likechains »), même si des phénomènes d'agrégation localisée ont été mis en évidence dès 80 ppm [23]. Au fur et à mesure que la concentration en polymère augmente, les macromolécules remplissent l'espace sans toutefois pénétrer le volume hydrodynamique « exclu » de leurs proches voisines. A partir d'une certaine concentration c^* (appelée concentration de recouvrement), les chaînes s'enchevêtrent et commencent à former un réseau tridimensionnel. Ce domaine de concentration est appelé « régime semi-dilué » et commence pour le xanthane à des valeurs très faibles : de 150 à 400 ppm selon les masses moléculaires.

A l'état concentré, qui marque la fin du régime semi-dilué, n'est pas toujours observable. Il a été mis en évidence entre 0,6 et 0,8 % pour le xanthane [24], mais cette concentration varie selon la technique de mesure utilisée. Des comportements de type gel « faible » apparaissent dès ces concentrations et parfois à des dilutions plus importantes (de l'ordre de 0,1 % en polymère). Les interactions mises en jeu dans ces gels sont de faible énergie, à courte distance, réversibles. Elles sont de type « physique » (par opposition aux gels « chimiques », covalentement liés) : liaisons hydrogène, interactions de Van der Waals, liaisons électrostatiques attractives, répulsions entre sites ionisés du polymère, effets hydrophobes. Aux plus hautes concentrations encore, les solutions de xanthane acquièrent les propriétés anisotropes d'un cristal-liquide. La rigidité des molécules induit une organisation supramoléculaire à longue distance mais cet arrangement ne se fait pas nécessairement dans les trois dimensions (d'où cet état intermédiaire entre le cristal parfaitement ordonné,

anisotrope, et le liquide isotrope, totalement désordonné). La structuration du domaine isotrope débute dès 0,5%. Les solutions de forte concentration en polymère peuvent voir coexister des domaines isotropes avec des mésophases. La transition d'un état purement isotrope vers une mésophase pure s'effectue sur une gamme de concentration assez large.

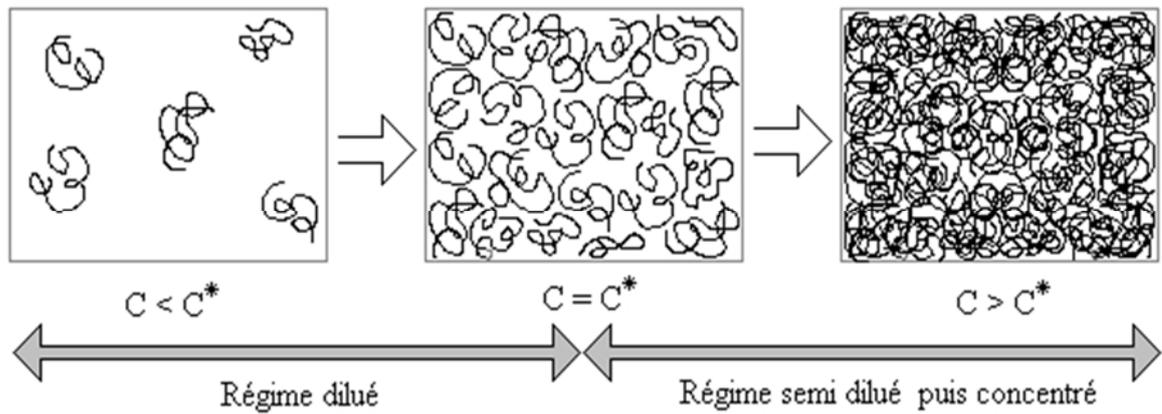


Figure 1.4.schéma représentatif des états de Xanthane en solution.

CHAPITRE 2 :
LES EXTRAITS NATURELS

CHAPITRE 2 :

LES EXTRAITS NATURELS

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments [25].

Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes [25]

2.1. DEFINITION D'UN EXTRAIT :

On appelle extrait, un concentré obtenu par extraction des plantes dans un solvant : alcool ou eau selon les cas. Les extraits sont généralement plus efficaces que les autres types de préparations à base de plantes parce qu'ils sont plus concentrés et qu'il est possible de les standardiser. Ils se conservent aussi plus longtemps. Les extraits de plantes fraîches conservent presque toutes les propriétés de la plante. Il existe également des extraits sans alcool [26].

2.2. PROPRIETES DES EXTRAITS NATURELS :

Parmi les propriétés des extraits naturels on distingue :

➤ **Des composés bioactifs :**

- Antifongiques.
- Herbicides.
- Insecticides.
- Stimulateurs des défenses naturelles.
- Antioxydants.
- Bactéricides.
- photo protecteurs.

➤ **Grande diversité de composés chimiques :**

- Les alcaloïdes : nicotines...
- Les poly phénols : flavonoïdes...
- Les terpènes : eucalyptol, monoterpènes, diterpènes, saponines.

➤ **Conservation :**

Les extraits naturels se conservent dans des endroits frais, à l'abri de l'air et de la lumière, ils ont une longue durée de vie [26].

➤ **Toxicité dermique :**

Ils doivent s'utiliser aux doses , ils ne s'utilisent pas purs sur la peau ou les cheveux.

Par ailleurs, la plupart du temps, appliquer un actif pur ne signifierait pas obtenir une meilleure efficacité (bien au contraire parfois). On risque ainsi des effets indésirables. [26].

2.3. PRESENTATION DE LA PLANTE *Hedera Hélix* (LE LIERRE GRIMPANT) :

2.3.1. Taxonomie de la plante :

- **Nom scientifique :** Hedera helix
- **Noms communs :** Lierre rampant, lierre grimpant, lierre commun
- **Nom anglais :** ivy
- **Classification botanique :** famille des araliacées (Araliaceae)
- **Région de la récolte :** Mitidja (Blida), Algérie.



Figure 2.1: La plante de Hedera Hélix (lierre grimpant).

2.3.2. Histoire de l'utilisation du lierre grim pant en phytothérapie :

Dans la Grèce antique, les Grecs avaient l'habitude de réaliser une boisson, composée d'un mélange de vin et de feuilles de lierre macérées, afin de se protéger des empoisonnements. Plus tard, en Europe, on pensa que le lierre avait des propriétés fébrifuges, purgatives, sudorifiques et vermifuges. On lui attribuait donc bien plus de bienfaits qu'aujourd'hui. Plus récemment, la plante fut utilisée pour calmer les brûlures, les ulcères, les douleurs rhumatismales et névralgiques [27-28].

2.3.3. Description botanique du lierre grim pant :

- Le lierre grim pant est une plante rustique. Il peut grandir de 30 à 45 cm chaque année, et ses rameaux mesurent entre 10 et 15 m. Ces derniers disposent de nombreux entre-nœuds centraux. Avec leurs courtes racines, les jeunes pousses s'attachent toutes seules à un support.
- A maturité, le lierre grim pant peut mesurer entre 2 et 20 m.
- Ses feuilles sont vert foncé, elles peuvent être blanchies au niveau du contour du limbe. Selon leur fonction, leur forme est différente.
- Les fleurs du lierre grim pant sont jaunes, elles comportent cinq pétales et sont regroupées en ombelles.
- Le lierre grim pant a aussi des fruits. Il s'agit de baies, de couleur bleu violet, qui se développent sous forme de grappes. Le lierre grim pant peut être trouvé, pour ainsi dire, partout là où le climat est continental, océanique ou encore méditerranéen.
- Les feuilles sont les parties utilisées en phytothérapie puisqu'elles contiennent des saponosides triterpéniques et des flavonoïdes.

-Les principes actifs du lierre grim pant sont principalement les saponines triterpéniques (2.5–6%), les flavonoïdes, les stérols, les acides phénoliques. Elle comporte aussi des dérivés du falcarinol [29].

2.4. LES SAPONINES :

Les saponines constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes [30]. Ils sont principalement produits par les plantes mais aussi par les organismes marins [31, 32].

Structuralement, les saponines peuvent être classés en deux groupes selon la nature de la génine: les saponines à génines triterpéniques, de loin les plus nombreux existant chez les angiospermes dicotylédones et chez certains animaux marins et celles à génines stéroïdiques, presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones.

Le schéma de la figure (2.2) résume la composition des saponines.

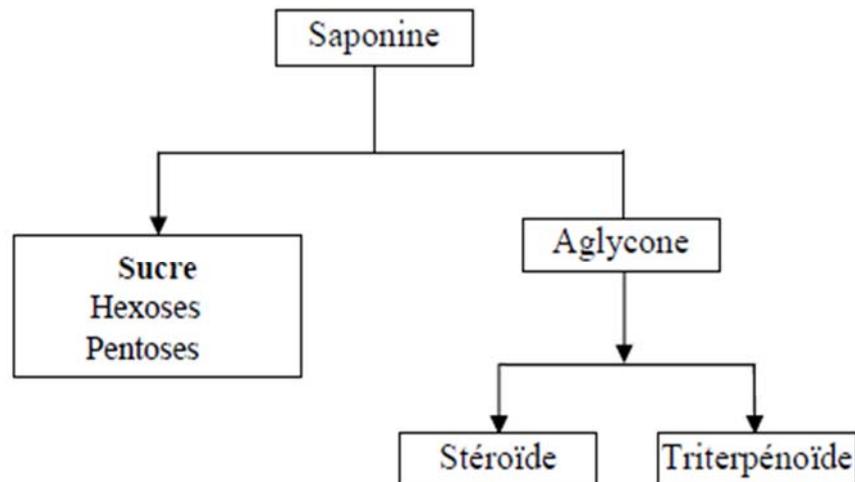


Figure2.2: composition des saponines.

2.4.1. Les génines triterpéniques :

Les triterpènes, 4000 composés construits sur plus de 40 squelettes différents sont des composés en C₃₀ issus de la cyclisation du 3S-2,3-époxy-2,3 dihydrosqualène ou, plus rarement du squalène lui-même. Presque toujours hydroxylés en 3, les triterpènes présentent une très forte unité structurale, les différences majeures étant d'ordre configurationnel et liées à la conformation adoptée par l'époxy-squalène (ou le squalène) avant la cyclisation. Le cation issu de cette cyclisation peut ensuite subir une série de déplacements 1, 2 de protons et de méthyles rationalisant l'existence des différents squelettes tétra- et pentacycliques qui caractérisent ce groupe [30]. Les sapogénines triterpéniques de loin les plus nombreuses sont donc des molécules pentacycliques, les oléananes et les uranes étant les deux squelettes les plus Communs. Les principes directeurs qui conduisent à l'élaboration des principaux squelettes triterpéniques sont rassemblés dans la figure (2.3).

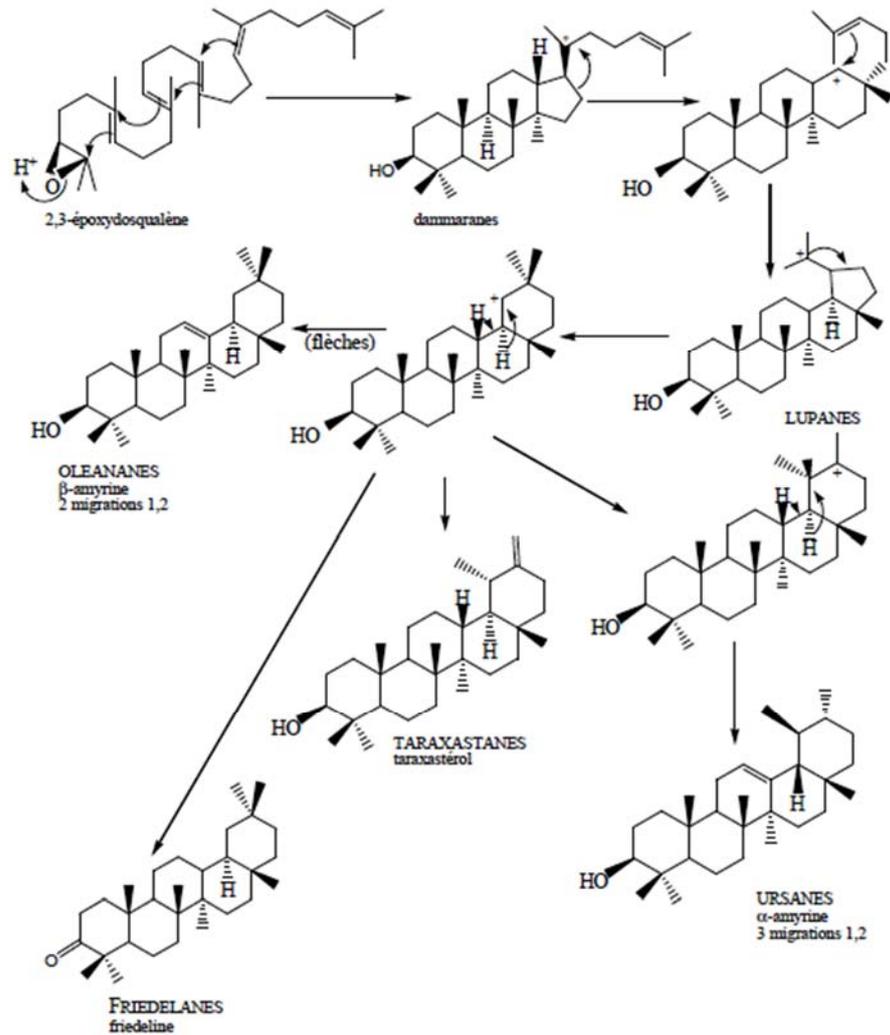


Figure 2.3: Biosynthèse des squelettes de base des triterpènes [30].

2.4.2. Activités pharmacologique des saponines triterpéniques :

Cet extrait naturel est très utilisé en cas de problèmes de peau, parmi ces principales propriétés nous citons [33]:

- Efficacité antibactérienne.
- Activité anti-oxydante.
- Fongicide puissante.
- Hémostatique remarquable.
- Antalgique ;

- Tonique astringente cutanée.
- Cicatrisante.
- Antispasmodique.
- Anti-inflammatoire.
- Anti-tumoral.

CHAPITRE 3:
PROCEDES D'EXTRACTIONS

CHAPITRE 3:

PROCEDES D'EXTRACTIONS

3. METHODES D'EXTRACTIONS DES PLANTES :

Basé sur l'importance des saponines comme propriétés pharmaceutiques, en particulier dans la lutte contre le cancer a provoqué l'invention de nouvelles méthodes d'extraction afin d'obtenir le maximum pour faire face à la demande croissante [34].

3.1. Méthodes d'extraction conventionnelles :

3.1.1. L'extraction par macération :

L'extraction par macération est une extraction solide-liquide où le composé bioactif (soluté) à l'intérieur de la plante est extrait en faisant tremper le matériel végétal dans un solvant spécifique pour une période de temps [35].

L'efficacité du processus de macération est déterminée en deux facteurs principaux, la solubilité et la diffusion efficace. La solubilité est régie par la règle de base de « comme dissout comme » là où il est indiqué que des composés polaires se dissolvent dans les solvants polaires, et les composés non polaires se dissolvent dans les solvants non polaires [36].

Le taux de dissolution d'un soluté dans le solvant d'extraction est déterminé par le taux de transfert de masse d'un soluté du matériel au solvant [35].

En raison du gradient de la concentration dans l'interface solide-liquide, le transfert du soluté à l'intérieur de la matière végétale se produit en montrant une diffusion efficace qui se déroule [35].

Aucun ustensile compliqué et l'équipement qui sont nécessaires pour la mise en place d'un système d'extraction par macération a été un choix populaire pour les chercheurs. Le seul facteur primordial à payer attention à des fins du renforcement d'extractibilité est la connaissance de l'intérêt de la similitude des composés bioactif et la polarité du solvant.

L'éthanol et le méthanol sont les solvants d'extraction les plus utilisés pour extraire les saponines végétales du matériel et l'éthanol est mieux préféré sans doute en raison de l'inquiétude amicale à l'environnement. La durée d'extraction est longue et parfois il faut

jusqu'à des semaines en utilisant cette méthode, donc, l'extraction par macération est souvent aidée avec un agitateur mécanique pour raccourcir le temps d'extraction [37].

3.1.2. Extraction par reflux et Soxhlet :

En raison du principe de travail similaire de l'extraction Soxhlet et reflux, la discussion est effectuée sous le même titre subsidiaire. La seule différence entre reflux et Soxhlet est que l'appareil de Soxhlet est constitué d'un dé à coudre pour loger le matériel végétal.

L'extraction par Soxhlet et par reflux impliquent un processus de distillation qui est couramment utilisé dans les laboratoires et industries en alimentaire et non-alimentaire.

Le processus consiste à chauffer une solution à ébullition et en retournant ensuite les vapeurs condensées à un flacon original. L'inconvénient de reflux et extraction Soxhlet est le temps consommé lorsqu'il prescrit au moins une heure pour une extraction [38].

3.2. Technologies d'extraction vertes :

3.2.1. Extraction assistée par ultrasons (EAU) :

Le phénomène de l'échographie dans la création de cavitation des bulles dans le solvant en agissant comme un micro jet pour dénaturer la paroi cellulaire végétale quand les bulles s'effondrent à raréfaction a donné lieu à une extraction supérieure produisant des composés bioactifs.

Bien que l'extraction assistée par ultrasons soit employée couramment dans beaucoup de composés bioactifs, seuls quelques-uns ont été trouvés dans l'extraction des saponines [42].

3.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (EAM) :

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques non-ionisantes avec une bande passante entre 0,3 et 300 GHz [43, 44].

L'EAM a attiré l'attention pour l'extraction de composés bioactifs de matériel végétal en raison du temps d'extraction court, solvant minime son utilisation et son mécanisme de chauffage spécial [43].

Les applications récentes de l'EAM de planter des métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les quinones, les phénylpropanoïdes, les terpénoïdes, alcaloïdes et des saponines ont été étudiés [45].

Les micro-ondes sont en mesure de pénétrer dans les biomatériaux et de générer de la chaleur en interagissant avec des molécules polaires telles que l'eau à l'intérieur des matériaux. La profondeur de pénétration des micro-ondes dans la matrice de la plante dépend de la constante diélectrique, taux d'humidité, la température et la fréquence du champ électrique [44].

L'eau contenue dans la matière végétale est responsable de l'absorption de l'énergie des micro-ondes ce qui conduit à une surchauffe interne et perturbation de la structure cellulaire, et par conséquent, facilite la diffusion du composé bioactif de la matrice de la plante [44].

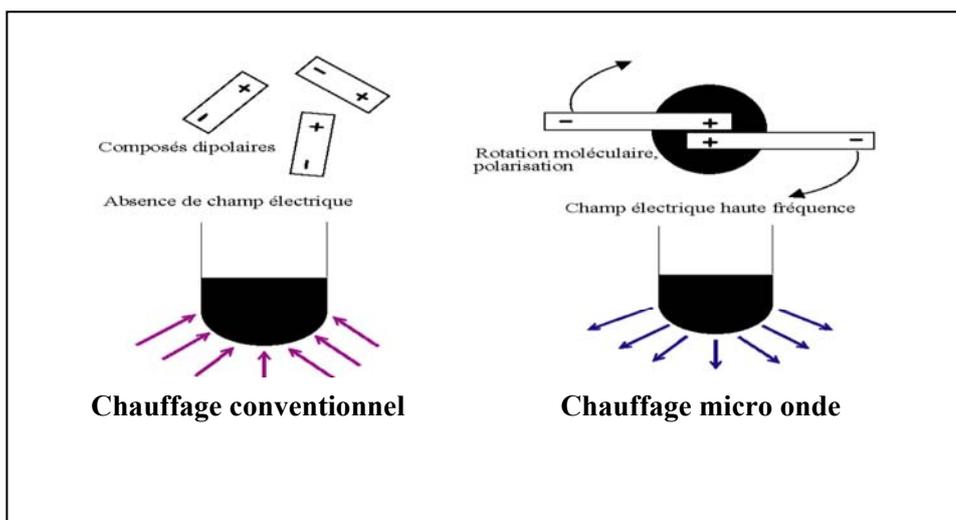


Figure 3.1. Transferts thermiques sous les deux modes de chauffage.

3.2.3. Extraction accélérée par solvant :

L'extraction par solvant accélérée a été considérée comme une technique verte dans la préparation de l'échantillon du matériau végétal avant l'analyse chromatographique [43]. Elle est également connue sous le nom extraction liquide sous pression, parfois, appelée aussi extraction de l'eau chaude sous pression, extraction sous-critiques ou surchauffée de l'eau, lorsque l'eau est utilisée comme solvant [46].

C'est une technique d'extraction rapide automatisée qui utilise des solvants minime à pression et température élevée. Le mérite d'augmentation de la température est d'améliorer le transfert de solubilité et de la masse du soluté dans le solvant, et la tension élevée maintient le solvant inférieur à son point d'ébullition, activation rapide, sûre et efficace des analyses cibles à partir de matières végétales dans le solvant d'extraction [47].

Le processus d'extraction est habituellement réalisé dans 15 à 25 minutes à l'aide de seulement 15 à 45 ml de consommation de solvant. Par conséquent, il a été largement appliqué dans les domaines de l'environnement, nourriture, polymère et les recherches pharmaceutiques.

L'EAS est composée de deux configurations principales, il y a les instruments statiques et dynamiques. La Configuration statique est le remplacement du solvant entre cycles si le procédé d'extraction se compose de plusieurs cycles d'extraction. Une pompe à haute pression est nécessaire pour pomper le solvant d'extraction dans le vaisseau de l'échantillon en permanence dans le programme d'installation dynamique.

Les paramètres affectant le rendement de l'EAS sont la température, la pression, le type et de la composition des solvants, les modificateurs et les additifs, la composition de la matrice et le mode d'extraction [48].

La température de fonctionnement plus couramment appliquée et la pression pour EAS sont 100 ° C à 1500 psi [48].

CHAPITRE 4:

MATERIELS

ET METHODES

CHAPITRE 4 :

MATERIELS ET MEHTHODES

4.1. INTRODUCTION :

L'objectif de notre étude est de formuler un gel antimicrobien à base de xanthane et de saponines. Pour ce faire le travail est subdivisé en trois parties :

- Extraction et caractérisation des saponines à partir de l'Hedera hélix;
- Formulation et caractérisation du gel ;
- Control de l'activité antimicrobienne du gel obtenu.

Dans ce chapitre nous allons d'abords présenter les différents produits et équipements utilisés, puis décrire les différentes méthodes abordées.

4.2. MATERIELS :

4.2.1. Matière végétale :

Les feuilles de l'Hedera hélix ont été récoltées dans la région de la *Mitidja (Blida)* en Février 2017. En cette période, elles sont de couleur verte.

4.2.2. Produits chimiques :

- Les solvants utilisés ainsi que leurs propriétés sont présentées sur le tableau (4.1).

Tableau 4.1. produits chimique.

Propriétés Solvants	Formule chimique	Point d'ébullition (°C)	Densité (g.cm ⁻³)	Point d'éclair	Polarité
Chloroforme	CH_3Cl_3	61.178	1.47979	-	Polaire
Ether de pétrole	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$	35	0.714	-	Apolaire
Ethanol 80°	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	78.293	0.7849	13	Polaire
Méthanol	CH_3OH	64.546	0.7863	11	Polaire
n-butanol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	117.325	0.8575	37	Polaire

*la température de référence est 25°C.

➤ Les produits chimiques :

- Azoture de sodium (NaN_3), agent de conservation, fourni par Sigma- Aldrich.
- La gomme Xanthane, agent gélifiant, fourni par Rhodia Algérie.
- Gélose Mueller Hinton, fourni par institut Pasteur Algérie (pour les analyses microbiologiques).

4.2.3. Les appareils utilisés :

On a utilisé différents appareillages de laboratoire :

➤ Rhéomètre (ANTON PAAR PHYSICA RHEOLAB MCR 302).

L'étude du comportement rhéologique des essais est réalisée à l'aide d'un rhéomètre rotatif muni d'un système de mesure de type « plan-plan » de 20 mm de diamètre. Ce dernier est piloté par un microordinateur qui permet la commande, la saisie et l'analyse des résultats de l'étude.

➤ Microscope optique

L'étude microscopique a été effectuée sur un microscope optique de type OPTIKA à têtes trinoculaire rotatives sur 360° et des objectifs achromatique de 10x, 40x et 100x et capable de capturer des photos de haute résolution.

➤ Micro onde : un micro onde de laboratoire de marque *SAMSUNG*.

4.3. METHODES:

4.3.1. Détermination de la teneur en eau :

Nous avons prélevé 3g de la plante .L'échantillon est enrouler soigneusement dans du papier aluminium et placé dans une étuve réglé a 105 °C pendant 24h .l'échantillon est retiré et pesé. La teneur en eau est définie comme étant la perte de poids lors de la dessiccation elle est calculée selon la formule suivante :

$$\%d'eau = [(MF-MS)/MF] \times 100$$

MF : matière fraîche.

MS : matière sèche.

4.3.2. Méthodes d'extraction:

Après la récolte, les feuilles de l'Hedera hélix sont nettoyées et étalées sur du papier, pour séchage à l'air libre, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Elles sont étendues, sans superposition, et retournées de temps en temps afin d'éviter tout risque de fermentation, sous température ambiante, pendant 20 jours, afin de garder intactes les substances actives des feuilles et éviter la pourriture. Elles sont ensuite broyées à l'aide d'un robot, en une poudre fine afin d'augmenter la surface de contact avec le solvant extracteur.

➤ Dégraissage par Soxhlet :

En premier lieu, on procède au dégraissage pour éliminer les lipides de la matière végétale en utilisant le Soxhlet. L'extraction par Soxhlet est une méthode qui a été employée pendant longtemps. C'est une technique standard et de référence principale [49]. Dans un système conventionnel de Soxhlet, on place la matière végétale dans une cartouche et on remplit l'Ether de pétrole dans un ballon à distiller mis dans un bain marie. Dans notre cas pour 90 g de poudre on a utilisé 300 ml d'éther de pétrole.

Quand le liquide atteint le niveau de débordement, un siphon aspire la solution de la cartouche et la décharge de nouveau dans le ballon à distiller, portant la graisse extraite dans le liquide en bloc. La matière grasse reste dans le flacon et le solvant passe de nouveau dans le lit de solide. L'opération est répétée 2 fois pour avoir un meilleur dégraissage.

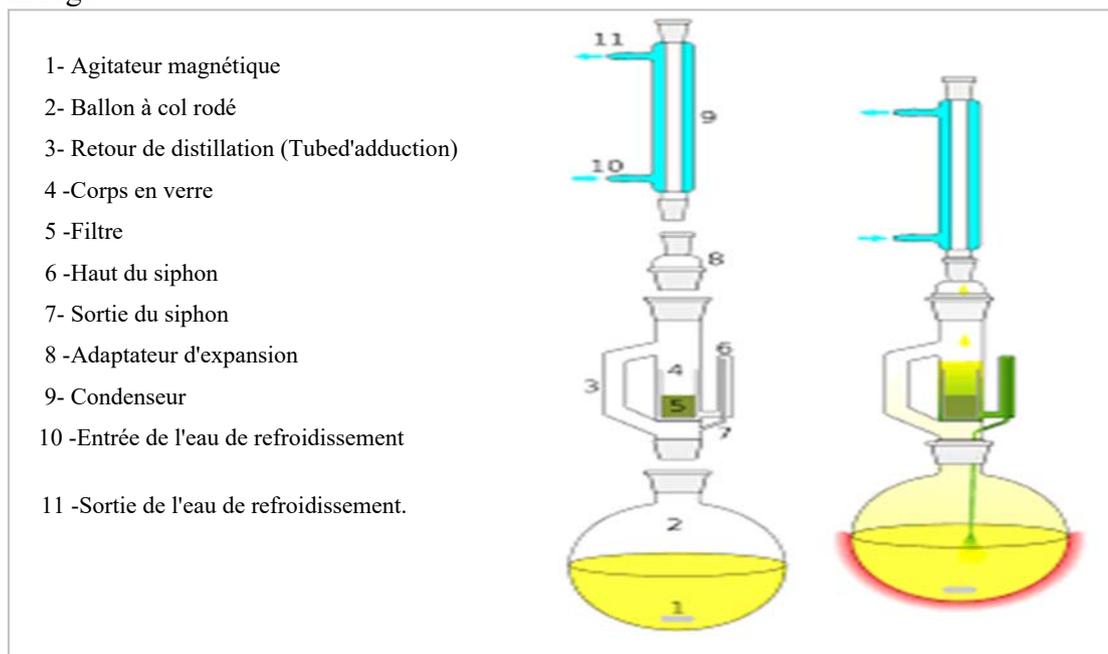


Figure 4.1. Représentation schématique d'un extracteur de Soxhlet.

- la poudre dégraissée est ensuite séchée pendant 24h à l'air libre pour une seconde extraction.

➤ **Macération :**

Une fois la poudre est sèche, on procède à la macération à froid par l'éthanol. On utilise les proportions de 800ml d'éthanol 80° pour 300g de poudre. Le composé bioactif à l'intérieur de la plante est extrait en faisant tremper la plante (la poudre dégraissée) dans l'éthanol à température ambiante pendant 2 jours. Après le macérât est filtré au papier filtre, ainsi on obtient un extrait éthanolique riche en saponines [50].

Puis on évapore le solvant d'extraction au ROTAVAPOR ; d'où le mélange extrait qui contient des saponines et le solvant est mis dans le premier ballon qui trempe en tournant dans un bain marie, la vapeur de solvant monte vers le réfrigérant où elle se condense et retombe dans le second ballon. A la fin le premier ballon ne contient que l'extrait de saponines, et dans le second on récupère le solvant pour une utilisation ultérieure.

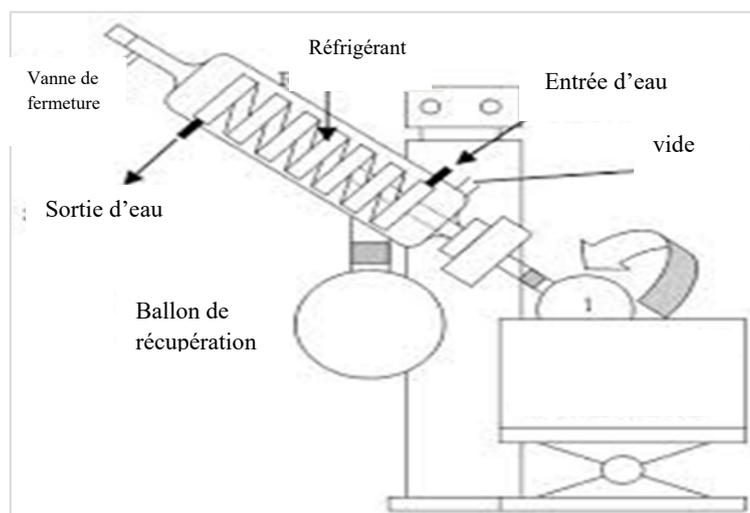


Figure 4.2. Représentation schématique de la séparation par ROTAVAPOR.

L'extrait obtenu est riche en saponine mais il contient des impuretés pour cela on a fait la purification pour avoir des saponines pure.

➤ **Extraction par micro onde MAE :**

a- **Choix du protocole :**

- **La quantité de matière végétale** est fixée de manière à obtenir une quantité d'extrait suffisante. Le but de ce protocole est de minimiser au maximum l'usage de solvant organique afin d'obtenir un produit le plus « propre » possible.

- **La puissance micro-ondes** appliquée lors de l'extraction par solvant assistée par micro-ondes est fonction de la quantité de matière végétale à traiter. Selon la bibliographie, elle est relativement élevée par rapport à la quantité de végétal à traiter. Cependant la quantité de puissance appliquée est étroitement liée au temps d'extraction mais reste aussi en étroite relation avec la température de la matrice, exprimé par l'équation suivante :

- **Le temps total de l'extraction** par solvant assistée par micro-ondes est composé du temps de chauffage et du temps d'extraction. La capacité de chauffage des micro-ondes étant nettement supérieure à un chauffage traditionnel. Comme cela a été mis en évidence que la durée de l'extraction sous micro-ondes sera considérablement réduite par rapport à une méthode classique. Là encore, des expériences préliminaires, ainsi que les données de la littérature, ont montré que sous micro-ondes, contrairement à une extraction classique notamment la macération, il n'était pas nécessaire de chauffer pendant de longues périodes pour obtenir des rendements intéressants.

Le temps d'extraction varie entre 10 secondes et 10minutes [52].

- **Le choix du solvant :** d'après les travaux effectués, les solvants les plus utilisés en extraction par micro-ondes sont l'hexane, le toluène, le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et l'éthanol [52]. Le choix du solvant va définir le type de chauffage. Si le solvant est transparent aux micro-ondes, c'est-à-dire s'il possède une permittivité ϵ faible, c'est directement le matériel végétal qui captera le rayonnement micro-ondes. On choisit l'éthanol comme solvant pour qu'on puisse comparer les résultats avec ceux obtenue par macération.

b-Principe et Mode opératoire :

On chauffe le ballon qui contient une masse de 100 g de la poudre de plante avec 150 ml d'éthanol dans le micro-onde. Les micro-ondes sont absorbées par les parties les plus riches en eau des cellules végétales, puis converties en chaleur. Il en résulte une soudaine augmentation de la température à l'intérieur du matériel végétal, jusqu'à ce que la pression interne dépasse la capacité d'expansion des parois cellulaires. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, et les substances situées à l'intérieur des cellules peuvent alors s'écouler librement à l'extérieur du tissu biologique, l'éthanol se vaporise et les saponines sont emportées avec la vapeur. Celle-ci est ensuite refroidie dans le condenseur. Et on récupère l'extrait dans le deuxième ballon.

On obtient un extrait éthanolique riche en saponine, qu'on doit purifier.

c-Détection des saponines :

Les saponines sont des glycosides contenus dans les plantes qui doivent leur nom au fait qu'elles moussent lorsqu'on les mélange avec l'eau [53]. Pour la détection des saponines, 10 ml d'extrait est placé dans un tube à essais et agité pendant 15 secondes puis déposés pendant 15 minutes.

4.3.2.1. PURIFICATION:

À la fin de l'extraction, on récupère le solvant contenant l'extrait par une filtration simple. Ce dernier est séparé de l'extrait par Rotavapor afin d'obtenir des extraits bruts riches en saponines.

Une fois l'extrait est récupéré, on fait un lavage avec du chloroforme (4 fois) dans une ampoule à décanter, puis on réalise une extraction liquide-liquide avec du n-butanol. La phase butanolique récupérée est évaporée et séchée sous vide à 50°C afin d'obtenir des saponines partiellement purifiées.

L'organigramme suivant présente la procédure de purification des saponines :

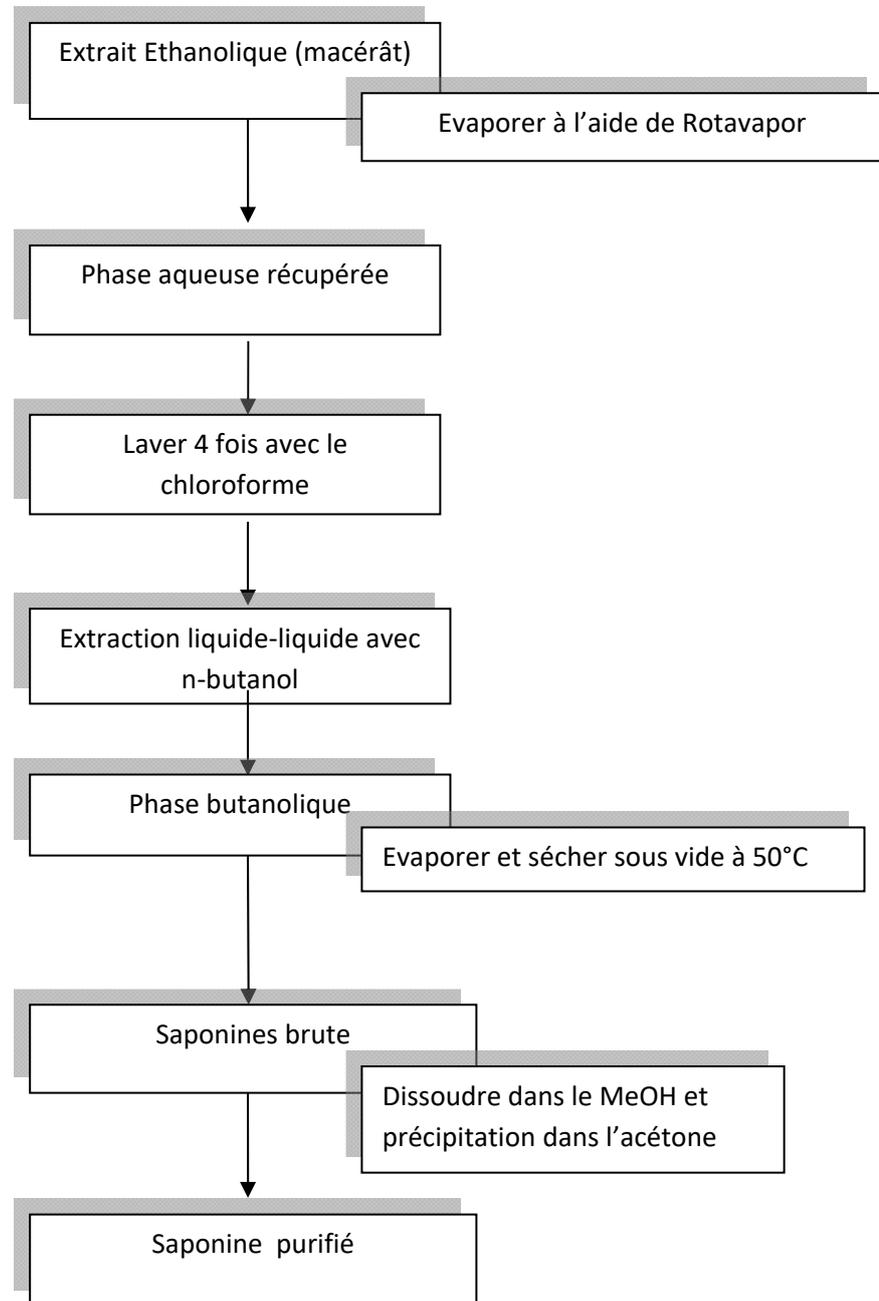


Figure 4.3. Organigramme de purification des saponines.

- **Calcul du rendement de l'extraction:**

Le rendement de l'extraction est calculé par la même méthode pour les différents types des extractions. Il est estimé par le rapport des masses d'extrait obtenu et de la matière végétale utilisée, décrit par la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{m_f}{m_i} * 100 \dots \dots \dots 4.1$$

R(%): Rendement en (%).

m_f: Masse de saponines purifié (ou de graisse pour le rendement en matière grasse) (g).

m_i: Masse de la matière végétale utilisée (g).

4.3.2.2. IDENTIFICATION:

✓ **Par analyse chromatographique :**

- **Chromatographie sur couche mince (CCM) :**

La Chromatographie sur Couche mince ou CCM est une méthode analytique couramment utilisée dans les laboratoires de phytochimie pour la séparation et l'identification rapides des constituants d'un extrait donné. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange des solvants ; qui progresse le long d'une phase stationnaire qui peut être soit une couche mince de gel de silice, de l'alumine ou de la cellulose. Celle-ci doit être uniformément étalée sur un support en aluminium, sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou sur une plaque de verre.

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par son R_f (rapport frontale) qui est le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile et qui peut être compris entre 0 et 1 [54].

- **Conditions chromatographiques :**

-Phase stationnaire :

Plaque de silice CCM (F254).

- Phase mobile :

✓ n-butanol (84%).

- ✓ H₂O (14%).
- ✓ Acide acétique (2%).

- **Révélation :**

- ✓ Solution A : Ethanol.
- ✓ Solution B : Acide acétique.

Mélange de la solution A et solution B avec un rapport de (9:1).

- **Mode opératoire :**

La plaque en gel de silice est placée dans une étuve à 100°C pendant 10 min pour éliminer les vapeurs d'eau. On y dépose ensuite l'échantillon (saponine + éthanol) par apposition au moyen d'une micropipette en verre à 1cm du bord de la plaque. Puis on la place dans une cuve en verre contenant notre phase mobile en position légèrement inclinée et immergée d'environ 0,5 cm dans la phase mobile et dont les vapeurs avaient préalablement saturé la cuve fermée. On laisse la plaque dedans pendant 10 min afin que l'échantillon soit entraîné par capillarité à l'aide la phase mobile vers le haut de la plaque. Le comportement des molécules sur la plaque dépend des interactions existant entre soluté/ phase mobile et la phase stationnaire.

Après que la phase mobile ait atteint le bord supérieur de la plaque, on la retire de la cuve pour la révélation des points.

Après l'apparition du point on calcule la distance parcourue pour déterminer son R_f :

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

La figure (4.4) suivante résume le mode opératoire de cette méthode :

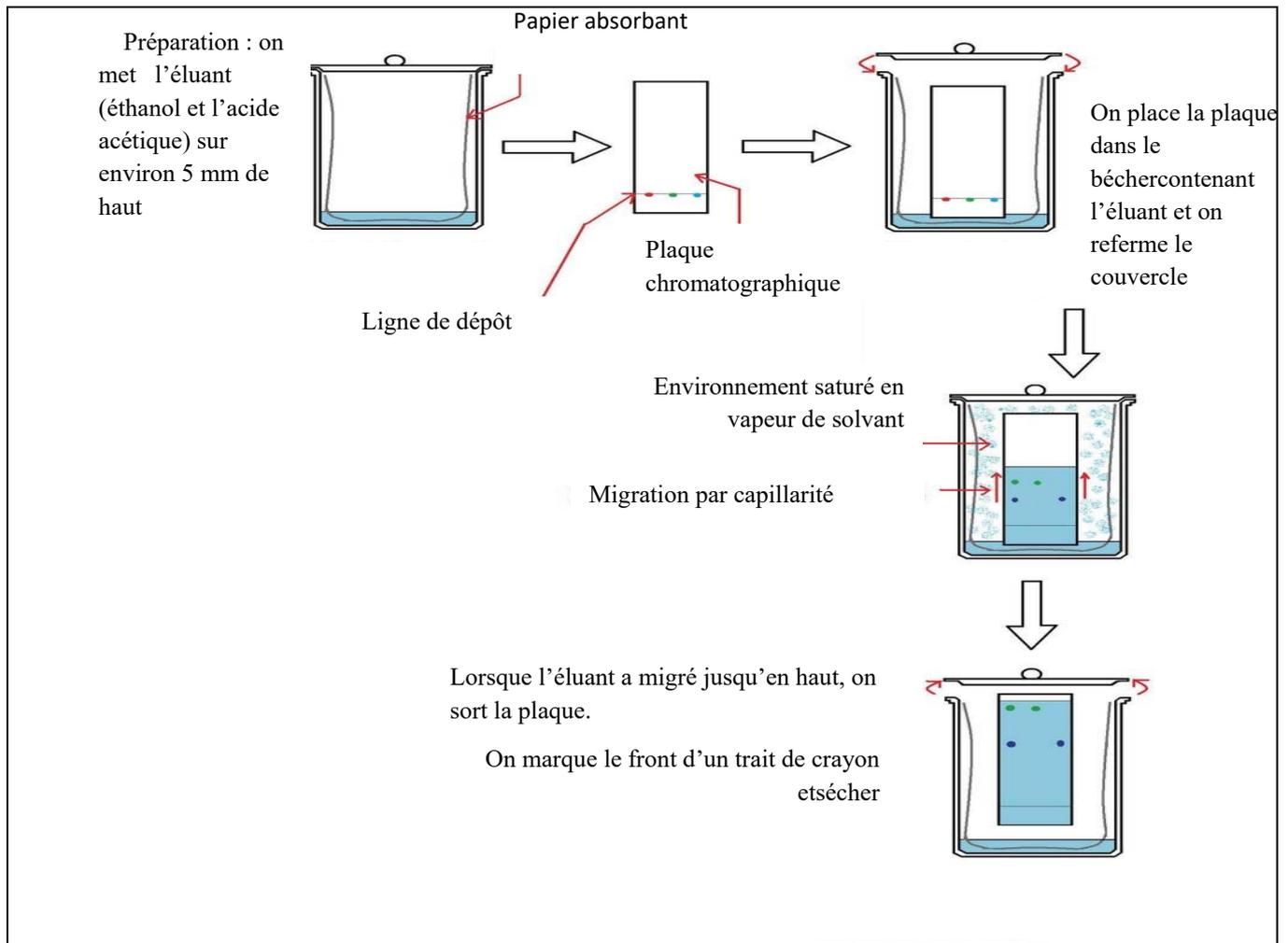


Figure 4.4. Schéma représentatif de la Chromatographie sur couche mince.

✓ **Par Analyse spectroscopique Infra Rouge :**

La spectrométrie infrarouge IR est une méthode de caractérisation rapide et sensible de la plupart des molécules existantes, son utilisation est simple et le coût de son instrumentation en fait un outil accessible à la plupart des laboratoires.

- **Préparation de l'échantillon :**

2 mg de saponines sont mélangés avec 100 mg de dispersif KBr et mis dans un mortier en Agathe. Le mélange est broyé très finement et déposé dans un moule puis soumis à une pression de 8 tonnes pendant 2 à 5 minutes dans une presse pour en faire sortir des pastilles.

✓ **Mesure de la concentration micellaire critique(CMC):**

- **Principe de la mesure :**

La concentration micellaire critique (CMC) est la concentration minimale de l'agent tensio-actif au-delà de laquelle les molécules tensioactives s'associent pour former des agrégats, appelées micelles. Dans la région de la CMC, toutes ces propriétés comme la conductivité, tension superficielle sont susceptibles de présenter un penchant à la courbe lorsque elles sont tracées en fonction de la concentration de l'agent tensio-actif.

- **Procédé expérimental :**

On prépare des solutions à différentes concentrations de saponines variant de 0,01 à 0,1%. On met les échantillons dans une cellule et on y immerge une fine plaque en verre. Pilotée par un microordinateur, la plaque est retirée de la solution. On mesure la force d'étirement de la plaque à la surface de la solution. La valeur de la tension superficielle est directement affichée sur l'ordinateur.

On mesure la tension superficielle TS (dyne/cm) de chaque solution, puis on trace le graphe $TS = f(c)$ pour en tirer la valeur de la CMC.

4.3.3. FORMULATION DU GEL ANTIBACTERIEN :

L'objectif de la formulation est d'obtenir un gel à base de gomme Xanthane. Afin de connaître la concentration de l'agent gélifiant donnant la forme désirée, plusieurs essais ont été réalisés en utilisant différentes concentrations de la gomme Xanthane. Ces essais préliminaires sont dits essais placebo, ne contenant pas de saponines. Ces derniers sont incorporés une fois la concentration en xanthane est optimisée.

- **Procédé de préparation du gel antibactérien:**

• **Préparation des placebo :**

A température ambiante le xanthane à différentes concentrations (0.5, 1.2 et 2.5%), est ajouté progressivement à l'eau distillée en présence de 0,05% d'azoture de sodium comme conservateur, sous agitation à l'aide d'un agitateur à hélices à 450 tr/mn.

L'agitation est maintenue pendant plusieurs heures jusqu'à la dissolution et l'hydratation totale du xanthane et obtention d'un mélange homogène.

- Préparation du gel antibactérien :

Pour la préparation du gel antibactérien, on a procédé d'abord à la stérilisation de tous les matériels et ustensiles utilisés. L'extrait de saponines est ajouté progressivement dans le gel de xanthane sous agitation puis on ajoute l'arôme de vanille et on laisse bien agiter jusqu'à obtention d'un mélange macroscopiquement homogène.

4.3.4. CARACTERISATION :

A. Caractérisation rhéologique du gel:

L'étude rhéologique du produit de référence et de tous les gels formulés à base de xanthane a été traitée expérimentalement selon deux types d'expérience: une analyse de la viscoélasticité des gels en régime linéaire et une analyse sous écoulement en dehors du régime linéaire.

✓ Etude en régime oscillant : Test de viscoélasticité

Cette étude permet de déterminer les propriétés viscoélastiques d'un matériau (module de conservation G' et de perte G'') en appliquant à l'échantillon une déformation sinusoïdale de pulsation ω (en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$), et donc, de fréquence :

$$f = \frac{\omega}{2\pi} \text{ (en Hz)}$$

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t)$$

La contrainte associée est alors de la forme :

$$\sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta)$$

où δ désigne l'angle de déphasage entre la déformation et la contrainte et est appelé également angle de perte. Pour une déformation imposée suffisamment faible ($\gamma_0 < 10^{-2}$), le module complexe G^* , défini comme le rapport entre la contrainte $\sigma(t)$ et la déformation maximale γ_0 comporte une partie réelle et une partie imaginaire. La partie réelle représente le module de conservation G' qui est en phase avec la déformation et la partie imaginaire correspond au module de perte G'' qui est en quadrature de phase avec la déformation. Ce qui nous donne :

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \cos\delta$$

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \sin \delta$$

- Pour un solide parfaitement élastique : δ et G'' sont nuls.
- Pour un liquide visqueux idéal, $\delta = \pi/2$ et G' est nul.

La tangente de l'angle de perte $\tan \delta$ est reliée à G' et G'' par :

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'}$$

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un Rhéomètre à contrainte imposée MCR 302 (Anton Paar) muni du système de mesure plan-plan (25 mm) en appliquant une déformation allant de 0,01% à 1000% en rampe logarithmique et une fréquence fixée à 1 Hz. La température est maintenue à 20°C grâce à un système de régulation de température à effet Peltier.

✓ **Test d'écoulement:**

Le test d'écoulement permet une mesure macroscopique de la force nécessaire pour vaincre les résistances à l'écoulement, ainsi d'évaluer la stabilité et la facilité de prise au moment de l'emploi. Alors, tous les éléments obtenus lors de cette étude permettent de cerner le domaine de variation, auquel les essais présentent un comportement rhéologique intéressant.

L'ensemble des forces (F) appliquées sur l'échantillon induit une contrainte de cisaillement (σ) qui est parallèle à la surface de la couche du produit (S). La variation de déplacement des couches de matériau les unes sur les autres correspond à la déformation γ . Sa dérivée par rapport au temps $\dot{\gamma}$ est le gradient de vitesse, autrement appelé taux de cisaillement.

En utilisant le même système de mesure (plan-plan), on applique une rampe logarithmique croissante en vitesse de cisaillement de $0,0001 \text{ s}^{-1}$ à 1000 s^{-1} et un nombre de point de mesure de 35, ainsi qu'un temps de mesure pour chaque point suffisamment long pour atteindre l'état d'équilibre.

Pour le traitement et la modélisation des courbes d'écoulement d'équilibre, on privilégie l'utilisation du logiciel STATISTICA qui offre une multitude de technique de

méthodes d'optimisation non linéaires se basant sur un calcul itératif (Quasi-Newton, Simplex, ...).

✓ **Test de fréquence :**

Le comportement mécanique de l'échantillon peut être étudié en faisant varier la fréquence des oscillations, ce qui permet d'observer les différents temps de relaxation. Cette technique est particulièrement intéressante pour étudier des phénomènes d'agrégation et de gélification. Pour sonder un matériau dans son état d'équilibre il faut rester dans le domaine linéaire, domaine dans lequel la déformation ne modifie pas la structure [55].

Le gel antimicrobien final, contenant les saponines a subi ce type de test, en faisant varier la fréquence de 0.01 à 100 Hz dans le domaine linéaire ($\gamma = 1\%$) à $T = 20^\circ\text{C}$. Les valeurs de G' et de G'' ont été enregistrées

✓ **Rampe de Température :**

On effectue une rampe de température aller-retour au gel final, en chauffant de 5 à 60°C , puis refroidissant de 60 à 5°C dans les mêmes conditions de déformation (1%), de fréquence (1Hz) et de vitesse ($2^\circ\text{C}/\text{min}$) et on suit l'évolution du module de conservation G' et de perte G'' en fonction de la température[55].

B .Evaluation de l'activité antibactérienne du gel formulé et du gel de référence par la méthode de disque sur milieu gélosé :

Nous avons testé l'activité antibactérienne du gel formulé vis-à-vis de quatre souches bactériennes pures pathogènes fournies par le Laboratoire de Microbiologie d'Hygiène et le laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalo- Universitaire de Blida (CHU Frantz Fanon).

Les 4 souches bactériennes que nous avons utilisées sont :

- Escherichia coli* ATCC 25922.
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- bacillus*spp.
- staphylococcus* spp.

C'est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des extraits. La technique utilisée est la diffusion sur milieu gélosé par la méthode des disques. Pour ce faire, 4 souches bactériennes ont été testées.

-Un inoculum bactérien estensemencé sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Mueller-Hinton.[56]

-Les disques vierges (de 6 mm de diamètre) sont imprégnés du gel formulé ainsi que du gel de référence.

-Les boîtes sont ensuite incubées 24 heures à 37 °C.

- Les zones d'inhibition des souches sont observées autour des disques (6 mm) [57].

CHAPITRE 5 :
RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 5 :

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre nous allons exposer et discuter l'essentiel des résultats expérimentaux obtenus.

5.1. DETERMINATION DE LA TENEUR EN EAU:

La masse de la matière fraîche est 3g.

La masse de la matière sèche après séchage dans l'étuve est de 2.8g.

La teneur est ainsi égale à 6.66%

5.2. RESULTATS DE L'EXTRACTION:

On a procédé à l'extraction des saponines triterpéniques en utilisant la méthode MAE dont les résultats seront comparés avec celui obtenu par la méthode classique effectué qui est la macération.

5.2.1. Calcul du rendement de l'extraction:

➤ Rendement de l'extraction de la matière grasse:

Nous allons d'abord calculer le rendement d'extraction de la matière grasse récupérée après dégraissage de la plante par la méthode du Soxhlet.

Le rendement du dégraissage exprime la quantité de graisse contenue dans les feuilles du lierre grim pant, séchées et broyées.

La masse de la matière végétale utilisée est de 39.34g.

La masse de la graisse récupérée après séparation du solvant par ROTAVAP est de 0.95 g.

Ainsi, on obtient un rendement de 2,41%.

➤ Rendement de l'extraction des saponines par macération:

La masse totale de la matière végétale dégraissée et macérée est égale à 737,75g.

La quantité des saponines récupérées et purifiées est égale à 7,39g

Ainsi, le rendement de cette opération est de 1%.

➤ **Rendement de l'extraction des saponines par MAE :**

La masse totale de la matière végétale dégraissée utilisée est de 100 g

La quantité des saponines récupérées et purifiées est égale à 1.22g

Ainsi, le rendement de cette opération est de 1.22%.

Dans le tableau suivant nous présenterons les principaux résultats des deux méthodes d'extraction des saponines triterpéniques effectuées, la première est la macération et la deuxième méthode est MAE. Nous comparerons ensuite chacune d'entre elles pour déterminer laquelle optimise au maximum le rendement, minimum de solvant et prend un temps d'extraction le plus court.

Tableau 5.1. les principaux résultats de l'extraction.

	Temps d'extraction	Quantité de solvant (ml)	Rendement(%)
MAE	10 min	150	1.22%
Macération	48 h	270	1%

Le résultat obtenu est assez satisfaisant, il concorde avec des travaux ultérieurs qui jugent que ce type d'extraction est plus rentable, en termes de quantité d'extrait, quantité de solvant utilisé et de temps [58], comme c'est illustré sur le tableau (5.1).

Le rendement de la matière grasse est de 2.41% qui est un rendement relativement important par rapport à celui des saponines. Il serait intéressant de pouvoir identifier la nature de cette grasse et de la valoriser.

5.2.2. Identification des saponines :

5.2.2.1. Détection des saponines :

Après avoir récupéré l'extrait éthanolique de MAE on a jugé d'utiliser une technique rapide pour détecter instantanément l'existence des saponines dans notre extrait, et qui est la formation de mousse. Une hauteur de mousse supérieure à 1 cm a été observée et qui a persistée pendant plus d'un quart d'heure, ce qui indique la présence d'une substance tensioactive. Il s'agit des saponines [59].



Figure 5.1 : La mousse de saponine.

5.2.2.2. Analyse CCM :

Après élution et révélation, on a obtenu la plaque présentée sur la Figure (5.2), sur laquelle on remarque la présence d'un point coloré en violet, spécifique aux saponines triterpéniques [60].

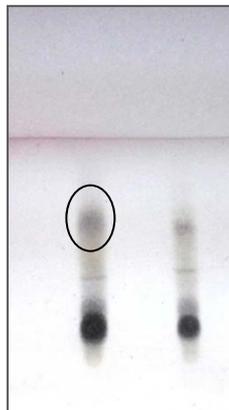


Figure 5.2.Détection des saponines par la plaque CCM.

Le ratio frontal R_f , défini comme étant le rapport entre la distance parcourue par le soluté divisé par la distance parcourue par le front du solvant.

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

$$R_f = \frac{2,6}{5,8} = 0,4.$$

5.2.2.3. Spectrophotométrie IR :

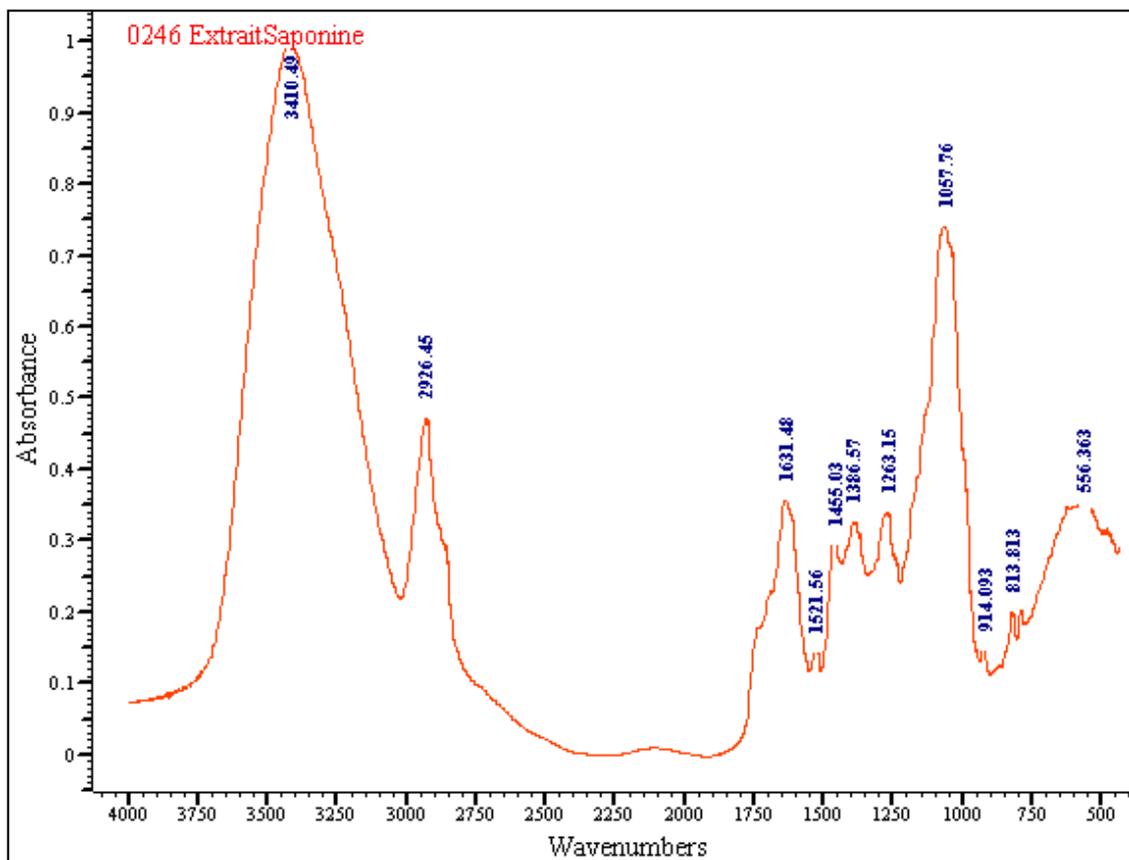


Figure 5.3 : Spectre IR de l'extrait de Saponine.

✓ Interprétation du spectre IR :

L'analyse spectroscopique IR de l'extrait indique la présence de bandes de vibration O-H, C=O, C-H, C=O, C=C, C-O-C, CH₂ et CH₃ qui correspondent aux bandes caractéristiques des saponines.

Le tableau (5.2) présente les différentes fréquences du spectre IR des saponines et les vibrations correspondantes [61].

Tableau 5.2 : fréquence et vibrations du spectre IR de l'extrait de saponine.

Fréquence	Vibrations
3410.49 cm ⁻¹	Vibration d'allongement de l'hydrogène porté par l'atome d'oxygène de la fonction hydroxyle (Alcool lié).
2926.45 cm ⁻¹	Vibration d'allongement de de l'hydrogène porté par l'atome de carbone au position α par rapport à la fonction hydroxyle (-CH ₂)
1631.48 cm ⁻¹	Vibration d'allongement de liaison C=O du cycle
1521.56 cm ⁻¹	Vibration d'allongement de liaison C=C du cycle
1455.03 cm ⁻¹	Vibration de valence qui correspond aux carbonyles dans un système conjugué
1386.57 et 1263.15cm ⁻¹	Vibration de fonction dans le plan de liaison O-H du groupe Hydroxyle
1057.76 et 941.093cm ⁻¹	Vibration d'allongement de liaison C-O-C du cycle

5.2.2.4. Mesure de la CMC :

Le tableau (5.3) résume les différentes valeurs de la tension superficielle en fonction de la concentration des saponines dans la plage de 0.01 g/100ml à 0.1 g/100ml.

Tableau 5.3: Tension superficielle des saponines en fonction de ses concentrations.

C [%]	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1
TS(Dyne/cm)	65	55.2	50.04	47.03	42.76	39.5	39.07	38.72	38.4	38.38	38.2

La variation de la tension superficielle avec la concentration des solutions est présentée sur la figure ci-dessous :

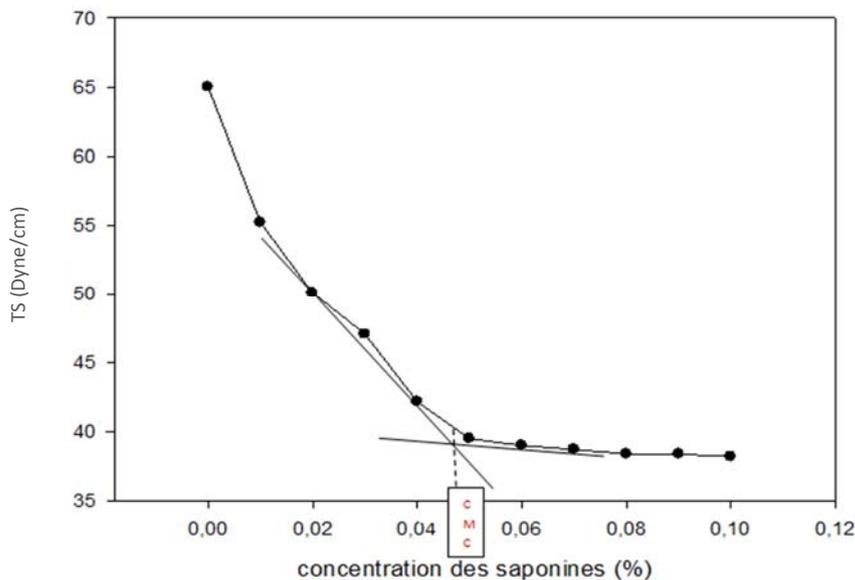


Figure 5.4: Courbe de la variation de la tension superficielle en fonction de la concentration des saponines.

La courbe montre bien que les saponines font abaisser la tension superficielle, ce qui traduit le caractère tensioactif de cette substance. Cette diminution est très rapide dans l'intervalle de concentration [0.01-0.04] g/100ml. Au-delà de cet intervalle, on constate un changement de pente. Entre 0.04 et 0.045 g/100ml, la courbe est légèrement penchée puis elle est pratiquement constante.

L'intersection des deux pentes nous permet de déduire la concentration micellaire critique estimée à **0.05 g/100ml**.

À faible concentration de Saponine, les molécules existent sous la forme monomère et les molécules d'eau entourent la partie hydrophile du surfactant résultant une conductance

initiale faible. La formation de micelles est mise en évidence lorsqu'il y a un changement brusque de la tension superficielle donc la concentration précédente peut être considérée comme la concentration micellaire critique (CMC).

Au-delà de la CMC, la tension superficielle est quasi-constante, les interactions des micelles avec les autres micelles, la formation de plus grandes micelles ou interactions inter micellaires cumulatives peuvent être à l'origine de ces comportements.

5.3. CARACTERISATION RHEOLOGIQUE DU GEL DE REFERENCE ET DE PLACEBOS :

a. Test de viscoélasticité :

a.1. Etude de la viscoélasticité du gel de référence :

Tout d'abord, on a étudié le comportement viscoélastique d'un gel antibactérien commercial pris comme référence pour pouvoir optimiser la quantité de l'agent gélifiant, donnant une structure ayant un comportement similaire à celui de la référence.

La figure (5.5), présente la courbe de viscoélasticité du gel de référence, exprimant les coefficients de rigidité G' et de viscosité G'' en fonction de la déformation.

Au vu de cette courbe, on remarque qu'aux faibles déformations, on enregistre un palier qui correspond au domaine de la viscoélasticité linéaire, où G' et G'' sont constants et donc ne dépendent pas de la sollicitation. Aussi, G' est supérieur à G'' ce qui veut dire que le gel se comporte comme un solide. Dans ce domaine la déformation est réversible au sens élastique, si on refait la même expérience on obtient les mêmes valeurs de G' et G'' .

Quand la déformation dépasse 100% on remarque que G' diminue et intercepte G'' , ce point-là est appelé point gel. A ce stade le comportement s'inverse, donc pour de faibles déformations le produit se comporte comme un solide viscoélastique, au-delà du point gel le produit se comporte comme un liquide viscoélastique.

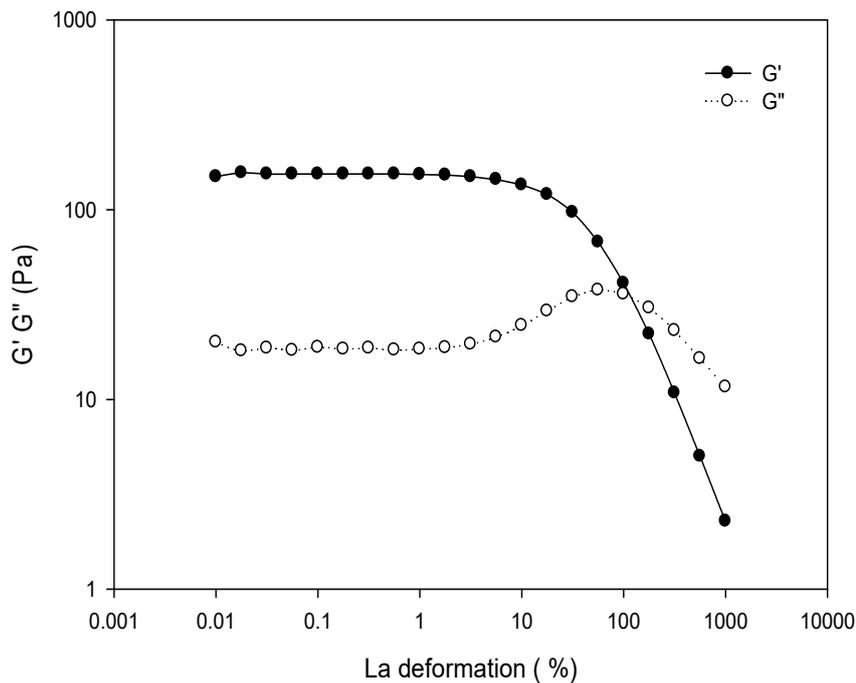


Figure 5.5 : Variation des modules de conservation G' et de perte G'' du gel de référence en fonction de la déformation à $T = 20^\circ\text{C}$ et $f = 1\text{Hz}$.

a.2. Etude de la viscoélasticité des placebos réalisés :

On a effectué un test de viscoélasticité pour les quatre essais réalisés dans les mêmes conditions. Les paramètres importants qu'on pourrait faire ressortir de ce test sont :

- G_0' : module de rigidité (élastique) au repos, il s'agit du palier de G' dans le domaine linéaire ;
- γ_1 : le seuil d'écoulement, appelé aussi point de gélification, c'est la déformation à laquelle G' et G'' se croisent.

Dans ce qui va suivre, nous allons comparer le comportement viscoélastique des placebos à celui de la référence, en tenant compte de ces paramètres.

La figure (6.6) présente les résultats du test de viscoélasticité des gels placebos formulés.

Pour ne pas encombrer le graphe, on a jugé suffisant de présenter uniquement les valeurs du module de conservation G' .

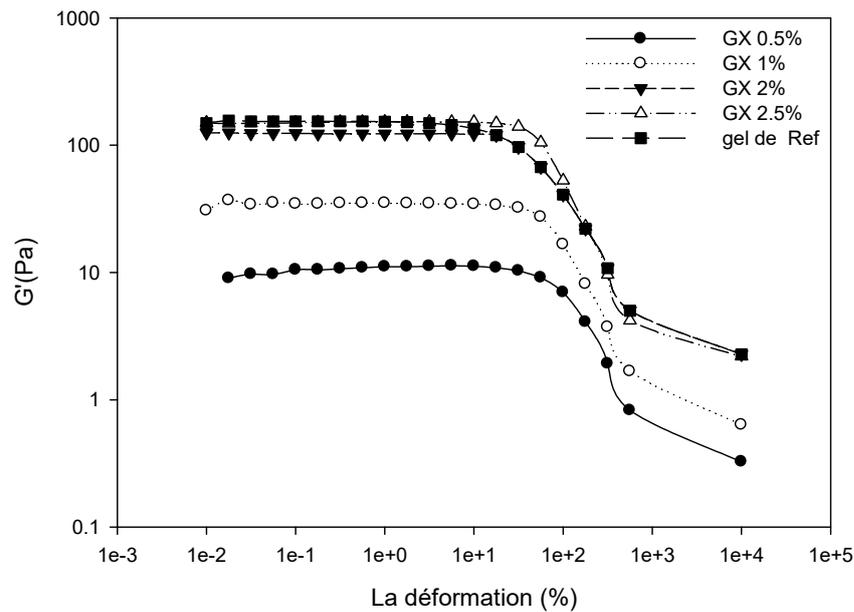


Figure 5.6 : Variation des modules de conservation G' des placeboes et du gel de référence en fonction de la déformation à $T=20^{\circ}\text{C}$ et $f= 1\text{Hz}$.

Au vu de ces courbes, le premier constat à faire est que le comportement de nos placeboes est très comparable à celui du gel de référence. On a fait ressortir les différents paramètres viscoélastiques caractéristiques, qu'on a résumés dans le tableau (5.4) afin de pouvoir les comparer.

On remarque que plus la concentration du xanthane augmente, plus la rigidité augmente, traduisant le rôle souhaité du xanthane qui est un agent gélifiant épaississant.

A noter que le gel de référence ne contient pas les mêmes ingrédients que le gel formulé, donc on a jugé inutile de recherché exactement la même rigidité.

On s'est basé alors, pour le choix, parmi ces placeboes, celui qui a donné une rigidité la plus proche du produit de référence qui est l'essai contenant 2% de GX.

Tableau 5.4: Paramètres rhéologiques G'_0 et le γ_L des tests viscoélastiques.

Essai	$G'_0(\text{Pa})$	$\gamma_L(G'=G'')$ (%)
Réf	135.1	116.26
0,5 % GX	11.19	3.31
1% GX	34.87	11.19
2% GX	127.93	115.01
2,5% GX	167.43	102.41

b. Test d'écoulement des placebos et du produit de référence :

Sur la figure (5.7) sont représentées les courbes d'écoulement en termes de viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement. A première vue, le comportement des quatre essais et du produit de référence est globalement non newtonien, vue la variation affichée de la viscosité. Toutefois, il apparait clairement la présence des zones :une zone au comportement newtonien dans la gamme de cisaillement $< 0,01 \text{ s}^{-1}$, une deuxième zone rhéofluidifiante et l'apparition d'une troisième zone au fort cisaillement au comportement newtonien pour le produit de référence.

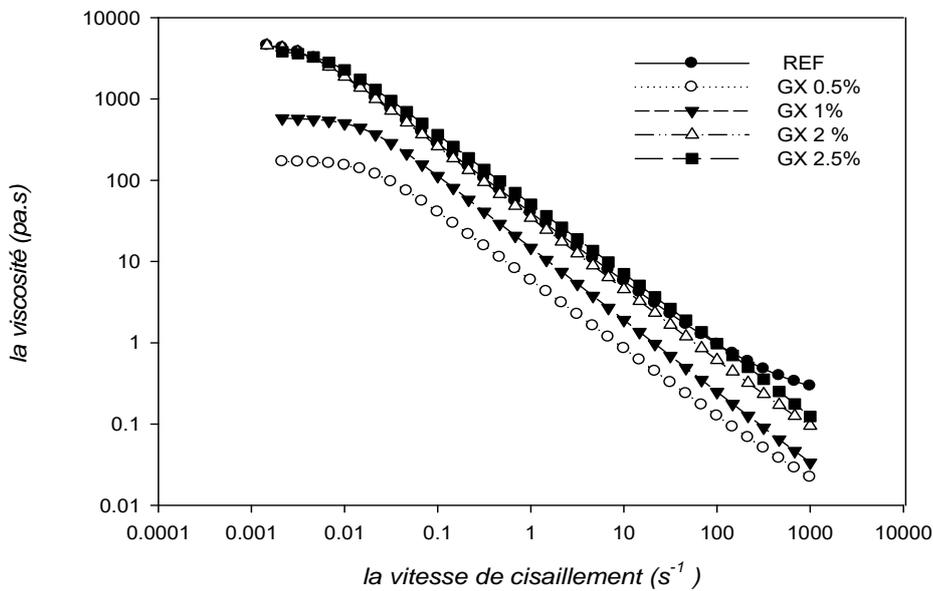


Figure 5.7. Courbes d'écoulement des essais du produit de référence.

La modélisation rhéologique des courbes d'écoulement expérimentales par le modèle de Cross et le modèle de Carreau permet de faire ressortir des paramètres caractéristiques représentatifs du comportement des placebos et de produit de référence.

L'équation du modèle de Cross est sous la forme :

$$\eta - \eta_{\infty} = \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{(1 + K\dot{\gamma})^n} \dots\dots\dots (5.1)$$

L'équation du modèle de Carreau est sous la forme :

$$\eta - \eta_{\infty} = \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{(1 + K\dot{\gamma})^2)^n} \dots \dots \dots (5.2)$$

Où :

K : est le temps caractéristique nécessaire pour obtenir un début de déstructuration et donc un comportement rhéofluidifiant de la suspension. Nous préférons substituer ce paramètre par son inverse, qui a la dimension d'une vitesse de cisaillement, défini comme étant la vitesse de cisaillement critique. $1/K$ est $\dot{\gamma}$ critique nécessaire pour vaincre la structure et provoque une déstructuration partielle de la dispersion.

η_0 : La viscosité du palier newtonien à faible taux de cisaillement.

η_{∞} : La viscosité du deuxième plateau newtonien à taux de cisaillement élevé.

n : Indice de loi de puissance.

Les paramètres de la modélisation rhéologique des différents essais et ceux du produit de référence ,par les deux modèles ainsi que la qualité de l'ajustement qui est donnée par la valeur du coefficient de détermination R^2 sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 5.5: Paramètres rhéologiques des deux modèles du produit de référence et des placébos.

	Modèle de Carreau					Modèle de Cross				
	η_0 (Pa.s)	η_{∞} (Pa.s)	$\dot{\gamma}^C$ s^{-1}	n	R^2	η_0 (Pa.s)	η_{∞} (Pa.s)	$\dot{\gamma}^C$ s^{-1}	n	R^2
GX 0.5%	169.94	0.004	0.018	0.42	0,99	1117.42	1115.6	0.0001	0.0009	0,98
GX 1%	580.59	0.001	0.015	0.44	0,99	300.864	298.70 2	0.0009	0.0006	0,98
GX 2%	4879.10	0.015	0.003	0.43	0,99	1327.80	1319.4 4	0.0000 9	0.0003	0,97
GX 2.5%	4004.72	0.014	0.006	0.42	0,99	1728.67	1718.0 9	0.0000 6	0.0004	0,97
Réf	4862.83	0.018	0.003	0.42	0,99	2122.70	2107.3 9	0.0005 9	0.0004	0,97

Les coefficients de détermination R^2 sont proches de 1, justifiant le choix du modèle de Carreau qui répond le mieux aux résultats expérimentaux obtenus par les courbes d'écoulement des différents essais.

Il apparaît clairement que l'allure de la courbe d'écoulement de la solution contenant 2% est similaire à celle du produit de référence, elles obéissent toutes les deux au même modèle rhéologique ayant les mêmes valeurs des paramètres rhéologique.

Comme il a déjà été constaté, cet essai correspond bien au produit de référence en terme de viscoélasticité aussi, ce qui justifie le choix de cette concentration pour la formulation de notre gel antibactérien.

5.4. FORMULATION DU GEL A BASE DE XANTHANE :

Après avoir optimisé la quantité de xanthane donnant un gel similaire à celui de la référence et ce en se basant sur leur comportement rhéologique, on introduit dans ce gel une quantité suffisante de saponine donnant les propriétés antibactérienne souhaitées.

D'après la bibliographie, les saponines peuvent jouer leur rôle d'antimicrobien à partir de 0,3 % [62]. On a formulé un gel contenant cette concentration auquel on a effectué une analyse microbiologique. Les résultats obtenus n'étaient pas satisfaisants. On a été amené donc à augmenter cette concentration jusqu'à 1,25%, et ce en se basant sur des travaux ultérieurs [62] dans l'espoir d'avoir l'activité du gel souhaité.

Donc on a incorporé l'extrait de saponine dans le gel de Xanthane à 2%, d'où la formule final du gel est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 5.6: quantités des composants du gel final formulé.

Les composants	Les quantités
GX	2 g
Azoture de sodium	0,05 g
ES	1.25 g
Arôme vanille	1g
Eau distillé	Qsp 100 ml

5.5. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE:

5.5.1. Mesure du pH:

Le pH du gel obtenu est égale à 6.26 qui est un pH favorable et conforme aux normes, car la peau a un pH légèrement acide, atteignant des valeurs de 5.5- 6,5. C'est ce qui permet au film hydrolipidique d'assurer une défense naturelle contre le milieu extérieur. Le gel se doit d'avoir un pH qui ne vient pas mettre à mal l'équilibre du film hydrolipidique.

Le pH des produits cosmétiques doit être compris entre 4 et 7 pour les soins appliqués sur la peau [60].

5.5.2. Résultats de la caractérisation rhéologique du gel optimal en présence de saponine :

a. Test d'écoulement

La figure (6.9) présente la courbe d'écoulement du gel formulé et de la référence. L'allure de cette courbe est similaire à celle du produit de référence ainsi que le gel placebo à 2% de Xanthane.

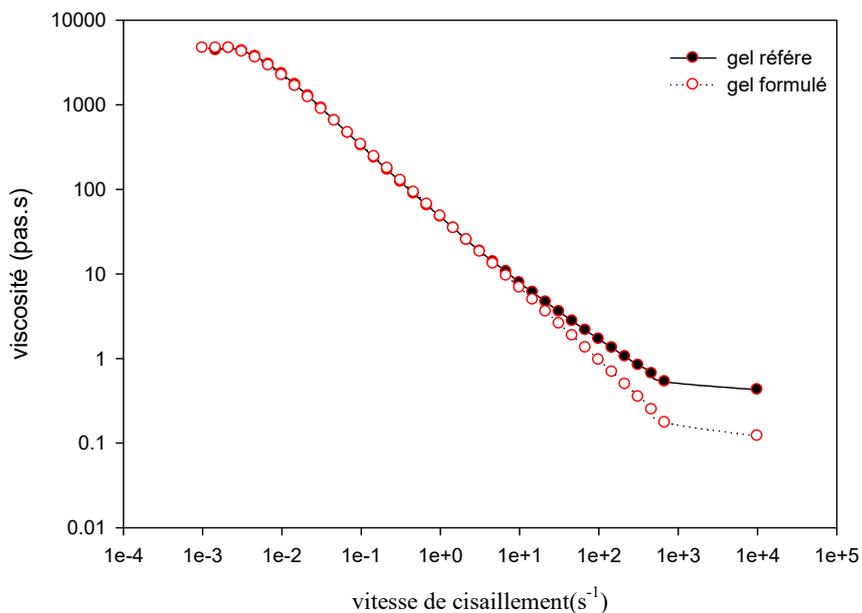


Figure 5.8. Courbe d'écoulement du gel formulé et du gel de référence.

Les paramètres rhéologiques obtenus après modélisation sont présentés sur le tableau (6.7).

Tableau 5.7. Paramètres rhéologiques du modèle de Carreau.

	η_0	η_∞	$\dot{\gamma}_c$	n	R^2
Gel formulé	5028.57	0.0016	0.003	0.42	0.99
Gel placebo	4879.102	0.015	0.003	0.43	0.99
Référence	4862.839	0.018	0.003	0.42	0.99

Il est à noter que l'ajout des saponines n'a pas changé le comportement rhéologique du gel et les valeurs des paramètres rhéologiques restent presque constantes.

b. Test de fréquence :

La figure (5.9) montre l'évolution des modules G' et G'' en fonction de la fréquence dans le domaine linéaire ($\gamma = 1\%$). Le gel présente un comportement de fluide purement rigide ($G' > G''$) dans tout le domaine de fréquence étudié, ce qui démontre la stabilité de notre gel au cours du temps.

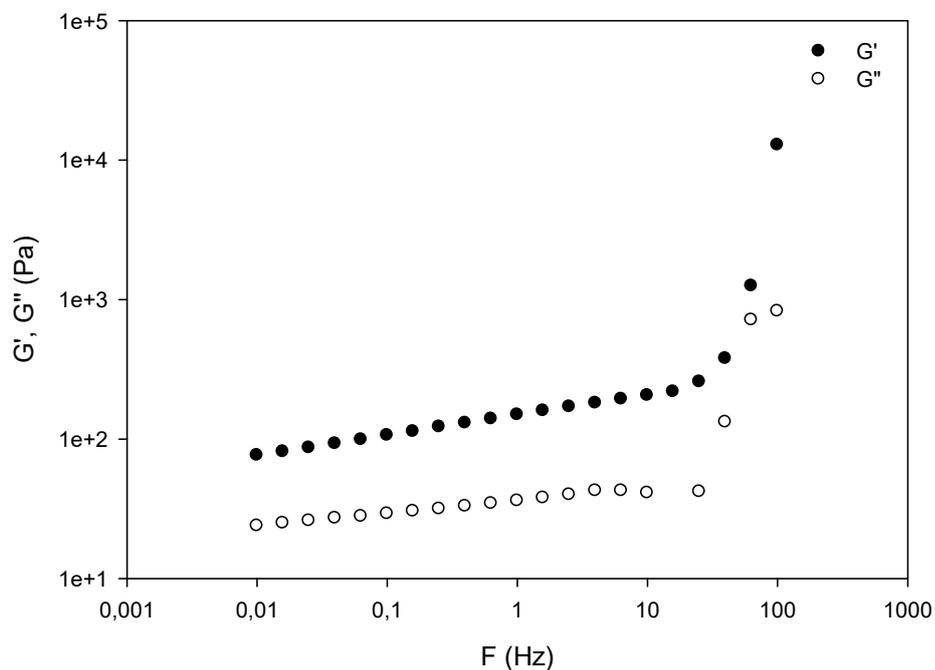


Figure 5.9. Test de fréquence du gel final.

c. Rampe de température :

L'étude de la rampe en température est réalisée afin de mettre en évidence le phénomène d'agrégation et de gélification des biopolymères en solution. Pendant le refroidissement, la transition devrait se manifester par une augmentation brutale des modules à une certaine température qu'on appelle la température critique de refroidissement T_c . Cette augmentation est due à la formation d'agrégats [63] qui conduit à un liquide viscoélastique ou à un gel. Pendant le chauffage, la transition se manifesterait par une diminution brutale des modules à une température critique de chauffage T_h . C'est donc un processus thermoréversible.

Les résultats de la caractérisation du gel final en fonction de la température sont illustrés sur la figure (5.10) Au vu de cette courbe, on remarque la stabilité du gel pendant le chauffage : les modules viscoélastiques demeurent constants, tout en conservant leur comportement de solide ($G' > G''$). Par contre, au cours du refroidissement, une augmentation brutale et inexplicable de G' et de G'' est observée. On a rencontré ce même comportement dans un travail de doctorat de l'université du Maine (France) [63], où l'on a étudié l'effet du système de mesure sur les rampes de température des solutions à base de carraghénanes. Les résultats sont illustrés sur la figure (5.11) et montre la reproductibilité pour tous les systèmes de mesure sauf pour le cône-plan 2°- 40 mm qui présente cette même augmentation inexplicable de G' pendant le refroidissement. Il a été conclu que ce système de mesure était inadéquat. Malheureusement dans notre cas, on pourrait pas changer le système de mesure pour la non disponibilité.

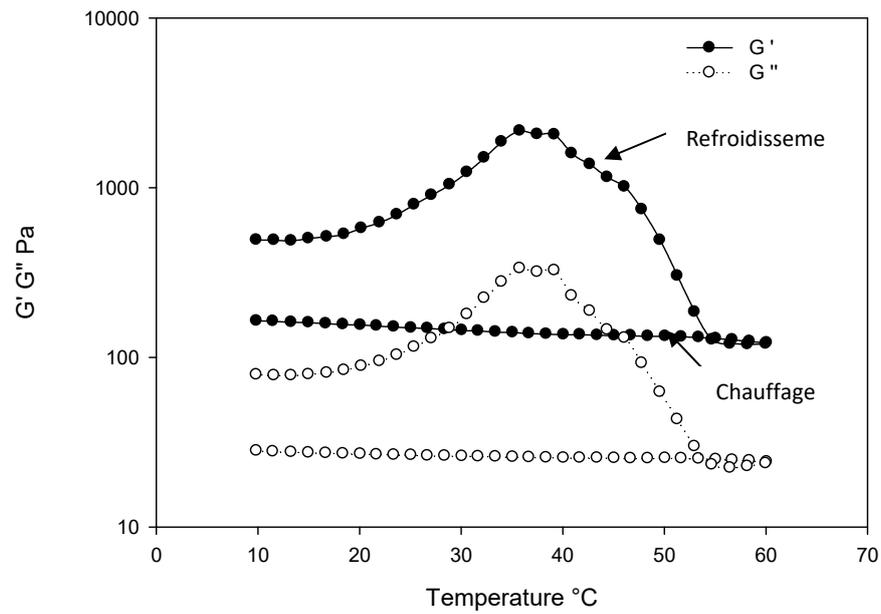


Figure 5.10. Evaluation des modules G' et G'' en fonction de la température de refroidissement et de chauffage.

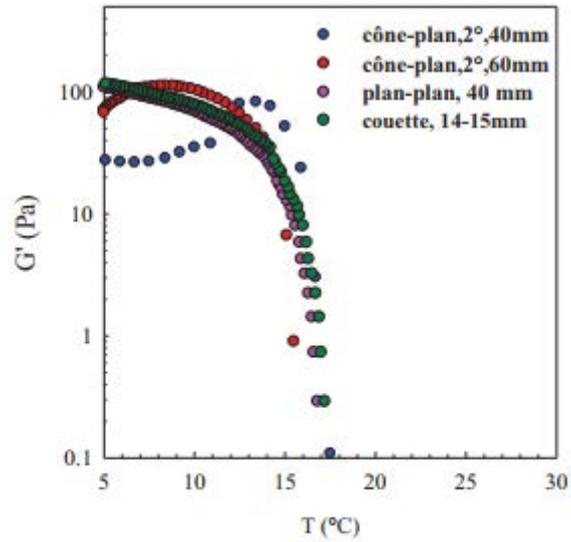


Figure 5.11. Evaluation de G' en fonction de la température de refroidissement pour 4 géométries différentes [61].

5.6. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE :

Les figures suivantes montrent la présence d'effet antibactérien (EA) du gel formulé et ainsi que le gel de référence :



Figure 5.12 : EA du gel sur *Escherichia coli*.



Figure 5.13.EA du gel sur *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 5.14.EA du gel sur *Staphylococcus epidermidis*.



Figure 5.15.EA du gel sur *Bacillus*.

Tableau 5.8: Résultats de l'activité antibactérienne in vitro.

Souches bactérienne	Diamètres d'inhibition en mm	
	Gel formulé	Gel de référence
Bacilluspp	34	35
Staphylococcus epidermidis	22	21
Pseudomonas aeruginosa	35	10
Escherichia coli	9.4	7.8

Les résultats consignés dans le tableau (6.9) montrent que notre gel a une bonne activité inhibitrice sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus spp*, *Staphylococcus spp*.

Les résultats de notre évaluation de l'activité antimicrobienne semblent être en accord avec d'autres travaux indiquant que les saponines triterpéniques de l'*Hedera hélix* possèdent des activités antibactériennes. Ces travaux portant sur 23 espèces de bactéries Gram positive et Gram négative dont 4 parmi ces espèces ont fait l'objet de notre test [62].

CONCLUSION

Les feuilles de la plante (*Hedera hélix*) possèdent des constituants à effet antibactérien important et le responsable de cet effet sont les saponines triterpéniques qu'elles possèdent.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'extraction de ce principe actif et l'utiliser dans la formulation d'un gel antibactérien ayant les mêmes propriétés rhéologique et antibactérienne que le produit de référence.

Le gel formulé est à base de xanthane, biopolymère doté de bonnes propriétés gélifiantes et rarement employé dans de telles préparations cosmétiques.

L'extraction des saponines par MEA a apporté des résultats extrêmement intéressants par rapport à la méthode classique utilisée qui est la macération, d'où le rendement de l'extraction assistée par micro-ondes est de grandeur supérieurs à celui obtenu par la méthode de référence pour un temps d'extraction beaucoup plus faible.

La mise en évidence de la présence des saponines dans l'extrait récupéré a été faite par la caractérisation de ce dernier. Les techniques utilisées, à savoir la CCM, l'IR et la tensio-métrie ont bien répondu positivement.

La caractérisation rhéologique des placébos réalisés et le gel de référence nous a permis de choisir la concentration en xanthane utilisé dans notre formule, à savoir 2%.

Le gel formulé à base des saponines a été caractérisé par des méthodes rhéologiques : test d'écoulement, viscoélasticité, rampe de température et test de fréquence. Les résultats ont montré que ces caractéristiques sont proches de celle du gel de référence et que ce gel est stable dans le temps et résiste à la chaleur.

Cette caractérisation a été suivie par une étude microbiologique du gel antibactérien formulé *in vitro* qui a révélé une activité anti microbienne très intéressante.

Il serait intéressant de poursuivre les recherches dans cet axe à double branches : valorisation de produits naturels, notamment le règne végétal, et la formulation de produits bio substituant les produits chimiques envahissant le marché. Le lierre grimpant ne contient pas uniquement les saponines, il serait donc intéressant de tenter d'extraire les

autres substances actives et de les valoriser en les proposant comme ingrédient dans un produit cosmétique ou parapharmaceutique. Aussi, la quantité importante de graisse qu'on a pu récupérer $R = 2,41\%$ pourrait faire l'objet d'une étude d'identification et valorisation assez intéressante.

- [1] Encyclopédie des plantes médicinales, Larousse, VUEF édition 2001.
- [2] AbdelHassan IA, AbdelBarry JA, Mohammeda ST. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrulluscolocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* p 71,p 325-330, 2000.
- [3] Ferrari, J. Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles :*Gnidia involucrata* Steud. Ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne,2002.
- [4] Adeneye AA , Olagunju JA Preliminary hypoglycemic and hypolipidemic; activities of the aqueous seed extract of *Caricapapaya* Linn. In *Wistar rats.*,*BiolMed1*, p 1-10,2009.
- [5] Allali H, Benmehdi H, Dib MA, Tabti B, Ghalem S, Benabadji N Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian J. Chem.* p 20, p 2701-2710,2008.
- [6] The Complete German Commission E Monographs - Therapeutic Guide to Herbal Medicines, American Botanical Council, US 1998.
- [7] Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G. *Drogen E-O*. Berlin: Springer-Verlag, p399-404,1993.
- [8] K. Anikumar [Enseigner la formulation chimique] Vangelis Antzoulatos 2015.
- [9] J.M.Aubry [Enseigner la formulation chimique] Vangelis Antzoulatos 2015.
- [10] GIBSON, M., *Pharmaceutical Preformulation and formulation*. Interpharm/CRC,2004.
- [11] G. COHEN, *Méthodologie des choix du galéniste : vers une optimisation de la formulation*, in *S.T.P. PHARMA*, p 20-23, 1990.
- [12] Cavatur Raghu, K., N. Vemuri Murti, and R. Suryanarayanan, *Preformulation Studies for Tablet Formulation Development*, in *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Volume 1: Unit Operations and Mechanical Properties*. p 465-484.
- [13] Halbert Gavin, W., *Preformulation*, in *Modern pharmaceutics* p327-356.
- [14] Catherine BAURES, Sonia BEDDA, Emilie GARDERES, Lucie MOREAU, Mélanie RAULOT. «Entrez dans l'univers des controverses actuelles, des labels et de la réglementation », *Les cosmétiques biologiques à la loupe* 2009.

- [15] Wehler P. « Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique ». Edition Maloine, Paris, p 107-129, p190-207, 2007.
- [16] LAFFORGUE Christine, THIROUX Jannick. Produits dermo cosmétiques : modes d'emploi. Éd. Walters Kluwer, 2008.
- [17] D. Durand, Les réseaux macromoléculaires et les gels, Groupe Français des Polymères, chap 5, 1990.
- [18] J. N. Israelachvili, Intermolecular and Surface forces, Academic Press, 1985.
- [19] P. G. de Gennes, Scaling concepts in polymer physics, Cornell University Press, Ithaca, NY, 1979.
- [20] P. WEHRLE. Pharmacie galénique (formulation et technologie pharmaceutique), P201-207.
- [21] E. JOUANNY « Stabilisation des émulsions d'intérêt pharmaceutique par des protéines et des polysaccharides : exemples de la β -lactoglobuline, de la gomme arabique et de la gomme xanthane », thèse de doctorat, département de biopharmacie, université Paris-sud, 2011.
- [22] C. WOOD, D. BRADBURY, G. ELDER « Method for decontamination of nuclear plant components » Electric Power Research Institute. brevet n° WO 97/171, 1996.
- [23] I. ANDRESEN « Some biological functions of matrix components in enthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater ». ACS Symp, 1977.
- [24] Staehelin, J., Buhler, R.E., Hoigné, J., " Ozone decomposition in water studied by pulse radiolysis -2- : $^{\circ}\text{OH}$ and HPO_4° as chain intermediates ", Journal of Physical Chemistry, vol. 88, p5999-6004, 1984.
- [25] Bawa, M.L., " Contribution à l'étude de l'action de l'ozone sur les carbohydrates en milieu aqueux ", Thèse de doctorat, Poitiers, France, 1992.
- [26] Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C. and Pinkas, M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittel-Forschung, p46, p1086-1089, 1996.

[27] Bellvert et al. Hydroxycinnamic derivatives in *Ilex aquifolium* mother tincture. *Planta Medica*, p 74, p 1103-1104,2008.

[28] The Complete German Commission E Monographs - Therapeutic Guide to Herbal Medicines, American Botanical Council, US 1998.

[29] European Scientific Cooperative on Phytotherapy Monographs - The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products 2nd edition, ESCOP, UK 2003.

[30] PDR for Herbal Medicines 4th edition, Thomson Healthcare, US 2007.

[31] Bruneton, J.. *Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes médicinales*. Ed. Tec & Doc Carmichael, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. 2009, Mitchell, J.BE valuation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radio sensibility. *Cancer Res.* p 47, p 936–942,1987.

[32] Avilov, S.A., Kalinovsky, A.I., Stonik, V.A., Riguera, R., Jiménez, C. Koreaside A, a new nonholostane triterpene glycoside from the sea cucumber *cucumariakoraiensis*. *J. Nat.Prod* p 60, p 808–810 ,1997.

[33] Yoshiki, Y., Kudou, S., Okubo, K Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoidsaponins from soybean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* P 62, p 2291–2299, 1998.

[34] Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G. *Drogen E-O*. Berlin: Springer-Verlag p 399-404,1993.

[35] CHEOK C Y, SALMAN H A K,SULAIMAN R. Extraction and quantification of saponins. *Food Research International*, 2014.

[36] TAKEUCHI T M, PEREIRA C G, BRAGA M E M, MAROSTICA M R, LEAL P F, MEIRELES M A A. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwaveassisted, and ultrasoundassisted) fromcondimentary plants. In: *Extracting bioactive compounds for foodproducts – Theory and Applications*, ed. M.A.A. Meireles, p 140– 144, p 151-158, 2009.

[37] REICHARDT C, WELTON T. *Solvents and SolventEffects in OrganicChemistry*. 4thEdn, p 63-64, p 219- 220, p 443-457.

- [38] LEE S T, MITCHELL R B, GARDNER D R, WANG Z, AZADI P, HEISS C. Isolation, characterization, and quantification of steroidal saponins in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009.
- [39] BART H-J. Extraction of natural products from plants—An introduction. In: *Industrial scale natural products extraction*. First Edition, Verlag: Wiley-VCH, p 1-26, 2011.
- [40] BIALY Z, JURZYSTA M, MELLA M, TAVA A. Triterpene saponins from aerial parts of *Medicago arabica* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004.
- [41] BIALY Z, JURZYSTA M, MELLA M, TAVA A. Triterpene saponins from the roots of *Medicago hybrid*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006.
- [42] OLESZEK W A. Composition and quantitation of saponins in Alfalfa (*Medicago sativa* L. seedlings). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998.
- [43] ZHANG Z S, WANG L J, LI D, JIAO S S, CHEN X D, MAO Z H. Ultrasound assisted extraction of oil from flaxseed. *Separation and Purification Technology*. 2008.
- [44] HENG M Y, TAN S N, YONG J W H, ONG E S. Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Trends in Analytical Chemistry*, 2013.
- [45] TAKEUCHI T M, PEREIRA C G, BRAGA M E M., MAROSTICA M R., LEAL P F, MEIRELES M A A. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. In: *Extracting bioactive compounds for food products – Theory and Applications*. ed. M.A.A. Meireles, Boca Raton: CRC Press, p 140– 144, p 151-158, 2009.
- [46] ZHANG H F, YANG X H, WANG Y. Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Trends in Food Science & Technology*, 2011.
- [47] MUSTAFA A, TURNER C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytical Chimica Acta*, 2011.
- [48] SUN H, GE X, LV Y, WANG A. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography*, p 1-23, 2012.

[49] MOTTALEB M A, SARKER S D, Chapter 4-Accelerated solvent extraction for natural products isolation. In: Natural Products Isolation, Maryville: USA, p 75-87, 2012.

[50] LuquedeCastro and Garcia-Ayuso 1998.

[51] TAKEUCHI T M, PEREIRA C G, BRAGA M E M., MAROSTICA M R., LEAL P F, MEIRELES M AA. Low-pressure solvent extraction (solid-liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. In: Extracting bioactive compounds for food products – Theory and Applications. ed. M.A.A. Meireles, Boca Raton: CRC Press, p140– 144, p151-158, 2009.

[52] M. SPIRO, S.S. CHEN, Kinetics of isothermal and microwave extraction of essential oil constituents of peppermint leaves into several solvent systems. Flavour and Fragrance Journal, p10, p 259-272 1995.

[53] S.S. CHEN, M. SPIRO, Kinetics of microwave extraction of Rosemary leaves in hexane, ethanol, and a hexane+ethanol mixture. Flavour and Fragrance Journal, p 10, p.101-112, 1995.

[54] Mémoire pour obtenir le grade de magister en chimie organique option phytochimique présenté par BENGRBA ADLEN université de Constantine MAI 2008.

[55] Emmanuel Rouy, Formulation d'un gel oxydant a matrice organique applicable a la décontamination nucléaire : propriétés rhéologique, Doctorat chimie théorique, université de Montpellier.

[56] SFM (2008), Société Française de Microbiologie, Recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie p 49 Janvier 2008.

[57] National Committee for Clinical Laboratory Standards; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; NCCLS; Villanova. , 1990.

[58] Marie-Elisabeth Lucchesi. Extraction Sans Solvant Assist_ee par Micro-ondes Conception et Application a l'extraction des huiles essentielles. Autre. Universit_e de la R_union, 2005

[59] Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T.: TLC of Triterpenes (Including Saponins). Thin Layer Chromatography in Phytochemistry (1st ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group p 528. 2008.

[60] Françoise Brénon-Audat –structure des molécules organique . Fondation Maison de la Chimie 2010.

[61] Marveille Clay Nono Djamen, Etude structurale et rhéologique des systèmes mixtes Caséinate / Carraghénanes, Thèse de doctorat en Chimie et Physicochimie des Polymeres.université du Maine .P.88.2011.

[62] Yulia Lutsunko ,departement of pharmacognosy and botany ,DanyloHalytsky Lviv NtionalMedical Université Pikarska 69 97-010 Lviv, Ukrain « Hydra helix as a medicinal plant ».P.87.

