REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université YAHIA FARES de Médéa

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés et Environnement

Thèse de Doctorat en Sciences

Génie des Procédés
Option : Génie des procédés

Par
SABRI Nadjia

Thème :

Valorisation de la plante Hedera hélix dans l'élaboration d'une matière active à effet thérapeutique et développement de systèmes médicamenteux pour sa libération.

Devant le jury composé de :

S. LEFNAOUI	***MCA***	***Univ-Médéa***	***Présidente***
A. HADJSADOK	***PR***	***Univ-Blida***	***Examinateur***
H. BOUTOUMI	***PR***	***Univ-Blida***	***Examinateur***
N. MOULAI-MOSTEFA	***PR***	***Univ-Médéa***	***Directeur de thèse***
M. REBIHA	***MCB***	***Univ-Blida***	***Invitée***

Médéa, 2020

Remerciements

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur, N. MOULAI-MOSTEFA, Professeur à l'Université de Médéa, pour avoir dirigé cette thèse. Je le remercie pour m'avoir guidé et orienté pour la réalisation de ce travail, pour ses précieux conseils, ses encouragements et surtout sa compréhension. Je lui adresse mes plus sincères remerciements et mon profond respect.

Aux honorables membres de jury, je leur présente ma sincère gratitude pour bien vouloir siéger et évaluer mon travail.

Je remercie vivement Madame S. LEFNAOUI, Maitre de conférence A à l'Université de Médéa de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de thèse.

Je remercie respectueusement Messieurs A. HADJ SADOK (Professeur à l'Université de Blida 1) et H. BOUTOUMI (Professeur à l'Université de Blida 1) d'avoir accepté de faire partie du jury et, d'examiner le travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame M. REBIHA, Maitre de Conférences B à l'Université de Blida 1 pour ses encouragements et son aide précieuse pour les expériences de rhéologie et de formulation.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur A. AOUABED, Directeur du Laboratoire Analyse Fonctionnelle des Procédés Chimiques (Université de Blida 1) pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire pour la réalisation d'une partie de ce travail de recherche. Je remercie également l'équipe du laboratoire pour leur aide précieuse.

Mes remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse en particulier, A. BELAIDI et M. HADJIMI.

Je remercie également toutes mes amies pour leurs encouragements et conseils et, plus particulièrement Zoubida.

En fin un grand merci à ma famille pour leur soutien tout au long de ces années.

Je dédie ce travail à la mémoire de mon père, de ma mère et de mon très cher frère Mohammed. Comme je le dédie à ma petite famille (Samir,Neila,Dyna et Massyle) et à ma grande famille surtout ma très chère sœur Djamila pour tout ce qu'elle a fait pour moi.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS
RESUME
LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES
LISTE DES TABLEAUX
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS
INTRODUCTION GENERALE 1

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1Introduction 4
I.2 Généralités sur l'espèce végétale *Hedera Hélix* L 5
I.2.1 Description botanique 5
I.2.2 Distribution géographique 6
I.2.3 Caractéristiques 6
I.2.4 Propriétés thérapeutiques de l'*Hedera hélix* 8
I.2.5 Toxicité de l'*Hedera hélix* 8
I.2.6 Principaux métabolites secondaires isolés de l'*Hedera hélix* 8
I.2.7 Plante étudiée 9
I.2.7.1 Présentation de la plante 9
I.2.7.2 Caractéristiques phylogénétiques de la plante *Hedera hélix Algeriensis*
I.3Généralités sur les saponines 9
I.3.1 Introduction 10
I.3.2 Structure chimique des saponines 10
I.3.3 Génines stéroïdiques 10
I.3.3 Génines triterpéniques 11
I.3.4 Sources des saponines 12
I.3.5 Propriétés biologiques des saponines triterpéniques 12
I.3.6 Propriétés physico-chimiques des saponines triterpéniques 13
I.3.8 Applications des saponines triterpéniques 14
I.3.9 Méthodes d'extraction des saponines triterpéniques 14
I.3.10 Toxicité des saponines 16
I.4 Emulsions à base de saponines 16
I.5 Gels 17

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II.1 Matériels 19
II.1.1 Collection de la matière végétale 19
II.1.2 Produits chimiques 19
II.2 Méthodes de caractérisation de la matière végétale 19
II.2.1Détermination de la teneur en eau 19
II.2.2 Détermination des taux de cendres 19
II.2.3 Détermination de la teneur en lipides 20
II.2.4 Analyse des métaux lourds par spectroscopie d'absorption atomique 20
II.3 Méthodes d'extraction des saponines triterpéniques 20
II.3Méthodes d'extraction des saponines triterpéniques 20
II.3.1 Extraction par macération 20
II.3.2 Extraction par induction électromagnétique 20
II.3.3 Extraction assistée par micro-ondes 21
II.4 Purification, isolation et caractérisation des extraits 21
II.4.1Purification des extraits 21
II.4.2 Isolation des saponines triterpéniques par chromatographie flash 22
II.4.3 Analyses phytochimiques et biologiques des extraits 22
II.4.3.1 Balayage phytochimique 22
II.4.3.2 Analyse par chromatographie sur couche mince 23
II.4.3.3 Activité biologique 24
II.4.4 Analyses physicochimiques des extraits 25
II.4.4.1Analyse par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier 25
II.4.4.2 Analyse par résonance magnétique nucléaire 25
II.4.4.3 Analyse microscopique 25
II.4.4.4 Détermination de la concentration micellaire critique 25
II.4.4.5 Propriétés émulsifiantes 25
II.4.4.6 Capacité émulsifiante 26
II.4.4.7 Indice de crémage 26
II.5 Formulation et caractérisation des systèmes dispersés à base de saponines 26
II.5.1 Formulation des émulsions 26
II.5.2. Formulation d'un gel antibactérien 27
II.5.3 Méthodes de caractérisation 28

II.5.3.1Analyse rhéologique 28

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1 Introduction 31
III.2 Extraction et caractérisation des saponines à partir de l'*Hedera hélix* 31
III.2 Extraction et caractérisation des saponines à partir de l'*Hedera hélix* 31
III.2.1 Caractérisation des feuilles de l'*Hedera hélix* 31
III.2.1.1Teneur en eau 31
III.2.1.2 Analyses spectroscopiques des métaux 32
III.2.1.3 Balayage phytochimique 32
III.2.1.4 Caractéristiques organoleptiques des extraits 33
III.2.2Extraction des saponines 34
III.2.2.1 Effet du mode d'extraction sur le rendement 34
III.2.2.2 Influence du mode de chauffage sur le rendement d'extraction 36
III.2.3 Caractérisation des extraits de saponines 37
III.2.3.1 Solubilité 37
III.2.3.2 Balayage phytochimique 37
III.2.3.3 Elucidation structurale 38
III.2.4 Identification des saponines triterpéniques des extraits bruts 39 39
III.2.4.1 Chromatographie sur couche mince 39
III.2.4.2 Activité antibactérienne 40
III.2.4.3 Identification des saponines triterpéniques isolées par chromatographie flash 42
III.2.4.4 Analyse par résonnance magnétique nucléaire 44
III.2.4.5 Propriétés de surface des extraits de saponine triterpéniques 45
III.2.4.6 Propriétés émulsifiantes des extraits de saponines triterpéniques 46
III.2.4.7 Capacité d'émulsification des extraits de saponines triterpéniques 46
III.3 Formulation et caractérisation des émulsions à base de saponines 48
III.3.1 Morphologie des émulsions 48
III.3.2 Caractérisation rhéologique 48
III.3.3 Modélisation en surfaces de réponses 50
III.3.4 Effet des facteurs de formulation sur les propriétés des émulsions 54
III.3.4.1 Propriétés rhéologiques 54
III.3.4.2 Stabilité des émulsions 56

TABLE DES MATIERES

III.4 Formulation et caractérisation d'un gel antibactérien à base de saponines 56
III.4.1 Introduction 56
III.4.2 Optimisation de la concentration de xanthane pour la formulation du gel 57
III.4.3 Propriétés du gel antibactérien 61
III.4.3.1 pH du gel 61
III.4.3.2. Propriétés rhéologiques 61
III.4.3.3 Evaluation de l'activité antibactérienne 62
III.5 Conclusion 64
CONCLUSION GENERALE 66
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 68
ANNEXE 85

RESUMES

RESUME

ملخص

الهدف الرئيسي لهذه الدراسة هو البحث عن جزيئات من أصل نباتي من نوع الصابونينالنشطة بيولوجيا التي تنتمي الي التنوع البيولوجيالمتوسط.تقييم أوراق اللبلاب الجزائري يهدف إلى استخراجمادة حيوية نشطة علىشكل مسحوق جاف.و تستخدم هذه الاخيرة لأجل خصائصها السطحية لصياغة مستحلبات مستقرة(زيت/ ماء) و لأجل خصائصها البيولوجية لصياغة هلام مضاد للجراثيم.الاستخراج بمساعدة الميكروويف هو الطريقة المفضلة لاستخراج الصابونين ثلاثي التر بينيك من حيث المردود المتحصل عليه الأكبر ه و1.22٪ ووقت الاستخراج القصير المقدر ب 10 دقائق. الصابونيات المتحصل عليها تم تحديدها بواسطة الطرق الفيزيوكيميائية, الكروماتوغرافية و البيولوجية . وتستخدم الخصائص الريولوجية والمجهرية و مؤشر الكريمة لتقييم خصائص المستحلبات و الهلام المصاغ. خطة الخبرة استعملت من اجل جدولة التجارب. المواد المستخرجة من اوراق اللبلاب تعتبر كمستحلبات حيوية فعالة لصياغة مستحلبات مستقرة (زيت/ ماء). بينت نتائج التحليل المخبري ان الهلام النهائي المتحصل عليه مضاد للبكتيريا المسببة للأمراض (اشريشيا القولونية،بسودوموناز ايرجنوزا،المكورات العنقودية،عصيات) .

المفاتيح :الهيدرا الحلزونية,استخراج, الصابونين, مستحلبات, هلام , الريولوجيا

Résumé

L'objectif principal de cette étude est la recherche de molécules d'origine végétale principalement des saponines biologiquement actives issues de la biodiversité méditerranéenne. Ce travail consiste à valoriser les feuilles du lierre grimpant Algérien dont le but d'élaborer une matière active sous forme de poudre sèche. Cette dernière est utilisée pour ses propriétés émulsifiantes pour la formulation des émulsions (H/E) et pour ses propriétés biologiques pour la formulation d'un gel antibactérien. L'extraction assistée par micro-ondesa été trouvée comme la méthode de choix pour l'extraction des saponines triterpéniques en termes de meilleur rendement (1.22%) et court temps d'extraction (10min). Les extraits isolés ont été identifiées par des méthodes physico-chimiques, chromatographiques et biologiques. Les propriétés rhéologiques, microscopiques et l'estimation de l'indice de crémage ont été utilisées pour l'évaluation des propriétés des émulsions et du gel formulés. La démarche adoptée pour l'organisation des essais est basée sur les plans d'expériences. A l'issue de l'étude expérimentale, les principaux résultats obtenus ont montré que l'extrait du lierre grimpant est un bioémulsifiant efficace pour former des émulsions type H/E. L'analyse in-vitro a prouvé que le gel à base d'extrait du lierre possède une activité antibactérienne importante contre les bactéries de nature pathogène (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeroginosa*,*Staphylococcus spp* et *bacillusspp*).

Mots clés : Hedera hélix, Extraction, Saponines, Emulsion, Gel, Rhéologie.

RESUME

Abstract

The main objective of this study was primary the search for bioactive molecules from local plants. We focuse mainly biologically active saponins from Mediterranean biodiversity. This work consists in developing the leaves of the Algerian creeping ivy, the aim of which is to develop an active ingredient in the form of dry powder. The latter is used for its emulsifying properties for the formulation of emulsions (O / W) and for its biological properties for the formulation of an antibacterial gel. Microwave assisted extraction has been found to be the method of choice for the extraction of triterpene saponins in terms of best yield (1.22%) and short extraction time (10 min). The isolated extracts were identified by physico-chemical, chromatographic and biological methods. The rheological, microscopic, and creaming index estimation were used to assess the properties of the formulated emulsions and gel. The approach adopted for the organization of the tests is based on the experimental plans. At the end of the experimental study, the main results obtained showed that the climbing ivy extract is a bioemulsifier effective in forming O / W type emulsions. In vitro analysis has shown that the ivy extract gel has significant antibacterial activity against bacteria of a pathogenic nature (Escherichia coli, Pseudomonas aeroginosa, Staphylococcus spp and bacillusspp).

Keys words: *Hedera Helix*, Extraction, Saponins, Emulsion, Gels, Rheology.

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure I.1	Lierre grimpant	5
Figure I.2	Répartition géographique du lierre grimpant	6
Figure I.3	Feuilles de Lierre Grimpant	6
Figure I.4	Fleurs de Lierre grimpant	7
Figure I.5	Structure des saponines	11
Figure I.6	Principaux squelettes stéroïdiques	11
Figure I.7	Principaux saponines triterpéniques	12

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Figure III.1	Teneur en eau	31
Figure III.2	Effet du mode d'extraction sur le rendement	35
Figure III.3	Variation du rendement d'extraction par IEM	35
Figure III.4	Influence du mode de chauffage	36
Figure III.5	Photo d'extrait sec de saponine brute	37
Figure III.6	Spectre FT-IR des extraits bruts	38
Figure III.7	Détection des saponines triterpéniques par CCM	39
Figure III.8	Activité antibactérienne des extraits E1 et E2 (G N)	41
Figure III.9	Activité antibactérienne des extraits E1 et E2 (G P)	41
Figure III.10	CCM des fractions isolées	42
Figure III.11	FT-IR des fractions isolées	43
Figure III.12	Activité antibactérienne des fractions F2 et F4	43
Figure III.13	^{1} H NMR d'extrait partiellement purifié de saponine	44
Figure III.14	Variation de la TS	45
Figure III.15	Méthode qualitative d'oïl spearding	46
Figure III.16	Influence du rapport volumique (E/H) sur le volume de l'émulsion	47
Figure III.17	Photo microscopique de l'essai N°13	48
Figure III.18	Courbe d'écoulement de l'essai N°5	49

Figure III.19	Courbe de viscoélasticité de l'essai N°5	50
Figure III.20-A	Comparaison des valeurs prédites et observées (IC)	52
Figure III.20-B	Comparaison des valeurs prédites et observées (G'_0)	52
Figure III.20-C	Comparaison des valeurs prédites et observées (K)	53
Figure III.21	Effet des facteurs de formulation sur (G'_0)	55
Figure III.22	Effet des facteurs de formulation sur (K)	56
Figure III.23	Effet des facteurs de formulation sur (I-C)	57
Figure III.24	Variation du module de (G') et (G'') du gel de référence (T = 20 °C, F = 1 Hz.)	58
Figure III.25	Variation du G', GX et du gel de référence (T=20°C, F=1 Hz)	59
Figure III.26	Courbes d'écoulement des gels de GX et du gel de référence	60
Figure III.27	Courbe d'écoulement du gel formulé et du gel de référence	61
Figure III.28	Test de fréquence du gel final	62
Figure III.29	Variation de G' et G'' en fonction de la température	63

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Tableau II.1	Bactéries testées	24
Tableau II.2	Composition de l'émulsion	27
Tableau II.3	Formule du gel optimisée	28

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau III.1	Composition minérale des feuilles d'*Hedera hélix*	32
Tableau III.2	Screening phytochimique de *l'Hedera hélix*	33
Tableau III.3	Caractéristiques organoleptiques	33
Tableau III.4	Screening phytochimique	37
Tableau III.5	Activité antibactérienne des extraits bruts	40
Tableau III.6	Fractions principales après chromatographie flash	42
Tableau III.7	Capacité d'émulsification et stabilité de l'émulsion	47
Tableau III.8	Matrice de corrélation	50
Tableau III.9	Matrice d'expériences	51
Tableau III.10	Analyse de la variance (ANONA)	53
Tableau III.11	Paramètres rhéologiques de l'étude viscoélastique	59
Tableau III.12	Paramètres rhéologiques	60
Tableau III.13	Paramètres rhéologiques du modèle de Carreau	62
Tableau III.14	Résultats de l'activité antibactérienne in vitro	64

LISTE DES SYMBOLES& ABREVIATIONS

LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

GX	Gomme xanthane
G'	Module de conservation
G"	Module de perte
G'_0	Module de conservation au repos
G''_0	Module de perte au repos
γl	Point de gélification
IEM	Induction électromagnétique
EAM	Extraction assistée par micro-onde
CCM	Chromatographie sur couche mince
RMN	Résonance magnétique nucléaires
Rf	Facteur de rétention
FTIR	Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier
H/E	Huile dans Eau
CMC	Concentration Micellaire Critique
CE	Capacité d'émulsification
SE	Stabilité de l'émulsion
K	Temps de relaxation
η_0	Viscosité initiale
I-C	Indice de crémage
$\dot{\gamma}$ (s^{-1})	Vitesse de cisaillement
T (°C)	Température
γ (%)	Déformation
F (Hz)	Fréquence

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'Algérie est très connue par sa richesse et sa biodiversité disposant de plantes toxiques et médicinales dans les régions côtières, les hauts plateaux, les massifs montagneux, les steppes et les oasis sahariens. Sa flore comporte des milliers d'espèces végétales (on y trouve plus de 3000). Parmi ces ressources naturelles, les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différentes industries, alimentaire, conserverie, pharmaceutique, phytothérapieet comme matières pour la recherche scientifique[1].L'étude de la chimie des plantes malgré son ancienneté est toujours d'une brulante actualité vue 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 ont recours aux plantes médicinales pour leurs soins primaires par manques d'accès aux médicaments prescrits et aussi parce que les plantes médicinales ont démontré une réelle efficacité [3].La fortedemande des consommateurs sur les produits naturels a rendu la valorisation des plantes médicinales d'une nécessité absolue où les substances bioactives sont devenues une alternative pour les matières premières synthétiques qui causent des effets néfastes pour l'environnement et la santé humaine.

Dans ce contexte on s'est intéressé à la plante *Hedera hélix* connue sous l'appellation de lierre grimpant. C'est une plante médicinale qui se trouve en abondance en Algérie et qui ne nécessite pas un traitement particulier pour pousser.

L'*Hedera hélix* est une plante éternelle qui appartient à la famille des Araliacées.C'est une plante résistante qui se développe de 30 à 40 cm chaque année; ces branches mesurent entre 10 à 15 m [4,5]. Elle est distribuée naturellement en Asie, en Europe et en Afrique mais actuellement elle est cultivée dans le monde entier [6]. Cette plante est très riche en substances bioactives à savoir les saponines triterpéniques, les flavonoïdes, les stérols, les acides phénoliques et les dérivés de falcarinol [7,8]. Elle possède des activités vasoconstrictrices, anti-inflammatoires, antispasmodiques, expectorantes et antibactériennes [9] d'où son utilisation pour le traitement de différentes maladies [10], comme l'hypertension, le cancer, et les brulures. Le responsable majeur de ces activités biologiques est la saponine.

Les saponines sont des métabolites hétérosidiques [11], présents dans de nombreuses plantes et quelques organismes marins [12] où ils auraient un rôle de défensecontre des agents extérieurs comme les champignons, les bactéries et les autres insectes [13,14].

Leur nom provient du latin "sapo" signifiant "savon" en raison deleurs propriétés à former des solutions moussantes [15]. Structurellement, les saponines sont classées en deux grands groupes selon la nature de leurs génines. Par ailleurs, les saponines triterpéniques sont les plus nombreuses et sont présentes dans les angiospermes dicotylédones et quelques organismes marins et les saponines stéroïdiques sont présentes quant à elles dans les angiospermes monocotylédones [13]. Elles sont utilisées pour leurs propriétés biologiques et leurs propriétés de surfaces [16-19].

Généralement, les saponines sont extraites à partir des plantes médicinales par différentes techniques conventionnelles [20,21]. De nos jours, de nouvelles technologies sont offertes à savoir l'extraction par fluide supercritique, l'extraction à ultra-haute pression et l'extraction assistée par micro-ondes [22]. L'importance des saponines par rapport à leurs propriétés pharmaceutiques conduit à l'invention de nouvelles méthodes d'extractions afin d'obtenir un rendement élevé avec un minimum de coût (quantité de solvant, énergie et temps d'extraction). L'extraction assistée par micro-ondes (EAM) est une nouvelle technique utilisée pour l'extraction des substances bioactives notamment les saponines triterpéniques ; elle combine l'utilisation des microondes et d'autres méthodes traditionnelles. Récemment, cette technique (EAM) a attiré l'attention des industriels et des chercheurs pour les avantages qu'elle procure, comme le court temps d'extraction, la quantité minimale de solvant d'extraction et aussi le mécanisme de chauffage [23]. C'est la méthode de choix pour l'extraction des saponines en termes de meilleur rendementet court temps d'extraction [24-27].

Les saponines sont couramment utilisées pour formuler des émulsions huile dans eau en s'adsorbant à l'interface huile/eau tout en réduisant la tension interfaciale et superficielle et en empêchant ainsi la rupture des gouttelettes huileuses [28]. Les saponines adsorbées fournissent une couche protectrice autour des gouttelettes, ce qui empêche leur agrégation et améliore la stabilité des émulsions [29]. Leurs utilisations dans le domaine pharmaceutique a été normalisée par la monographie allemande et plusieurs formulations médicinales contenant l'extrait d'*Hedera hélix*sont disponibles [30,31]. Elles sont aussi exploitées en cosmétique particulièrement pour la formulation des shampoings, des lotions et des crèmes[32].

À la lumière des bienfaits thérapeutiques du lierre grimpant (*Hedera hélix)*, l'objectif visé par cette étude est de valoriser les feuilles de cette plante, appartenant à la flore algérienne,pour extraire une matière active qui sera utilisée par la suite dans le développement d'une formulation pharmaceutique.

Ce travail s'est déroulé en deux grandes étapes.

La première étape consiste en l'optimisation d'une méthode d'extraction des saponines en utilisant la macération comme technique d'extraction conventionnelle ainsi que de nouvelles techniques vertes comme l'induction électromagnétique (IEM) et l'extraction assistée par micro-ondes (EAM). Les techniques d'analyses chromatographiques et spectroscopiques ont été utilisées pour l'identification et le dosage de la matière active.

La seconde étape consiste en l'exploitation des propriétés tensioactiveet antibactérienne de l'extrait du lierre grimpant par la formulation d'une émulsion-huile-dans-eau (H/E) et celle d'un gel antibactérien. Par ailleurs, les caractéristiques biologiques et rhéologiques ont été exploitées dans le développement des formulationsstables.

Ce manuscrit a été structuré comme suit :

Dans le premier chapitre, on présente des généralités sur la plante Hedera hélix ainsi que la matière active isolée, ainsi qu'un aperçu sur les travaux antérieurs sur les saponines triterpéniques.

Le second chapitre est consacré aux protocoles expérimentaux, les différentes techniques d'analyses utilisées et la formulation des émulsions et des gels.

Le troisième chapitre est réservé aux discussions des résultats obtenus. On présente les résultats des différentes méthodes d'extraction utilisées, la caractérisation physicochimique et chromatographique des extraits obtenus,l'élaboration des émulsions à base de la matière active extraite, la formulation d'un gel antibactérien à base de xanthane et la caractérisation des systèmes développés par des méthodes rhéologiques et biologiques.

Ce manuscrit est achevé par une conclusion générale sur les principaux résultats obtenus dans ce travail de recherche ainsi que les perspectives pour son développement.

CHAPITRE I

I.1 Introduction

Les plantes relevant de la famille des Araliacées ont fait l'objet d'intenses investigations chimiques. Ces recherches ont permis de mettre en évidence un nombre important de métabolites secondaires aux diverses activités biologiques comme les flavonoïdes, les saponines stéroïdiques et triterpéniques, et par conséquent un grand nombre de travaux expérimentaux ont été réalisés sur l'extraction, l'isolation et l'identification des saponines.

L'*hedera hélix* est une plante très riche en saponines, alpha-hederine, beta-hederine, gama-hederine et Hedera-saponine [33]. Les recherches de Tucker et al. [34] ont montré la présence d'autres composés terpéniques comme les mono- terpènes et sesquiterpènes (alpha-pinène, beta-pinène, limonène et sabinene). Plusieurs travaux [35-37] ont identifié la présence des acides (rosmarinique, caffeinique), des composés phénoliques, des flavonoïdes (kaempferol, rutin…) et des alkaloides dans l'*Hedera hélix.* Par ailleurs, Chichiriccoet al. [38] ont montré que l'*Hedera hélix* est une plante médicinale utilisée pour traiter plusieurs maladies humaines et animales et présente des activités biologiques importantes. Grishkovetset al. [39] ont séparé 13 triterpènes glycosides des feuilles de lierre grimpant Algérien. Une autre étude réalisée par Grishkovets et al. [40] sur l'espèce *Hedera hélix*, a mis en évidence 11 triterpénes glycosides. Crespin et al. [41] ont identifié par chromatographie en phase liquide à haute performance la présence de α-hederine et hederacoside C dans les feuilles de l'*Hedera hélix*. Ainsi, l'étude chimique d'Elias et al. [42] sur l'extrait butanolique de l'*Hedera hélix* a abouti à l'isolation et la caractérisation de α-hederine et hederacoside C par chromatographie à basse pression. Haeberlein et al. [43] ont démontré récemment que les propriétés sécrétoires et bronchodilateures de l'*Hedera hélix* sont dues à la présence de saponines qu'elles contiennent, particulièrement l'alpha-hédérine. Fazioet al. [44] ont étudié un sirop contenant l'extrait sec de feuilles de lierre ; cet extrait contient un mélange de plusieurs substances, les triterpénes saponines et comme constituant prépondérant l'hederacoside C. Ces chercheurs ont démontré que l'extrait sec de feuilles de lierre est efficace et il est bien toléré chez les patients présentant une bronchite pulmonaire. Wagner et Reger [45] ont découvert que les vraies saponines de l'*Hedera hélix* sont l'héderacoside C, l'héderacoside B, l'alpha-héderine et l'héderasaponine. La quantité des saponines qui se trouve dans les feuilles sèches de l'*Hedera hélix* est entre 25 à 57mg/g avec l'héderacoside C comme constituant majoritaire (supérieur à 48mg/g). Selon Mayer [46], c'est la quantité maximale de saponine qui se trouve dans les fruits de l'*Hedera hélix*.

Suleyman et al. [47] ont testé l'effet anti-inflammatoire de l'extrait brut et purifié des saponines de l'Hedera hélix chez les rats ; ils ont démontré que l'extrait brut a plus d'efficacité à la dose de 100 et 200 mg/kg de poids corporel. Une étude menée par Hansel et al. [48] a démontré que les composés biologiquement actifs de la plante *Hedera hélix* sont les saponines triterpéniques (2.5-6%): glycosides bidesmosidique ; hederacosideC(1.7-4.8%), hederacoside D (0.4-0.8%), hederacoside B (0.1-0.2%) et monodesmosidique α-hederin (0.1-0.3%).

I.2Généralités sur l'espèce végétale *Hedera Hélix L*

I.2.1 Description botanique

Le lierre (Fig. I.1) est une liane ligneuse verte, il grimpe en s'attachant sur les arbres ou les murs à l'aide de racines crampons de taille indéfinie qui peut atteindre 30 m [33] ; il pousse jusqu'à 1200 m d'altitude, dans les bois, les haies et les rochers, affectionnant les zones ombragées [34]. Il présente différents noms vernaculaires : Lewaye (Algérie), Lierre Grimpant (France), Ivy (Angletaire), Adafar (Berbère), Edera (Italie), Efeu (Allemagne).



Figure I.1. Lierre grimpant

I.2.2 Distribution géographique

Le lierre grimpant est une plante originaire d'Europe occidentale, centrale et du sud. Il est très répandu dans le monde entier, il pousse aussi en Asie, en Afrique et en Amérique (Fig. I.2). En Algérie, le Lierre est une plante fréquente dans tous les régions du pays sauf dans les régions arides.



Figure I.2. Répartition géographique du lierre grimpant

I.2.3 Caractéristiques

Les feuilles de la plante sont alternes, persistantes, rigides, luisantes de couleurs vertsfoncées (Fig.I.3). Elles produisent des métabolistes secondaires, qui renferment principalement des saponines triterpéniques, des glucosides flavonoïques et des acides phénoliques [35].



Figure I.3. Feuilles de Lierre Grimpant

Les fleurs de lierre sont de couleurjaune-verdâtre ; elles possèdent cinq pétales disposées en petites ombelles terminales simples, assez denses et de forme globuleuse (Fig. I.4).



Figure I.4. Fleurs de Lierre grimpant

Les fruits du lierre sont des baies globuleuses noires ou jaunes, cerclées vers le sommet par le limbe du calice, avec 2 à 5 noyaux distincts [36].La floraison du lierre débute en automne avec apparition des fruits au printemps. Le nom scientifique du lierre grimpant *Hedera hélix L* vient du latin *Header* qui veut dire s'attacher et*Hélix* signifie spirale. Sa classification systématique est comme suit [33] :

- Règne : Végétal
- Embranchement : Spermaphytes
- Sous- Embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous classe : Dialypetale
- Série : Caliciflores
- Ordre : Ombelleles
- Famille : Araliaceas
- Genre : *Hedera*
- Espèce : *Hedera hélix*

I.2.4 Propriétés thérapeutiques de l'*Hedera hélix*

La plante *Hedera hélix* offre de nombreuses vertus curatives depuis l'antiquité et demeure encore utilisé par la phytothérapie contemporaine ainsi que par l'industrie cosmétique [37].Elle est utilisée pour ses propriétés antispasmodiques, respiratoires, dépuratives et excitantes. Elle était de plus connue pour faciliter la menstruation. Elle était ainsi supposée traiter, par voie orale, la coqueluche, la bronchite chronique, les trachéites, les laryngites, les rhumatismes, la lithiase biliaire, les leucorrhées et l'hypertension [38]. La technique de préparation variait selon les régions et les indications [38]. Les feuilles de lierre étaient également utilisées en application cutanée pour guérir les névralgies, les rhumatismes, les névrites, les séquelles de phlébite, les plaies, les brûlures, les cors, et les polypes du nez. Actuellement, le lierre est utilisé dans la préparation des produits cosmétiques (crèmes amincissantes, lotions pour cheveux, shampooings), et la préparation des médicaments tels que les expectorants [39]. L'extrait de lierre grimpant est largement reconnu pour son action bienfaisante sur l'inflammation des bronches et la toux. Il contient plusieurs substances végétales pouvant expliquer son effet sur le réflexe de la toux, mais ses saponines antispasmodiques, semblent y contribuer en grande partie.

I.2.5 Toxicité de l'*Hedera hélix*

Toutes les parties de la plante *Hedera hélix* sont toxiques, c'est un végétal à double tranchant. Les signes irritatifs sont représentés par une sensation de brûlure dans la bouche, une hyper salivation, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales et une diarrhée [40]. En cas de contact cutané, une dermatite de contact peut apparaître avec une réaction œdémateuse. Des lésions Eczématiformes peuvent survenir au niveau des zones en contact avec la plante, avec une rougeur [41]. Des lésions irritatives ou eczémateuses surviennent le plus souvent lors de l'élagage du lierre. Des manifestations allergiques peuvent survenir chez des personnes antérieurement sensibilisées au lierre lors de l'utilisation des lotions cosmétiques ou des médicaments.

I.2.6 Principaux métabolites secondaires isolés de l'*Hedera hélix*

L'extrait de la plante *Hedera hélix* contient diverses substances bioactives à savoir les saponines, flavonoïdes, stérols, acides phénoliques et les dérivés du falcarinol [42]. Les constituants les plus importants sont les saponines triterpéniques (2.5-6%).

I.2.7 Plante étudiée

I.2.7.1 Présentation de la plante

La plante étudiée est connue sous l'appellation *Hedera Algeriensis,*c'est une espèce végétale du lierre grimpant vert d'origine de la côte nord-africaine [43]. *Hedera Algeriensis* est synonyme de *Hedera canariensis* [44],et *Hedera canariensisvar Algeriensis* [45]. Sa classification systématique est comme suit [46] :

- Règne : Plantae
- Sous règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous classe : Rosidae
- Ordre : Apiales
- Famille : Araliaceas
- Genre : *Hedera*
- Espèce : *Hedera Algeriensis*

La plante fertile d'*Hedera Algeriensis* possède des tiges caractérisées par des fins filaments rougeâtres écaillés [45], elles peuvent atteindre jusqu'à 30 m de longueur [47]. Les feuilles d'*Hedera Hélix Algeriensis* sont alternées, légèrement lobées (3-5) de taille 5-7 mm, de couleur vert- jaunâtre qui se développe seulement sur les terminaisons [47-49]. Les fruits sont des baies sphériques de couleur noirâtre, portant 3-5 graines. Les graines sont de taille de 6mm [50].

I.2.7.2 Caractéristiques phylogénétiques de la plante *Hedera hélix Algeriensis*

Les relations phylogénétiques de la plante d'*Hedera* ont été récemment évaluées suite aux travaux de Vargas et al. [51], en utilisant des séquences de la région de l'ADN nucléaire ribosomal (nr) DNA appelée la région de l'éspaceur interne transcrit (internal transcribed spacer ainsi que les travaux de Ackerfield et Wen [50], qui ont aussi utilisé l'ADN chloroplastique (CP- DNA).

La comparaison des deux données (l'ADN (ITS) et l'ADN (CP)) supporte l'idée que l'allopolyploïdie est importante dans la détermination de la plante d'*Hedera*. Selon les travaux d'Ackerfield et Wen [50], l'espèce *H. Algeriensis* est une espèce de la plante *Hedera* tétraploïde de formule chromosomique 2n=96 (X4).

I.3Généralités sur les saponines

I.3.1 Introduction

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques, présentes dans plus de 500 espèces de plantes et quelques organismes marins [52-54].

Leur nom provient du latin sapo signifiant « savon » pour leurs propriétés à former des solutions moussantes [55, 56]. Ces substances sont constituées d'une partie lipophile appelée génine ou aglycone et d'une partie hydrophile osidique, cette dualité leur donne une activité tensioactive importante ; ils sont classées sur la base de la nature de leurs génine (triterpéniques ou stéroïdiques) et le nombre de chaines glucidiques liées à l'aglycone [57].

Les saponines présentes dans les feuilles de la plante *Hedera hélix* sont de type triterpénique et leurs propriétés varient selon l'origine et la procédure d'extraction [58,59]. Ce sont des surfactants naturels qui possèdent en plus des propriétés de surface importantes, des propriétés biologiques très intéressantes, antimicrobienne, anti-inflammatoire, insecticide et anti-brulure [18,13].

Ainsi, une forte demande par les consommateurs sur les produits naturels dotés de propriétés biologiques a rendu les saponines des composés commercialement recherchés avec une large application dans les domaines alimentaire, pharmaceutique et cosmétique [22,23].

I.3.2Structure chimique des saponines

Les saponines se classent en deux groupes (Fig. I.5) selon la nature de leur génine : les saponines à génine stéroïdiques à 27 atomes de carbones et les saponines triterpéniques à 30 atomes de carbones. Lorsque la génine est substituée par une seule chaîne osidique, les saponines sont dites monodesmosidiques et lorsque la génine est substituée par deux chaînes osidiques, on parle de saponines bidesmosidiques [37].

La chaine glucidique peut comporter de une à huit unités monosaccharidiques. Les oses constitutifs des saponines sont D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, D-xylose, D-fructose et acide D-glucuronique [37].

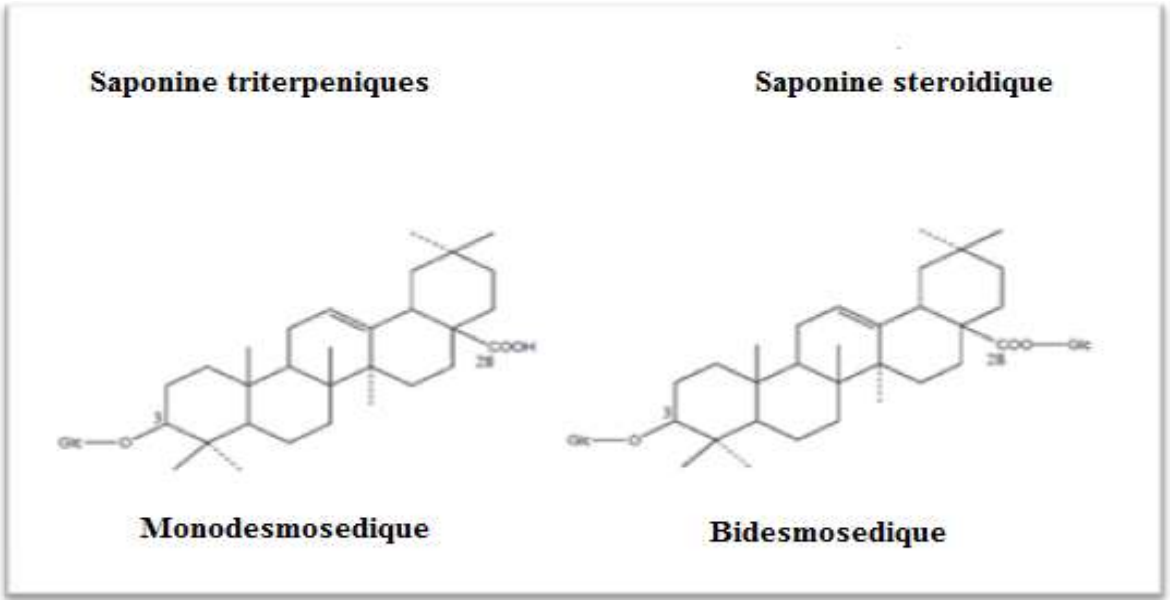


Figure I.5. Structure des saponines

I.3.3Géninesstéroïdiques

Les saponines stéroïdiques sont souvent présentes chez les plantes à fleurs monocotylédones et rarement chez les dicotylédones, leur génine est constituée de 27 atomes de carbones. Ils existent deux principaux types : hexacyclique (spirostane) et pentacyclique (furostane) comme le montre la Fig.I.6.

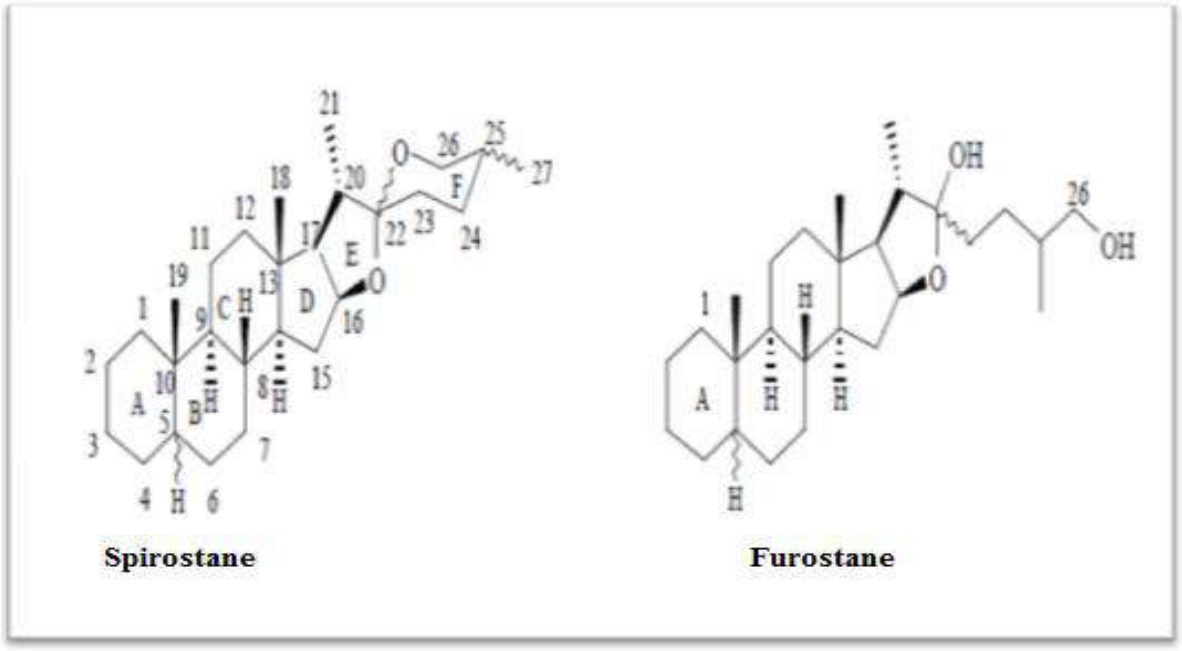


Figure I.6. Principaux squelettes stéroïdiques

I.3.3 Génines triterpéniques

Les saponines triterpéniques sont présentes chez les angiospermes dicotylédones et quelques organismes marins, leur génine est constituée de 30 atomes de carbones. Ils existent deux principaux types : tétracycliques (dammarane, cucurbitane et lanostane) et pentacycliques(oléanane, ursane, lupane, fridelane et hopane) comme illustré dans la Fig.I.7.

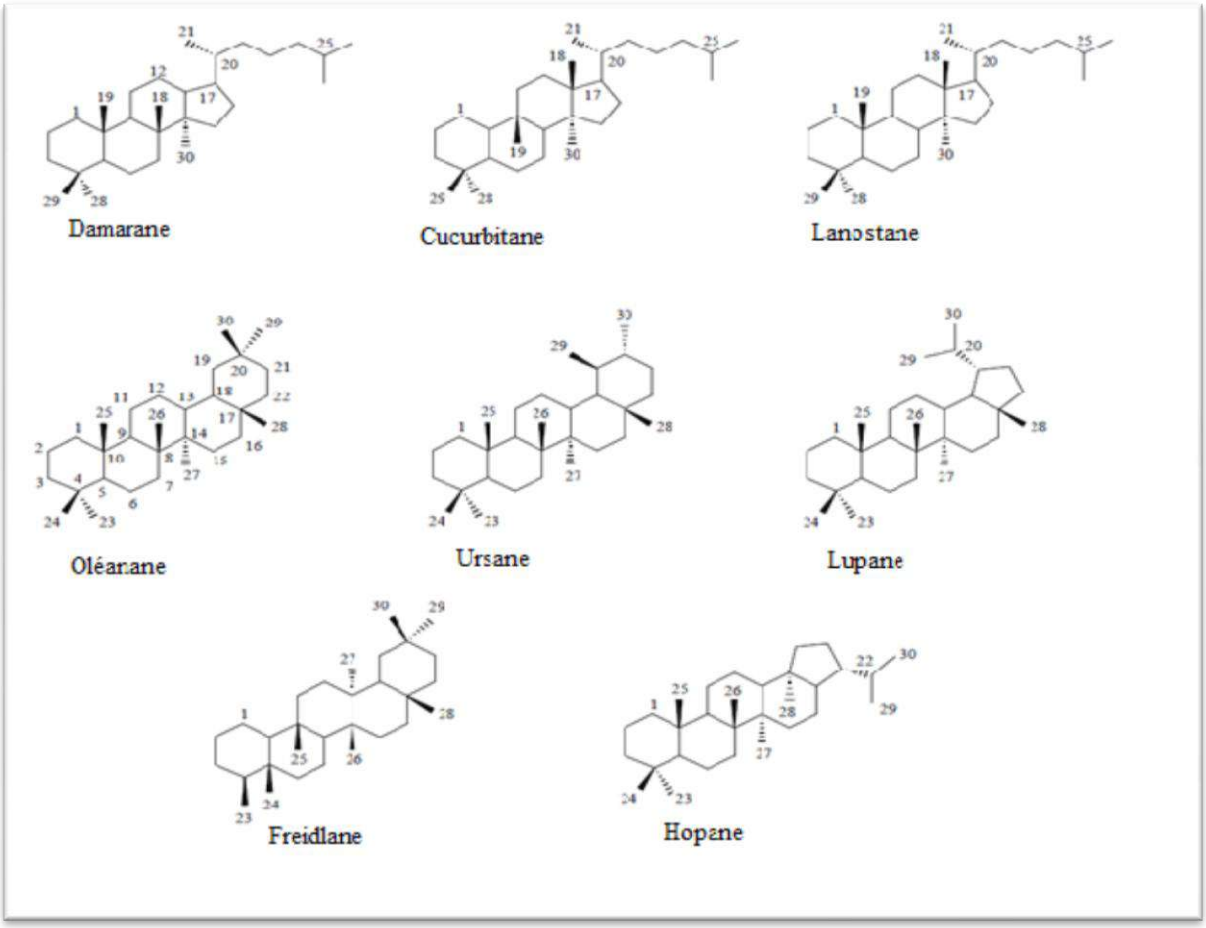


Figure I.7. Principaux saponines triterpéniques

I.3.4 Sources des saponines

Les saponines sont principalement dérivées des plantes végétales [54,52] mais on les trouve aussi dans les concombres et les étoiles de mer [60,61]. D'après certaines recherches publiées dans la littérature [62-65],la plante la plus riche en saponines est le Ginseng. D'autres plantes végétales renferment les saponines comme le soja [66],la betterave de sucre [67], les pois chiches [68], l'asperge [69],la fraise, et les fruits de prune [70]. Selon certains auteurs [71,72], les racines de la plante Medicagotruncatula et d'Allium nigrum L. sont très riches en saponines par rapport aux autres parties de la plante. Cependant, les feuilles des plantes de la variété Swithchgrass possèdent des quantités élevées de saponines [73].

I.3.5 Propriétés biologiques des saponines triterpéniques

Les saponines extraites des plantes ont des propriétés pharmacologiques et biologiques très intéressantes en raison de leur utilisation dans des domaines variés (pharmacie, alimentaires et médical). Récemment, plusieurs études se sont focalisées sur la capacité des saponines à augmenter la réponse immunitaire [82-85],l'activité antibactérienne [86-87],antioxydante, [88, 89],anticancéreuse [90,91],antidiabétique et anti-obésité[92,93], ainsi que leur capacité de lyser les érythrocytes [94]. Les propriétés hémolytiques sont généralement attribuées à l'interaction entre les saponines et les stérols de la membrane érythrocytaire qui cause son éclatement, entraînant une augmentation dans la perméabilité et une perte d'hémoglobine [54]. Toutefois, la forte activité hémolytique de la plupart des saponines a freiné considérablement leur développement clinique en raison de leur toxicité potentielle sous la forme d'injections intraveineuses. Le niveau de l'activité hémolytique est attribué au type d'aglycone et aux glucides des chaînes latérales. Sept structures consécutives de saponines dérivées à partir de la plante *Platycodongrandiflorum* possèdent des activités hémolytiques [84]. D'autres travaux [85,83] révèlent que les fractions de saponines extraites à partir des graines de la plante *Chenopodium quinoa* et de la plante *Bupleurumchinense* augmentent l'activité hémolytique [86]. Par ailleurs, la fraction méthanolique riche en saponine extraite de la gomme de guar exhibe une activité antibactérienne contre les bactéries *Staphylococcus aureus, Salmonella Typhimurium* et *Escherichia coli*. Les saponines des racines de la plate de la plante*A. nigrum L.* possèdent une activité antifongique significative [72].

Par ailleurs, les saponines isolées de graines de *Capsicumannum L* montrent une activité antimicrobienne contre les levures [76]. Aussi, les saponines renferment des propriétés anti-oxydantes, anti-cancer, anti-thrombique, anti-inflammatoire et anti-ulcère.

I.3.6 Propriétés physico-chimiques des saponines triterpéniques

Les saponines possèdent des propriétés physicochimiques intéressantes à cause de leur structure complexe. Les saponines sont des tensioactifs avec des propriétés détergentes, mouillantes, émulsifiantes et moussantesen raison de la présence de la partie aglycone (soluble dans les lipides) et la partie osidique (soluble dans l'eau) dans leur squelette. Dans une solution aqueuse les surfactants forment des micelles au-delà de la concentration micellaire critique (CMC).

Les propriétés des micelles formées sont influencées par la température, la concentration du sel et le pH de la phase aqueuse [95].

I.3.8 Applications des saponines triterpéniques

Les saponines sont exploitées pour leurs diverses propriétés physico-chimiques et biologiques dans plusieurs applications commerciales à savoir l'industrie alimentaire, cosmétique, agriculture et pharmaceutique. Ces dernières années, une forte demande pour les saponines a été constatée à cause de leurs propriétés biologiques incontestables.

En tant que surfactant naturel non ionique, les saponines sont utilisées comme des émulsifiants, des détergents et des produits moussants. Elles sont aussi utilisées comme additifs alimentaires,régulateurs de croissance végétale et produits pour la remédiation de sols pollués.Les sources commerciales majeures des saponines sont les extraits de la plante Quillaja saponaria et Yucca schidigera. D'autres plantes végétales sont aussi utilisées comme le marron d'inde, le lierre grimpant, les grains de thé et soja.

En industrie pharmaceutique les saponines sont utilisées comme matières premières pour la production des hormones, des adjuvants immunologiques et comme principes actifs.

I.3.9 Méthodes d'extraction des saponines triterpéniques

Plusieurs techniques d'extraction des saponines à partir des plantes médicinales sont évoquées dans la littérature [96,97]. Ces méthodes sont classées en deux catégories, les techniques conventionnelles et les techniques de la chimie verte.

Parmi les techniques conventionnelles, on peut citer la macération, l'extraction par Soxhlet et l'extraction à reflux[98,99]. Cependant, les techniques vertes sont particulièrement l'extraction à ultra-haute pression (UPE), l'extraction assistée par micro-ondes (EAM), l'extraction assistée par ultrasons (EAU), l'extraction par fluide supercritique (EFS) [97,100,101].

L'importance des saponines par rapport à leurs propriétés pharmaceutiques a conduit ces dernières années à l'émergence de nouvelles méthodes d'extractionou bien à l'amélioration des méthodes existantes tout en augmentant le rendement et en réduisant le coût (quantité de solvant, énergie et temps d'extraction). L'extraction par induction magnétique est l'une des méthodes qui répond à ces critères ; elle a été adaptée pour l'extraction des métabolites secondaires [102]. C'est une méthode simple, rapide et efficace.

I.3.9.1 Extraction par induction magnétique

Le chauffage par induction est une technique électrochimique permettant de chauffer des matériaux conducteurs d'électricité sans contact matériel avec une source électrique [103].

Les principaux avantages de cette méthode sont :

- La rapidité de chauffe et la très faible inertie thermique,
- Un rendement énergétique élevé 70 à 90%,
- Une forte densité de puissance,
- Un chauffage bien réparti sur une grande surface,
- Une large place de régulât de puissance,
- Une possibilité de régulation fine de la température par zone indépendantes,
- La sécurité et le confort accrus pour l'utilisateur grâce aux supports des récipients qui restent à des températures modérées.

I.3.9.2 Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes (EAM) est une technique moderne, elle combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques non ionisantes avec une gamme de fréquence entre 0.3 et 300 GHz [27]. Récemment, cette technique (EAM) a été utilisée pour l'extraction des substances bioactives de la matière végétale pour son court temps d'extraction, sa quantité minime de solvant d'extraction et aussi de son spécial mécanisme de chauffage[28,30].

Les micro-ondes pénètrent dans les biomatériaux et génèrent de la chaleur en interagissant avec les molécules polaires telle que l'eau. La profondeur de pénétration des micro-ondes dans la matrice dépend de la température, du taux d'humidité et de la fréquence du champ électrique.

L'efficacité de l'EAM est reliée à l'effet des micro-ondes sur le solvant d'extraction et de la structure cellulaire de la matrice [104]. L'EAM est la méthode de choix pour l'extraction des saponines en termes de meilleur rendement et court temps d'extraction [28].

I.3.9.3 Extraction assistée par ultrasons

Extraction assistée par ultrasons est une technique apparue en 1950 à l'échelle de laboratoire dédiée pour l'extraction des substances bioactives à intérêt thérapeutique. La matière végétale est immergée dans le solvant d'extraction sous ultrasons. Ces derniers dénaturent les parois cellulaires et libèrent ainsi les composés bioactifs. Néanmoins, peu de travaux ont cité l'utilisation de cette technique pour l'extraction de saponines.

I.3.9.4 Extraction accélérée par solvant

C'est une technique d'extraction rapide automatisée qui utilise des quantités de solvant minime à pression et température élevées. Ces conditions améliorent le transfert et la solubilité du soluté dans le solvant d'extraction sans atteindre son point d'ébullition.

Cette technique est largement utilisée dans le domaine pharmaceutique et alimentaire. L'efficacité de cette technique pour l'extraction des saponines a été prouvée.

I.3.9.5 Extraction par fluide supercritique

C'est une technique alternative dont le but de réduire l'utilisation des solvants organiques et d'augmenter le rendement d'extraction. Le liquide supercritique peut dissoudre une large variété de composés organiques qui permet l'obtention d'un principe actif pur.

I.3.10 Toxicité des saponines

Les saponines présentent différents spectres de toxicité des applications parentérale ou intraveineuse (DL50 0 .7-50 mg/Kg). L'action hémolytique de certaines saponines empêche leur administration intraveineuse. La détoxication par formation de complexe avec le sérum de cholestérol, l'albumine et autres constituants du plasma réduit cet effet. La toxicité des saponines dépend du mode d'administration, de la source, de la composition et de la concentration.

I.4 Emulsions à base de saponines

Les émulsions sont des systèmes hétérogènes et métastables comportant au moins un liquide non miscible dispersé dans un autre sous forme de gouttelettes. Elles sont employées pendant des siècles dans différents domaines comme l'industrie cosmétique, pharmaceutique et alimentaire.

Les émulsions sont couramment utilisées dans notre quotidien comme produits finis d'usage courant (crème, pommade, shampooing, peinture, mayonnaise, vinaigrette). De tels systèmes possèdent une stabilité minimale qui peut être renforcé par l'ajout d'agents appropriés tels que les surfactants et les polymères.

Il existe deux types d'émulsions : simples et multiples. Les émulsions simples sont constituées d'une phase dispersée dans une phase continue, et sont de type huile-dans-eau (H/E) ou eau-dans-huile (E/H) ; les émulsions multiples, quant à elles, consistent en une émulsion simple dispersée à son tour dans une phase continue externe. Elles sont alors du type E/H/E ou H/E/H.

Les émulsions sont généralement stabilisées par des surfactants amphiphiles adsorbés à la surface entre l'huile et l'eau. Ils assurent deux principales fonctions ; réduire la tension interfaciale et diminuer le taux de coalescence des gouttelettes d'huile par la formation d'une barrière physique, stérique ou électrique autour des gouttelettes d'huile.

Les saponines sont utilisées comme surfactants dans la préparation des émulsions employées dans diverses industries, cosmétique, pharmaceutique et alimentaire. De nombreux travaux évoquent leurs utilisationsdans la formulation d'émulsions. Selon Mitra et al. [95] et Waller et al. [19,105], les écorces de l'arbre de *Quillaja saponaria Molina* possèdent un ingrédient capable de former des micelles et stabiliser des émulsions huile-dans-eau. Le responsable majeur de ces propriétés est la saponine. Van Setten et al. [106] et Ying Yang et al. [107] ont également étudié l'efficacité des saponines extraites de Quillaja saponaria *Molina* à stabiliser des émulsions huile dans eau. De Faria et al. [108] ont étudié les propriétés émulsifiantes d'un mélange de saponine extrait des écorces de*Quillaja* et de β-lactoglobuline et ont conclu que ce dernier forme une émulsion polydispersée avec une bonne distribution granulométrique des gouttelettes.

I.5 Gels

Les gels sont des réseaux tridimensionnels constitués par une faible quantité entre 0.1 et 10%d'une substance dans laquelle l'eau ou un autre solvant est retenu.

L'utilisation des gels est très répandue dans différentes industries (cosmétique, alimentaire), et spécialement dans le domaine biomédical. Par conséquent, la formulation d'un gel biocompatible et biodégradable avec de bonnes propriétés biologiques et rhéologiques est largement demandée ces dernières années.

Les gels sont classés selon les interactions qui existent au sein du milieu en deux catégories : les gels réversibles (non permanents) où les nœuds de réticulation sont des associations intermoléculaires dues à des liaisons faibles réversibles conduisent à la formation de zones de jonction ayant une structure plus au moins ordonnée et les gels irréversibles (permanents) qui sont produits par des liaisons covalentes [118].

La majorité des gels destinés au lavage des mains disponibles sur le marché sont à base de produits chimiques synthétiques [119] qui possèdent des effets secondaires (sécheresse de la peau). Pour cela, des recherches intensives sur les gels à base de plantes médicinales ont été développées ces dernières décennies afin de minimiser l'utilisation des substances synthétiques néfastes à la santé humaine et à l'environnement.

Plusieurs variétés de plantes sont utilisées pour la formulation des gels pour leurs avantages par rapport à la simplicité de formulation et d'application et leurs coûts relativement bas.Ainsi, plusieurs types de plantes ont été utilisés pour leurs propriétés médicinales dans la formulation de gels pour les mains.

Le basilic tulsi (*Ocimumsantum*) est utilisé pour son activité antibactérienne [120,121], l'aloevera comme antiseptique [122]. Le *sapindusmukorossi* est une plante très connue en inde ; il est utilisé pour la formulation du shampoing ayurvédique en raison de ses propriétés détergentes et de son efficacité de conservation à long terme [123]. D'autre part, l'azardichtaindica possède un large spectre d'activité antibactérienne [124].

Le lierre grimpant est également une plante médicinale utilisé pour ses différentes vertus thérapeutiques y compris l'activité antibactérienne, antifongique, anti-brulure et antioxydante. Cependant, les gels à base de saponines extraites du lierre grimpant n'ont jamais été étudié jusqu'à ce jour. C'est la raison pour laquelle on s'est intéressé dans ce travail au développement d'un gel antibactérien dont le principe actif est extrait du lierre grimpant appartenant à la flore algérienne.

CHAPITRE
II

II.1 Matériels

II.1.1 Collection de la matière végétale

La plante de *l'Hedera hélix* a été collectée en Algérie (région de Blida) au mois de novembre 2012. Les feuilles collectées ont été séchées à l'abri de la lumière pendant 15 jours à température ambiante et dans un endroit aéré pour éviter la photo-oxydation des substances chimiques et le développement des champignons. Les feuilles séchées ont été broyées en fine poudre pour augmenter la surface de contact avec le solvant et finalement dégraissées.

II.1.2 Produits chimiques

Les solvants (Méthanol, éthanol absolu, butanol, chloroforme et acétone), les acides (acétique, chlorhydrique et sulfurique) et les réactifs (Dragendroff et Lieberman-Burchard) ont été fournis par Merck (Allemagne). L'huile de paraffine a été fournie par Isopharm (Algérie). La gélose a été fournie gracieusement par le Centre Hospitalier Universitaire de Blida. La gomme xanthane a été fournie par Rhodia (Algérie). Le gel de silice a été fourni par Merck (Allemagne).

II.2 Méthodes de caractérisation de la matière végétale

II.2.1Détermination de la teneur en eau

Pour évaluer la teneur en eau, on procède selon Audigie [125] à un séchage de la matière végétale à une température de 103 ± 2°C dans une étuve jusqu'à l'obtention d'une masse constante. La teneur en eau est définie comme la perte de masse subie dans les conditions de la mesure.

$$H\% = (\frac{mi - mf}{p}) \times 100 \quad \text{(II.1)}$$

où H% est la teneur en eau ou humidité, *mi* est la masse initiale, *mf* est la masse finale, *P* est la masse de la prise d'essai.

La teneur en matière sèche (MS%) est calculée selon la relation suivante :

$MS\% = 100 - H\%$ (II.2)

II.2.2 Détermination des taux de cendres

Ce sont les résidus obtenus, après incinération de la matière végétale à 550 °C pendant 3 h. Le taux de cendres (C%) est exprimé généralement en pourcentage en masse par rapport à la matière sèche [126]. Il est calculé selon la relation suivante :

$$C\% = (\frac{mf}{mi}) \times 100 \qquad \text{(II.3)}$$

Où *mi* est la masse initiale (avant calcination), *mf* est la masse finale (après calcination).

II.2.3 Détermination de la teneur en lipides

Les lipides sont extraits en utilisant le dispositif Soxhlet [127]. Les feuilles broyées sont introduites dans la cartouche en cellulose et 400 ml d'hexane sont mis dans le ballon ; l'hexane est chauffé à reflux pendant 5 h. La quantité des lipides est évaluée par pesée après évaporation à l'évaporateur rotatif et séchage de l'échantillon à l'étuve pendants 24h.

$$Teneur\ en\ lipide(\%) = (\frac{mf}{mi}) \times 100 \qquad \text{(II.4)}$$

Où m_i est la masse initiale et *mf*, la masse finale.

II.2.4 Analyse des métaux lourds par spectroscopie d'absorption atomique

La spectroscopie d'absorption atomique est une méthode d'analyse quantitative des traces ; c'est une méthode sensible, spécifique et rapide. L'intensité de l'absorption dépend directement de nombre de particules absorbant la lumière selon la loi de Beer-Lambert.

Les cendres obtenues par incinération de la matière végétale sont dissoutes dans 5ml d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique (9/1 v/v) pendant 15 min jusqu'à dissolution complète, la solution obtenue est diluée puis filtrée avant analyse.

II.3Méthodes d'extraction des saponines triterpéniques

II.3.1 Extraction par macération

Selon le protocole décrit par Sulaymen [128], une quantité de100 g de feuilles séchées broyées et dégraissées est macérée dans 700ml d'éthanol 80%. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 5 h. Après filtration des macéras, les filtrats sont évaporés au moyen d'un évaporateur rotatif pour éliminer le solvant. Le résidu obtenu représente la phase aqueuse riche en saponine.

Pour voir l'effet du temps sur le rendement de l'extraction, trois autres macérations sont préparées en variant les durées de macération (24, 48, et 72 h).

II.3.2 Extraction par induction électromagnétique

Afin d'évaluer l'effet du mode de chauffage sur le rendement d'extraction, on procède alors à une extraction par induction électromagnétique (IEM). Une quantité de 100 g de feuilles séchées broyées et dégraissées et 700 ml d'éthanol à 80% sont introduits dans un

réacteur de 2500mLen inox posé sur une plaque chauffante construite en vitrocéramique. L'agitation est produite par les lignes de champ magnétique des courants induits lors du chauffage par induction et par le phénomène d'ébullition. Pour éviter toute perte de la matière, on a procédé à une extraction à reflux. La durée de l'extraction est de 0.5, 1, 2 et 3h.

Après filtration des macéras, les filtrats sont évaporés au moyen d'un évaporateur rotatif pour éliminer le solvant, le résidu obtenu est la phase aqueuse riche en saponine.

II.3.3 Extraction assistée par micro-ondes

Dans le but de minimiser l'usage de solvant organique et d'obtenir un produit final propre, on procède à une extraction assistée par micro-ondes (EAM). Une masse de 100g de feuilles séchées broyées et dégraissées et 150ml d'éthanol sont introduits dans un ballon qu'on met dans le four à micro-ondes. Les micro-ondes sont en mesure de pénétrer dans la matière végétale et de générer de la chaleur en interagissant avec des molécules polaires telles que l'eau. Il en résulte une soudaine augmentation de la température à l'intérieur de la matière végétale 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'intérieures des cellules peuvent alors diffuser librement à l'extérieurs du tissu biologique, l'éthanol se vaporise et les saponines sont emportées par la vapeur vers le condensateur qui seront ensuite refroidie. On obtient un extrait éthanolique riche en saponines.

II.4 Purification, isolation et caractérisation des extraits

II.4.1Purification des extraits

La purification est une étape primordiale pour l'obtention d'un produit purifié facile à caractériser. Les phases aqueuses récupérées par les 3 méthodes sont lavées 4 fois avec 100ml de chloroforme pour soustraire la chlorophylle et les impuretés ; les phases récupérées sont soumises à une extraction liquide/liquide avec 100ml de n-butanol.

Les phases organiques recueillies après décantation sont évaporées à l'aide du rot à vapeur et les résidus ainsi récupérés sont séchés dans une étuve sous vide à 50°C. Les extraits bruts sont dissous dans 40ml de méthanol et précipités dans 200ml d'acétone. Après filtration, les extraits épurés sont séchés à 50°C sous vide pendant une nuit.

Le rendement (R) est exprimé en pourcentage par rapport au poids de la matière de départ, il est déterminé par la relation suivante :

$$R = (\frac{mf}{mi}) \times .100 \qquad \text{(II 5)}$$

Où m_i est la masse initiale, m_f est la masse de l'extrait final en g.

II.4.2Isolation des saponines triterpéniques par chromatographie flash

L'isolation des saponines triterpéniques a été réalisée en utilisant un fractionnement par chromatographie éclair ou flash [129]. Une quantité de 1.5g de l'extrait obtenu après extraction a subit une chromatographie sur colonne (éclair). La colonne est en verre, de dimensions (60x1.5cm) et remplie de gel de silice (60Å, 15-40µm). L'extrait est mélangé avec 5 fois sa masse de gel de silice puis introduit dans la colonne préparée. Le système d'élution employé est n-butanol/eau/acide acétique (84/14/7) (v/v/v). Les 107 fractions récupérées séparément après chaque 10min sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM). Les fractions consécutives contenant le même nombre de spots avec le même facteur de rétention (Rf) sont regroupées, filtrées, concentrées à l'évaporateur rotatif et séchées pour avoir des fractions principales qui sont par la suite analysées une deuxième fois par CCM.

II.4.3 Analyses phytochimique et biologique des extraits

II.4.3.1 Balayage phytochimique

La mise en évidence des différents groupes chimique (saponines, terpénoïdes, tannins, flavonoïdes, glucides et anthocyanes) dans les feuilles d'*Hedera hélix* et dans les extraits optimisés est assurée par les réactions en tubes [130].

Les saponines ont été mises en évidence par le test de mousse. Une quantité de poudre est reprise dans 5 ml d'eau distillée, puis introduit dans un tube à essai. La formation d'une mousse (après une agitation rigoureuse) stable, persistante pendant 1h indique la présence abondante de saponines.

La présence des terpènes a été mise en évidence en dissolvant une quantité de poudre dans 2 ml de chloroforme, et en versant la solution dans un tube à essai dans lequel on introduit 3 ml de H_2SO_4 concentré. L'apparition d'une coloration brune rougeâtre à l'interface indique la présence des terpènoïdes.

Les tannins ont été mis en évidence par la réaction au chlorure de fer ($FeCl_3$) à 2%. L'apparition d'une coloration vert-noir indique la présence des tannins.

La présence des flavonoïdes est mise en évidence en solubilisant une quantité de 0.2g de poudre dans une solution diluée de NaOH. L'apparition d'une coloration jaune suite à l'addition d'une quantité de HCl indique la présence des flavonoïdes.

Pour les Glucosides, on rajoute quelques gouttes d'H_2SO_4 à 0.2g de poudre. La formation d'une coloration rouge orangé indique la présence des glucosides.

L'analyse des glucides a été réalisée en ajoutant 2 à 3 gouttes d'une solution alcoolique alpha-naphtol à 2 mL de la solution à tester. La formation d'un anneau violet à l'interface indique la présence des glucides.

Pour les anthocyanes, on rajoute quelques gouttes d'HCl à 2ml de la solution ; la réaction donne une coloration rouge en présence d'anthocyanes.

L'analyse des alcaloïdes a été effectuée en dissolvant une quantité de poudre dans une solution de H_2SO_4 à 2% pendant 2 min tout en ajoutant quelques gouttes du réactif Dragendroff ; un précipité rouge orangé indique la présence des alcaloïdes.

II.4.3.2 Analyse par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple dont le principe est basé sur le phénomène d'adsorption. Elle est utilisée dans la séparation et l'identification des molécules pures, les extraits (mélange complexes de métabolites) et les échantillons biologiques. Les extraits ainsi récupérés sont soumis à une séparation par CCM. Les plaques utilisées sont à base de gel de silice 60 F 245 (Merck) et le solvant de développement est constitué de Butanol/Eau/Acide acétique (84/14/7) (v/v/v) [131]. Après le développement, les plaques doivent être séchées à l'air. Les spots obtenus sont révélés par, le réactif Liebermann-Burchard [131], par le sang [132] et par le réactif de Molish [133] pour l'identification des saponines.

a/ Révélation par le réactif Liebermann-Burchard

Le réactif est préparé par l'addition de 5ml d'anhydrique acétique et 5 ml d'acide sulfurique concentré dans 50ml d'éthanol. Après refroidissement, la plaque est révélée par pulvérisation puis chauffée à l'étuve à 110°C pendant 5 à 10 min.

b/ Révélation par le réactif de Molish

La plaque après développement et séchage est pulvérisée par une solution alcoolique fraichement préparée (2 à 3 gouttes α-naphtol dans 1 ml d'acide sulfurique). L'apparition des spots violets indique la présence des glucides.

c/ Révélation par immersion dans une suspension d'érythrocyte

Le sang héparines frais est centrifugé à 2300 tr/min pendant 5 min. Le culot récupéré est mis dans une solution de PBS, PH 7 à raison de 3% (v/v), la plaque après développement est immergée pendant 20 sdans la suspension d'érythrocyte puis sera maintenu verticale pendant 30 s. Des spots blancs sur fond rose apparaissent, ensuite la plaque est immergé encore une fois pendant 30 min dans le PBS pour enlever l'excès du sang sur la surface.

Cependant, il faut souligner que la suspension des érythrocytes peut être réutilisée au minimum trois fois avec des résultats satisfaisants.

II.4.3.3 Activité biologique

Deux bactéries à Gram positive (*Staphylococcus aureus, E faecalis*) et deux bactéries à gram négative (*Escherichia coli, Pseudomonas aeroginosa*) fournies par le laboratoire de microbiologie du Centre Hospitalier Universitaire de Blida (Frantz Fanon) ont été utilisées pour l'analyse de l'activité biologique (Tableau II.1).

Ces organismes sont conservés dans le milieu de Müller-Hinton à 4°C, c'est le milieu de culture usuel utilisé pour le développement de ce type de bactéries.

Cette étude permet de mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne. La technique utilisée est la diffusion sur milieu gélosé par la méthode des disques [134], qui se traduit par la formation d'une zone d'inhibition au tour du disque contenant la substance à tester.

Cette méthode consiste à imprégner des disques de papier Wattman avec les extraits à raison de 3mg/mL solubilisés dans le diméthyle sulfoxide (DMSO), par le DMSO (blanc) et par un antibiotique commercial (Gentaxyn®) utilisé comme standard antimicrobien.

Ces disques sont déposés sur des boites de pétri préalablement préparées contenant 10mL de milieu gélosé et ensemencées avec le germe choisi et ensuite sont incubées à 37°C pendant 24 h.

Après une nuit d'incubation, le diamètre de chaque zone d'inhibition (diamètre du disque compris) est mesuré en mm. Les mesures peuvent être prises avec une règle sur le fond de la boîte sans enlever le couvercle.

L'action de l'extrait est déterminée par le diamètre du halo d'inhibition qui apparaît clair autour de la zone de contact.

Tableau II.1. Bactéries testées

	Souches bacteriennes (ATCC)	Origine
Gram Positive (Cocci)	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	Centre Hospitalo-universitaire de Blida (CHU Frantz Fanon)
	Enterococcus faecalis ATCC 29212	
Gram Négative (Bacillus)	*Escherichia coli* ATCC 25922	
	Pseudomonas aeroginosa ATCC 27853	

ATCC: American type culture collection

II.4.4Analyses physicochimiques des extraits

II.4.4.1Analyse par spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier

La spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier(FTIR) est une méthode physique d'analyse fondée sur l'absorption de photon hυ très peu énergétique permettant de modifier l'énergie de vibration des molécules. Le spectre IR fournit des informations sur les groupements fonctionnels existants dans la molécule.

Les échantillons sont analysés par FTIR en utilisant un spectromètre type JASCO 4200F sous forme de pastille en KBR (KBR/extrait).

II.4.4.2Analyse par résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un phénomène qui apparait lorsque les noyaux des atomes immergés dans un champ magnétique uniforme B_0 sont exposés à un autre champ magnétique variable Be.

La fraction partiellement purifiée est analysée par RMN, en utilisant un spectromètre type Bruker BioSpin GmbH (Rheinstten, Allemagne) opérant à 400MHz. Une quantité d'échantillon est dissoute dans le solvant D_2O. Les shifts de résonance sont en ppm.

II.4.4.3 Analyse microscopique

L'analyse microscopique des émulsions fraichement préparées est assurée à l'aide d'un microscope de type Zeiss (B3 Professional Série, Allemagne).

II.4.4.4 Détermination de la concentration micellaire critique

Les mesures de la tension des surface ont été réalisées à l'aide d'un tensiomètre à lame Wilhelmy de type GibertiniTSD (Digital Tensiometer). La gamme de la concentration en saponines était entre 0.01 et 1 g/L. Les mesures ont été effectuées à 20 °C en réalisant 3 essais. La concentration micellaire critique (CMC) a été déduite des mesures de tensions de surface en fonction de la concentration de l'extrait analysé.

II.4.4.5 Propriétés émulsifiantes

Les propriétés tensioactives des extraits ont été déterminées en utilisant la technique de propagation d'huile (oil spearding technique) [135]. Dans une boite à pétri de 9 cm, on ajoute 20 mL d'eau distillée, à la surface de l'eau on dépose 10µL d'huile de paraffine et, sur la goute de l'huile on dépose 5 µL d'une solution aqueuse de saponine. Le diamètre de la zone claire est déterminé, ce qui constitue une mesure indirecte de l'activité de surface des tensioactifs. Le plus grand diamètre représente une importante activité de surface.

II.4.4.6 Capacité émulsifiante

La capacité d'émulsification (CE_{24}) est déterminée selon la méthode décrite par Burgoz et al. [135]. Les émulsions sont préparées par agitation pendant 3 min de 2.5ml d'huile de paraffine avec un volume égal (2.5ml) de la phase aqueuse constituée de 0.05, 0.5, 1 et 2% de saponines triterpéniques. Après agitation, on laisse les tubes reposer pendant 1h. La capacité d'émulsification (CE_{24}) et la stabilité de l'émulsion (SE) sont calculées en utilisant les équations suivantes :

$$CE_{24} = \left(\frac{H_E}{H_T}\right) \times 100 \quad \text{(II.5)}$$

$$SE = \left(\frac{CE_{24}}{CE_0}\right) \times 100 \quad \text{(II.6)}$$

oùH_E est la hauteur de l'émulsion, H_T est la hauteur totale de la solution, CE_0 est le rapport $\left(\frac{H_E}{H_T}\right) \times 100$ après 1 h, CE_{24} est le rapport $\left(\frac{H_E}{H_T}\right) \times 100$ après 24 h.

II.4.4.7 Indice de crémage

Il s'agit d'un paramètre caractéristique de la stabilité de l'émulsion. Tout juste après la préparation des émulsions, on les place dans des tubes à essais et on mesure les hauteurs des phases séparées. L'indice de crémage (I-C) est obtenu à l'aide de la formule suivante:

$$I - C = (\frac{H_{aq}}{H_T}) \times 100 \qquad \text{(II.7)}$$

Où H_{aq} est la hauteur de la phase aqueuse (phase inferieure), H_T est la hauteur totale de l'émulsion.

II.5Formulation et caractérisation des systèmes dispersés à base de saponines

II.5.1 Formulation des émulsions

Pour déterminer l'efficacité des saponines et le rapport phase aqueuse/phase huileuse adéquat pour former des émulsions, on prépare des solutions aqueuses de saponines à des concentrations variant entre 0.05 et 1%. Ces phase aqueuses sont ensuite soumises à une agitation vortex à 1400 tr/min pendant 2 min avec des quantités d'huile de paraffine en respectant les rapports volumiques 80/20, 50/50 et 20/80. Après 24 h, on mesure la hauteur des émulsions formées pour chaque tube. Le type d'émulsion formé (eau dans huile ou huile dans eau) est déterminé par la dilution de 2g d'émulsion dans 10ml d'eau distillée ou dans de l'huile de paraffine. Après agitation pendant 30s, on laisse le mélange se reposer pendant 5min.

Les émulsions sont préparées par l'ajout des quantités d'huile de paraffine adéquate aux phases aqueuses préparées par la solubilisation d'une quantité appropriée de gomme xanthane et de d'extrait de saponine dans de l'eau pure à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 24h(Tableau II.2). L'émulsification est assurée par un homogénéiseur de type Ultra-Turrax (IKA) pendant 10 min à une vitesse de 24000tr/min.

Tableau II.2. Composition des émulsions

Constituants	Concentration (w/w %)	Fonction
Extrait de saponine	0.05-0.25	Biosurfactant
Gomme xanthane	0.2 - 0.8	Epaississant
Huile de paraffine	10 - 20	Phase huileuse

La démarche adoptée pour organiser les expériences est basée sur la planification des expériences. Le recours à cette méthode permet d'obtenir des modèles prévisionnels des réponses ainsi que les conditions optimales et cela avec un minimum d'essais crédibles.

La stratégie de planification expérimentale la plus adéquate repose sur une modélisation en surface de réponses (RSM) par un modèle d'ordre 2 (Eq. II.8) pour tenir compte de toutes les interactions doubles entre les facteurs.

Le modèle de la matrice d'expérience qui répond à nos objectifs est de type CCF (Central Composite Face-centered).

$$y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}{X_1}^2 + a_{22}{X_2}^2 + a_{33}{X_3}^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_{23} \text{(II.8)}$$

Avec :

Y : Les paramètres rhéologiques ou réponses.

X_1, X_2 et X_3 : Les facteurs de formulations.

La qualité au sens statistique des résultats obtenus à l'issu des ajustements est conditionnée par le coefficient expliquant la variance R^2, qui indique à quel point le modèle est adéquat. Pour déterminer les modèles statistiquement significatifs, l'analyse ANOVA est utilisée en employant le logiciel Mode (version 6, Umetrics AB, Umeå, Sweden).

II.5.2. Formulation d'un gel antibactérien

Afin de connaitre la concentration de l'agent gélifiant donnant la forme désirée, plusieurs essais ont été réalisés. A température ambiante, la gomme xanthane à différentes concentrations (0.5, 1.2 et 2.5%) est ajoutée progressivement à l'eau distillée sous agitation mécanique à l'aide d'un agitateur à hélices à 450tr/min. L'agitation est maintenue jusqu'à dissolution et hydratation totale du xanthane et l'obtention d'un gel homogène.

Avant de procéder à la préparation du gel, le matériel et les ustensiles utilisés sont stérilisés. 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 extraite assurant l'activité antibactérienne souhaitée.

Selon la littérature, au-delà d'une concentration de 0.3%(en masse) les saponines agissent comme un agent antibactérien [136].Cependant selon le test préliminaire, la concentration de saponine nécessaire pour obtenir l'activité antibactérienne désirée est de l'ordre de 1.25%.La formule finale du gel est représentée dans le Tableau II.3.

Tableau II.3. Formule du gel optimisée

Les composants	GX (g)	Saponine (g)	Arôme (g) vanille	Eau distillée (ml)
Les quantités	2	1.25	1	100

II.5.3 Méthodes de caractérisation

II.5.3.1Analyse rhéologique

Les analyses rhéologiques sont effectuées grâce à l'utilisation d'un rhéomètre à contrainte et déformation imposées de type MCR 302Anton PaarPhysica (Anton Paar, Gmbh, allemagne), relié à un thermostat. Les résultats sont traités par un logiciel Rheoplus US200.

Le test d'écoulement a été déterminé en appliquant une vitesse de déformation variant de 0.001 à 1000 s^{-1} ; le nombre de point est de 50 et, le temps entre chaque mesure et de 5 pts.

Les propriétés viscoélastiques des solutions ont été déterminées en mode dynamique par un test oscillatoire, en faisant varier la déformation de 0.001 à 100% à une fréquence de 1Hz.

Les courbes ont été systématiquement ajustées par le modèle rhéologique le plus adéquat pour faire ressortir les principaux paramètres caractéristiques. En parallèle, une analyse de la viscoélasticité en régime linéaire et une analyse sous écoulement en dehors du régime linéaire ont été réalisées.

a/ Test de viscoélasticité

Cette étude permet de déterminer les propriétés viscoélastiques d'un matériau, à savoir le module de conservation G' et le module de perte G", en appliquant à l'échantillon une déformation sinusoïdale de pulsation ω (rad/s). Les mesures ont été effectuées en utilisant le système de mesure plan-plan (25mm) 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.

b/ Test d'écoulement

Le test d'écoulement permet une mesure macroscopique de la force nécessaire pour vaincre les résistances à l'écoulement, et d'évaluer ainsi 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. En utilisant le même système de mesure (plan-plan), on applique une rampe logarithmique croissante en vitesse de cisaillement de 0.0001s^{-1}à 1000s^{-1} et un nombre de points de mesure de 35, et un temps de mesure suffisamment long pour atteindre l'état d'équilibre. Pour le traitement et la modélisation des courbes d'écoulement on privilège l'utilisation du logiciel STATISTICA qui offre une multitude de techniques et de méthodes d'optimisation linéaires se basant sur un calcul itératif (quasi-newton, simplex).

c/ 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 évaluer un matériau dans son état d'équilibre, il faut rester dans le domaine linéaire où la déformation ne modifie pas la structure.

Le gel préparé à base de saponines a subi ce type de test, en faisant varier la fréquence de 0.01 à100 Hz dans le domaine linéaire (γ=1%) à une température de 20°C.

d/ Rampe de température

On effectue une rampe de température aller –retour au gel final, en chauffant de 5 à 60 °C, puis en refroidissant de 60 à 5°C dans les mêmes conditions de déformations (γ=1%) et une fréquence de 1Hz. A une vitesse de chauffe ou de refroidissement de 2°C/min, on suit l'évolution du module de conservation G' et de perte G" en fonction de la température.

CHAPITRE III

III.1 Introduction

L'objectif visé par cette étude est la valorisation des feuilles de la plante *Hedera hélix* connue sous l'appellation du lierre grimpant qui appartient à la flore algérienne. On s'est intéressé en particulier à l'extraction d'une matière active que la plante contient et qui est utilisée par la suite dans le développement d'une formulation pharmaceutique.

Ce travail s'est déroulé en trois grandes étapes. La première consiste à extraire et identifier le principe actif, à savoir les saponines triterpéniques. La seconde étape est la formulation d'une émulsion-huile-dans-eau (H/E), en utilisant une méthodologie basée sur les plans d'expériences. La dernière étape est consacrée à la formulation d'un gel antibactérien à base d'extraits de saponines et stabilisé par la gomme xanthane. Les propriétés mécaniques de ce gel ont été déduites en faisant une étude comparative avec celle d'un gel de référence commercialisé localement (Manigel). C'est un gel hydro-alcoolique désinfectant pour les mains à base de carbopol et d'alcool éthylique.

III.2 Extraction et caractérisation des saponines à partir de l'*Hedera Hélix*

III.2.1 Caractérisation des feuilles d'*Hedera hélix*

III.2.1.1Teneur en eau

Les résultats obtenus (Figure III.1) après séchage et calcination de la matière végétale (feuilles d'*Hedera hélix*) ont révélé que plus de la moitié du poids des feuilles fraiches de la plante est constituée d'eau avec une teneur de 66%.

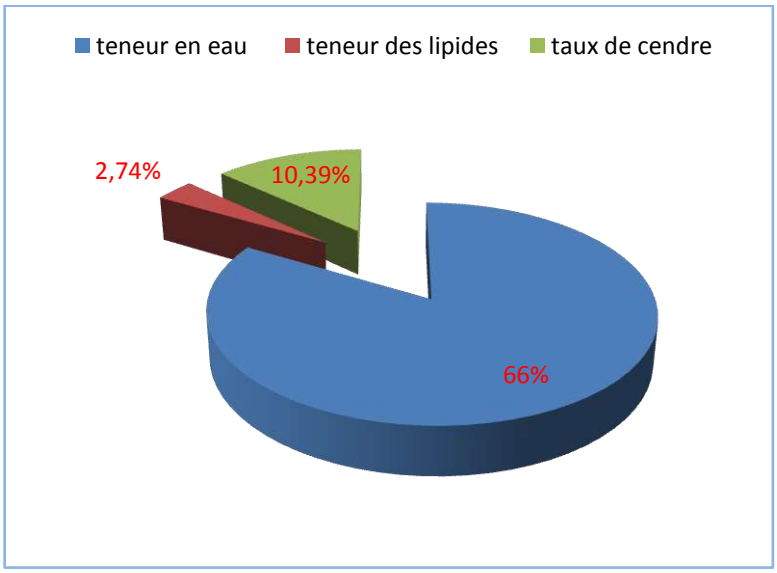


Figure III.1.Teneur en eau de la plante

III.2.1.2 Analyses spectroscopiques des métaux

Les résultats qualitatifs et quantitatifs des métaux contenus dans les feuilles de la plante sont illustrés dans le Tableau III.1. Les feuilles de la plante *Hedera hélix* sont riches en magnésium et en potassium avec des concentrations d'environ 360mg/g et 19.40mg/g de cendre consécutivement ; cependant, le manganèse, le cuivre, le sodium et le cadmium sont présents mais en faibles quantités. Les oligo-éléments, comme le fer et le zinc existent à l'état de traces. Par ailleurs, les feuilles d'*Hedera hélix* ne contiennent aucune trace de métaux lourds.

Tableau III.1. Composition minérale des feuilles d'*Hedera hélix*

Minéraux	Résultats	Concentration (mg/g)
Na^+	+	1.8
K^+	++	19.40
Pb	-	/
Mn	+	2.94
Cu	++	4.11
Cd	+	1.29
Fe	+	0.68
Ni	-	/
Mg	+++	**360.58**
Zn	+	0.24

III.2.1.3 Balayage phytochimique

Le résultat du balayage phytochimique des feuilles de la plante étudiée a décelé la présence de sept grands groupes chimiques (Tableau III.2), à savoirles saponines, les tanins, les flavonoïdes, les terpènoïdes, les anthocyanes, les glucosides et les glucides, alors que les alcaloïdes ne semblent pas présents dans les feuilles de lierre grimpant. Il est à signaler que les saponines sont présentes en grandes quantités.

Tableau III.2. Balayage phytochimique de *l'Hedera hélix*

Familles chimiques	Réactions	Couleur
Saponines	+	Formation d'une mousse
Tannins	+	Bleu noire
Flavonoïdes	+	Précipité orange
Alcaloïdes	-	Précipité rouge orangé
Glucosides	+	Rouge brique
Glucides	+	Anneau violet
Terpènoïdes	+	Coloration brune rougeâtre
anthocyanes	+	Coloration rouge

(+) = Présence, (-)=Absence

III.2.1.4 Caractéristiques organoleptiques des extraits

Les résultats organoleptiques des différents extraits partiellement purifiés (Tableau III.3) révèlent que l'extrait obtenu par macération est sous forme de poudre de couleur jaune orange, idem pour l'extrait obtenu par extraction assistée par micro-ondes. Les extraits obtenus par induction électromagnétique (IEM) pour un temps d'extraction d'une demi-heure (1/2h) et 1 heure (1h) sont de couleur jaune orange. En revanche, lorsque le temps d'extraction augmente, la poudre change de couleur et de forme.

D'après les caractéristiques organoleptiques, on conclut que la température et le temps d'extraction influent sur l'aspect et les propriétés chimiques des extraits.

Tableau III.3. Caractéristiques organoleptiques

Modes Extraction	Macération		Induction électromagnétique			
Temps (heure)	5	72	0.5	1	2	3
Couleur	Jaune orange	Jaune orange	Orange	Jaune orange	Marron	Marron
Aspect	Poudre	Poudre	Poudre	Poudre	Poudre	Pate visqueuse

III.2.2Extraction des saponines triterpéniques

III.2.2.1 Effet du mode d'extraction sur le rendement

Au regard des résultats de l'évolution du rendement d'extraction des saponines triterpéniques en fonction du temps et de la méthode d'extraction, on remarque une proportionnalité entre le temps d'extraction et le rendement(Figure III.2). Ainsi, plus on augmente le temps d'extraction durant la macération plus le rendement est important jusqu'à épuisement total des saponines. En revanche pour l'induction électromagnétique (IEM), le rendement augmente pour atteindre un maximum pour un temps égal à 1h. Au-delà de ce temps, le rendement diminue.

D'après l'histogramme de l'extraction à froid, on note que le temps de macération a un effet positif sur le rendement. La macération provoque le gonflement des cellules puis leur éclatement, ce qui permet d'extraire la majorité des saponines. On enregistre un rendement de 3.41% pendant 72h.

La Figure III.3 Illustre la cinétique d'extraction par (IEM). Pour une durée d'extraction inférieure à 1h, le solvant bouilli par l'effet des ondes électromagnétiques pénètre dans les cellules et solubilise le soluté entrainé par la suite à l'extérieur, étape durant laquelle une faible quantité de saponines est extraite correspondant à un faible rendement. Pour un temps d'extraction compris entre 1 et 2h, le rendement augmente d'une façon significative pour atteindre une valeur maximale de 2% et cela pour un temps égal à 1h ; au-delà de ce temps, une diminution du rendement est enregistrée.

Donc, on peut conclure que l'extraction des saponines s'achève au bout d'une heure (1h) et l'extraction à chaud à longue durée modifie qualitativement et quantitativement le résultat de l'extraction. On s'aperçoit d'après ces résultats que la somme des pourcentages des extraits obtenus par (IEM) durant 72 h est de l'ordre de 144%, alors que l'extraction à froid durant 3jours a permis d'atteindre un rendement de 3.41%. Cette différence est probablement liée au mode de chauffage.

Le chauffage par (IEM) contribue donc à la fragilisation et à la rupture des parois cellulaires grâce à son principe de production homogène de la chaleur au sein du matériau à chauffer. Ce résultat est en accord avec les travaux de Zouambia et al. [136] où ils expliquent ce phénomène par la décomposition cellulaire de la plante lorsque la température augmente dans le cas de l'IEM. Selon les résultats obtenus, on peut considérer cette nouvelle technique émergente comme une méthode de choix pour l'extraction des saponines triterpéniques en comparaison avec la méthode conventionnelle qui est la macération.

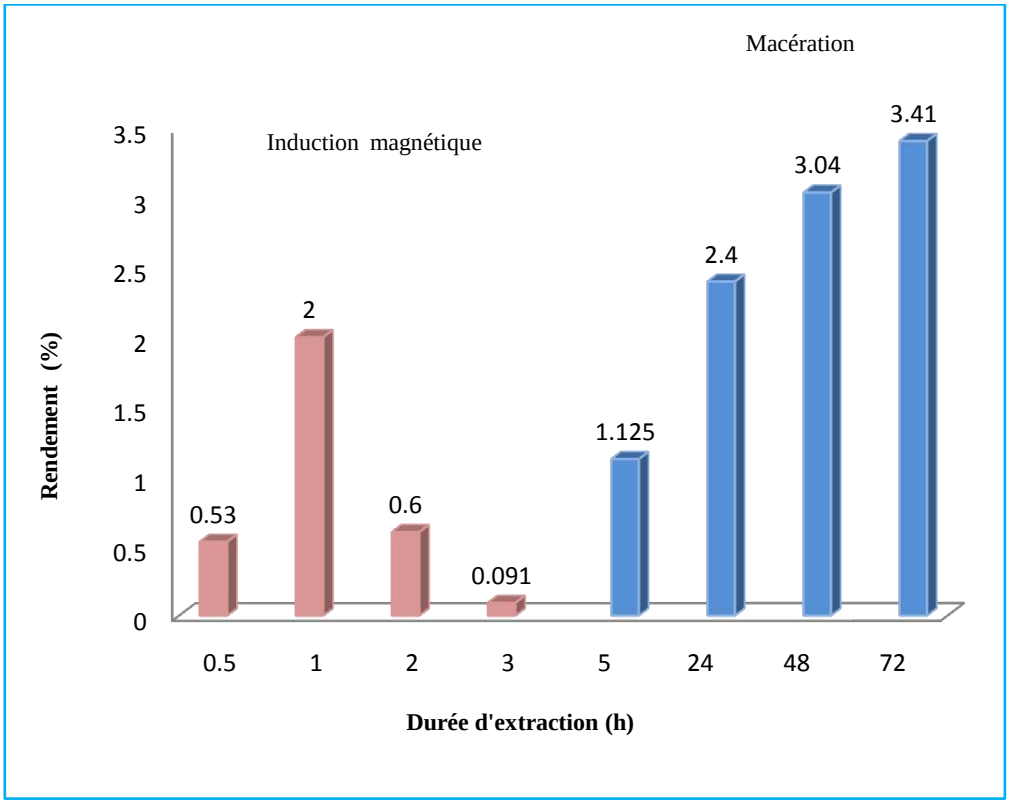


Figure III.2. Effet du mode d'extraction sur le rendement

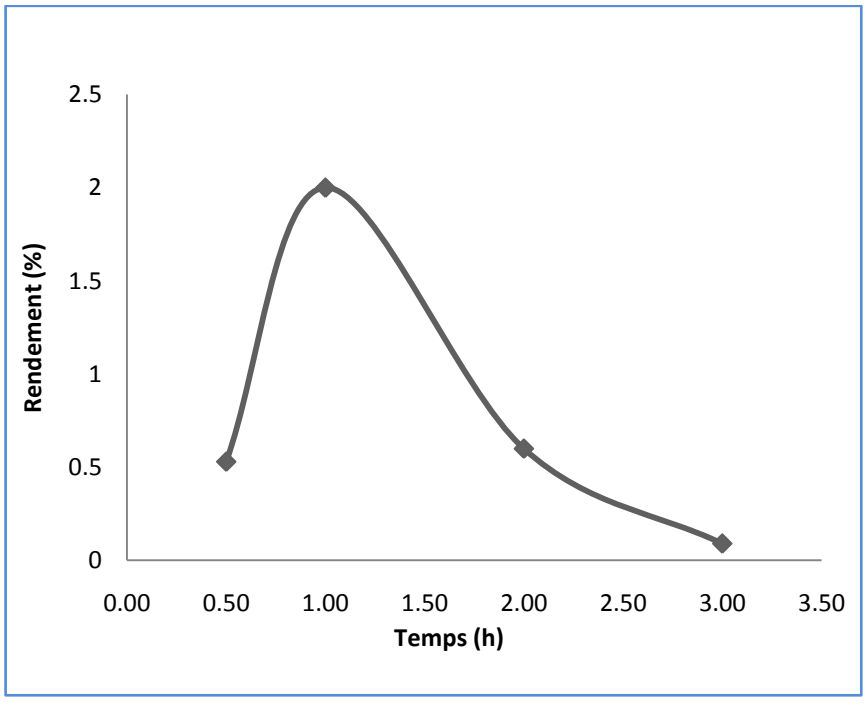


Figure III.3. Variation du rendement d'extraction par IEM avec le temps

III.2.2.2 Influence du mode de chauffage sur le rendement d'extraction

D'après les résultats obtenus pour les deux méthodes d'extraction (chauffage par induction électromagnétique et par micro-ondes), le meilleur rendement est de l'ordre de 1.22% obtenu par la méthode d'extraction assistée par micro-ondes pour un temps d'extraction de 10min et une quantité de solvant de 150ml (Figure III.4). En revanche pour la méthode d'extraction par IEM et pour une durée d'extraction de 1h, on enregistre un rendement de 2%. On note que le mode de chauffage par micro-ondes est meilleur et influe positivement sur le rendement d'extraction. L'extraction assistée par micro-ondes (EAM) est la méthode la plus recommandée pour l'extraction des saponines triterpéniques à partir de la plante *Hedera hélix*. Cette méthode est très efficace dans le processus d'extraction des saponines triterpéniques en termes de meilleur rendement et court temps d'extraction.

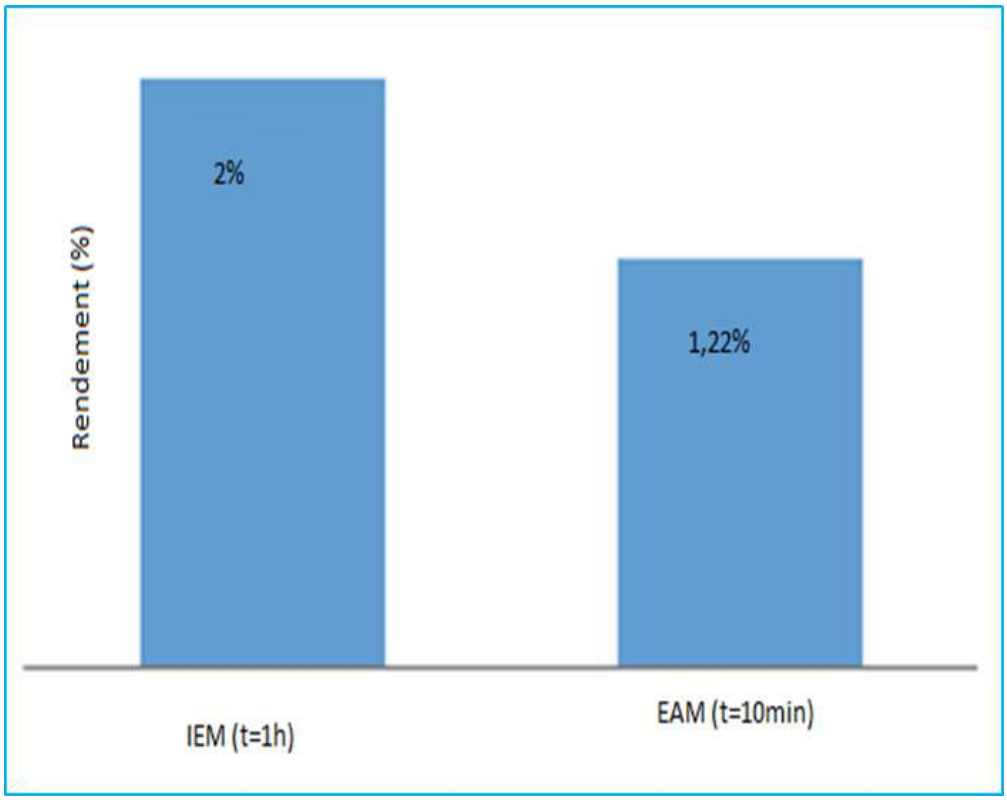


Figure III.4. Influence du mode de chauffage sur le rendement d'extraction

III.2.3 Caractérisation des extraits de lierre grimpant

III.2.3.1 Solubilité

L'extrait sec de saponines triterpéniques brutes est une poudre cristalline de couleur jaune orange, elle est soluble dans les alcools et dans l'eau (Figure III.5).



Figure III.5. Photo d'un extrait sec de saponine brute

III.2.3.2 Balayage phytochimique

Les tests phytochimiques révèlent que les deux extraits obtenus par IEM et par EAM, à savoir E1 et E2, sont très riches en composés bioactifs. Toutefois, ces deux extraits présentent une similitude dans leurs compositions (Tableau III.4). Ils renferment des saponines, des terpènes, des tannins, des glucosides et des flavonoïdes.

Des résultats similaires ont été obtenus par Greunke et al. [137] et Saiah et al. [138]. Ces auteurs suggèrent que ces métabolites possèdent des propriétés thérapeutiques intéressantes, qui expliquent leur utilisation dans la médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies.

Tableau III.4. Balayage phytochimique

Familles chimiques	Résultats	Tests/Réactifs
Saponines	+	Test de mousse
	+	Test hémolytique
Tannins	+	Test chlorure de fer
Flavonoïdes	+	Test pour flavonoide
Alcaloïdes	-	Test dragendroff
Glucosides	+	Test de Liebermann-Burchard
Glucides	+	Réactif de Molish
Terpènoïdes	+	Réactif Libermann
Anthocyanes	-	Test pour anthocyanes

(+) =Présence**,** **(**-) =Absence

II.2.3.3 Elucidation structurale

L'analyse spectroscopique FT-IR confirme la présence des groupements fonctionnels des saponines triterpéniques dans les deux extraits (E1 et E2)comme le montre la Figure III.6. Les spectres IR exhibent une forte bande d'absorption à 3427.43 et 1262.91cm^{-1}, ce qui indique respectivement une vibration d'élongation et de déformation O-H. On note également une vibration asymétrique et symétrique C-H à 2927 et à 2854cm^{-1}, et la présence d'une bande à 1630.61cm^{-1} qui correspond à une vibration d'élongation C=C,une bande à 1727.89 cm^{-1} qui correspond à une vibration C=O, une bande à 1433.19 et à 1386.63 cm^{-1}qui correspond à une vibration de déformation CH_2, CH_3 respectivement. Et enfin, on note la présence d'une bande d'absorption à 1058.74 cm^{-1} qui correspond à une vibration d'élongation C-O-C.

Selon la littérature [139], ces bandes d'absorption coïncident avec ceux des saponines triterpéniques.

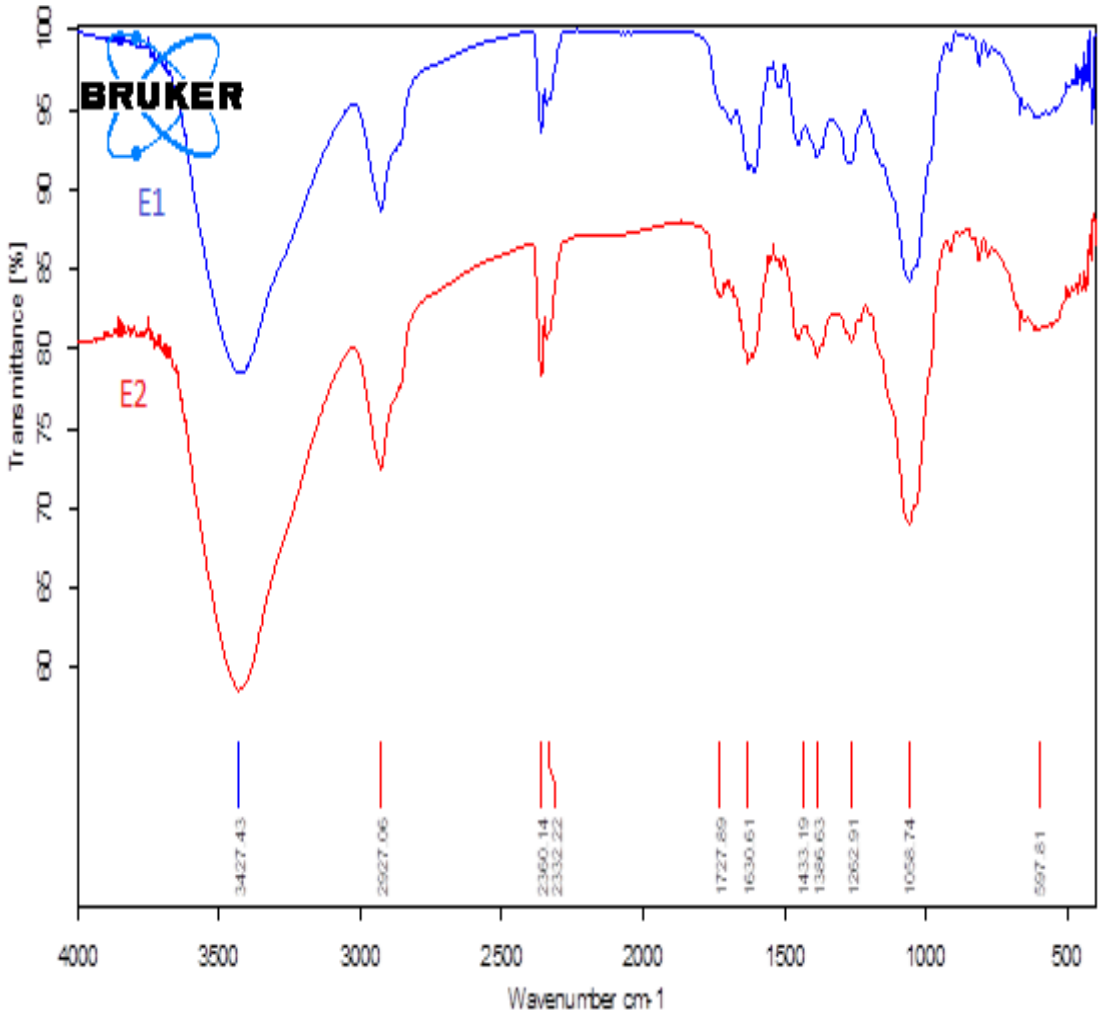


Figure III.6. Spectre FT-IR des extraits bruts

III.2.4 Identification des saponines triterpéniques des extraits bruts

III.2.4.1 Chromatographie sur couche mince

L'identification des saponines triterpéniques dans les deux extraits E1 et E2 est assurée par des réactions caractéristiques de coloration produites par différents réactifs (Liebermann-Burchard, Molish) et par le test hémolytique (hémolyse du sang). La Figure III.7-A montre les résultats de la CCM des extraits E1, E2 et du standard commercial (Ivy leaf 15%) après révélation par le réactif Liebermann-Burchard.

Les saponines triterpéniques donnent des spots de couleur violet, deux saponines triterpéniques principales figurent dans les deux extraits ; ils apparaissent également dans le standard utilisé. Ces mêmes spots se colorent en violet après révélation par le réactif de Molish (Figure III.7-B), ce qui confirme la présence des glucides.

La Figure III.7-C illustre la décoloration des spots après immersion de la plaque dans une solution d'érythrocyte.

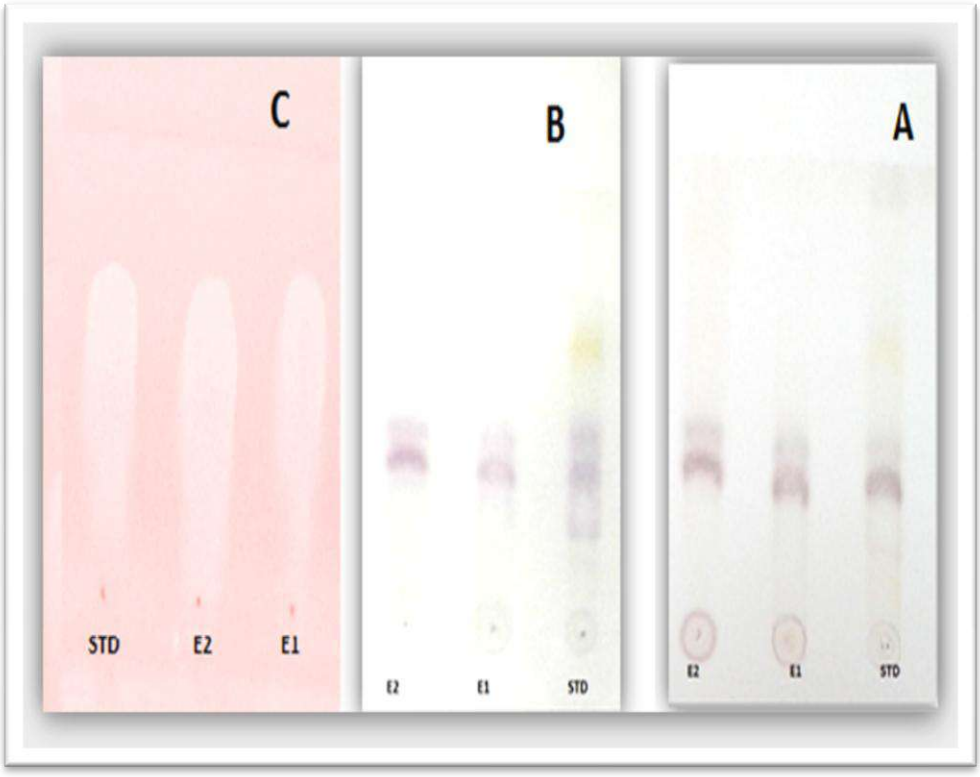


Figure III.7. Détection des saponines triterpéniques par CCM

(A): révélation par le réactif Liebermann-Burchard,

(B): révélation par le réactif de Molish, (C) : par hémolyse du sang.

III.2.4.2 Activité antibactérienne

Le résultat du test antibactérien des extraits bruts est présenté dans le Tableau III.5. Il semble que les deux extraits exhibent une activité antibactérienne importante contre les bactéries à gram négatives (*E coli, Pseudomonas aeroginosa*), vu la réduction significative de la croissance bactérienne dans la zone d'inhibition. Pour une concentration de 20mg/ml, la zone d'inhibition est aux alentours de 18 mm (Figure III.8).

Néanmoins les extraits E1 et E2 possèdent une légère activité bactéricide pour les bactéries à gram positive (*Staphylococcus aureus, E faecalis*), où l'on remarque une zone d'inhibition de 4mm (Figure III.9).

Tableau III.5. Activité antibactérienne des extraits bruts

	E.Coli *(GN)*	*P.aerogenosa* *(GN)*	*S.aureus* *(GP)*	*E.faecalis* *(GP)*
	Zone d'inhibition (mm)			
Extrait E1	20 mg/ml: 19 10 mg/ml: 7 05 mg/ml: 4	20 mg/ml: 18 10 mg/ml: 12 05 mg/ml: 4	20 mg/ml: 4 10 mg/ml: 2.9 05 mg/ml: 2	20 mg/ml: 1 10 mg/ml:1 05 mg/ml:1
Extrait E2	20 mg/ml: 18 10 mg/ml: 6 05 mg/ml: 4	20 mg/ml: 19 10 mg/ml: 11 05 mg/ml: 4	20 mg/ml: 4 10 mg/ml: 3.2 05 mg/ml:2	20 mg/ml: 1 10 mg/ml: 1 05 mg/ml:1

L'activité bactéricide des extraits E1 et E2 est due à la présence majoritaire des saponines triterpéniques. Ces résultats confirme ceux obtenus par Sarikahya [140] qui ont démontré que les saponines de la plante *Hedera hélix* exhibent une activité antibactérienne contre quelques bactéries à gram positif (*Bacillus spp.*,*Staphylococcus spp.*, *Enterococcusspp.*, et *Streptococcus spp.*) et à gram négative (*Salmonella spp., Shigellaspp., Pseudomonas spp., Escherichia coli,* et *Proteus).*

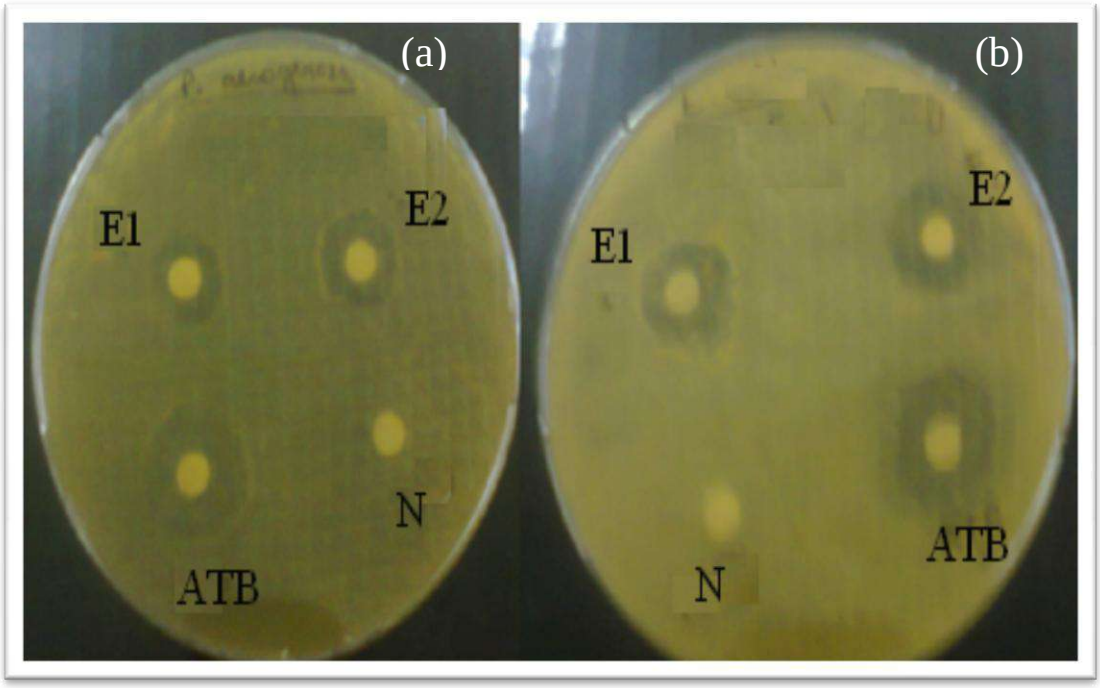


Figure III.8. Activité antibactérienne des extraits E1 et E2

a) P. Aerogenosa, b) E.Coli

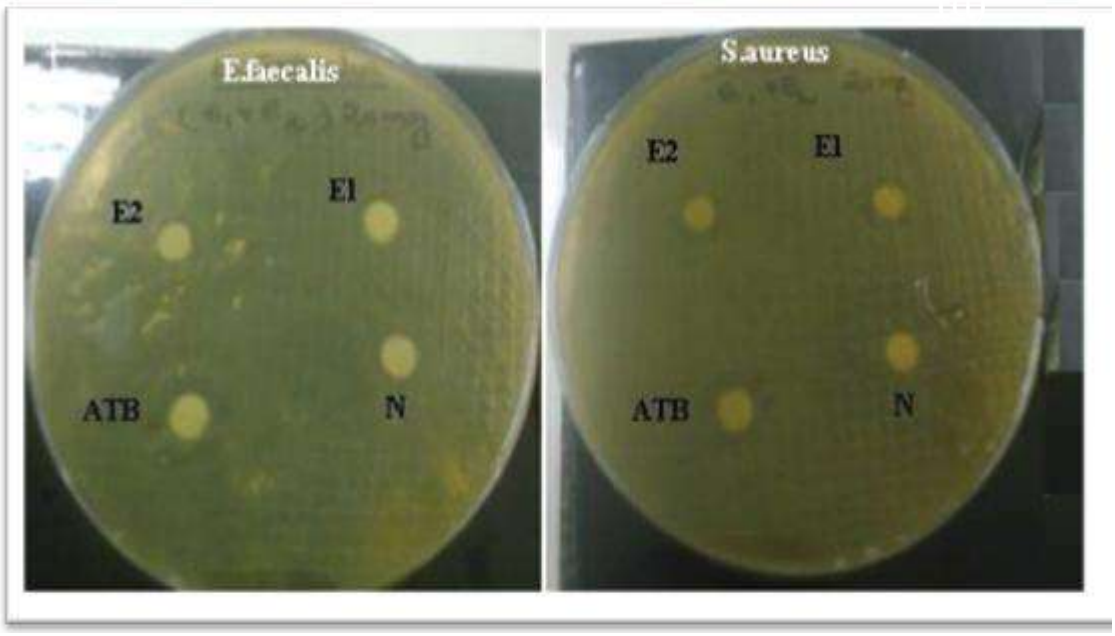


Figure III.9. Activité antibactérienne des extraits E1 et E2

c)E. Faecalis, d) S.aureus

III.2.4.3 Identification des saponines triterpéniques isolées par chromatographie flash

Le résultat de la CCM après révélation par le réactif de Liebermann-Burchard des fractions (F1, F2, F3, F4 et F5) isolées par chromatographie sur colonne (Tableau III.6) indique que les fractions F2 et F4 donnent deux différents spots colorés en violet (Figure III.10).

Tableau III.6. Fractions principales après chromatographie flash

Fractions	F1	F2	F3	F4	F5
N° de collection	17-20	21-27	28-54	55-86	87-107

Ces deux spots isolés apparaissent sous forme d'un seul spot pour les deux extraits. Ces spots sont similaires aux spots de l'extrait commercial de feuille de lierre grimpant (ivy leaf 15%).

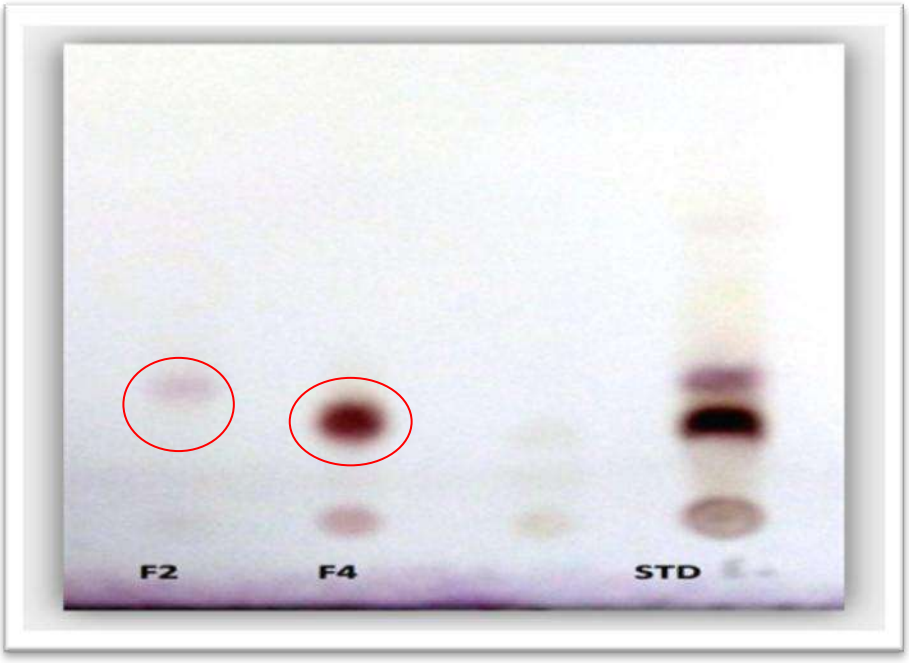


Figure III.10. CCM des fractions isolées

L'analyse spectroscopique FT-IR des fractions F2 et F4 (Figure III.11) révèle que les fractions isolées sont des saponines triterpéniques partiellement purifiées de différentes polarités. Ces résultats sont en accord avec ceux de Yu et al. [141] où ils ont isolés six (06) composés à partir des feuilles de lierre grimpant en utilisant l'HPLC/DAD ; ils ont identifié trois (03) composés comme des saponines triterpéniques.

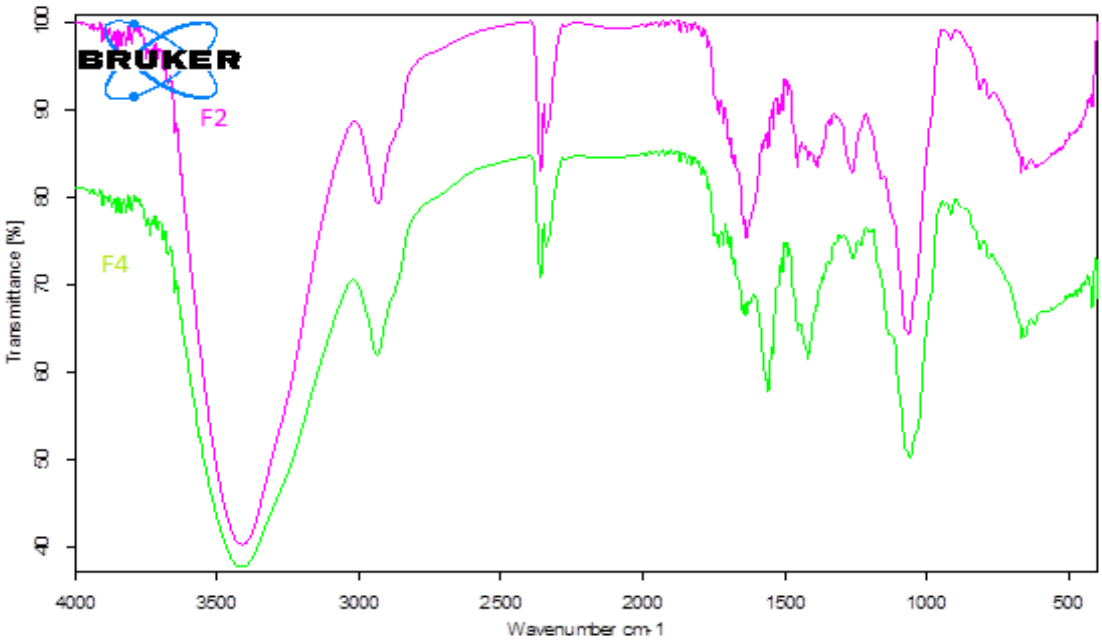


Figure III.11. Spectres FT-IR des fractions isolées

Le résultat de l'activité antibactérienne illustre que les fractions F2 et F4 exhibent une forte activité bactéricide interprétée par la réduction significative de la croissance bactérienne où le diamètre d'inhibition varie entre 6 et 25 mm pour une concentration de 5 mg/ml contre les bactéries à Gram négative (*E coli, Pseudomonas aeroginosa*), comme le montre la Figure III.12.

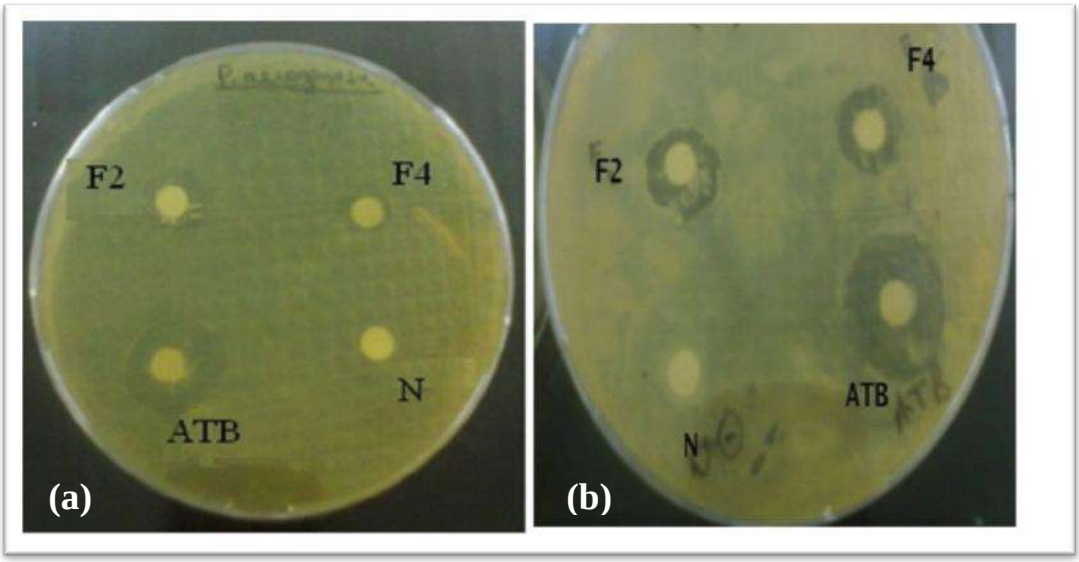


Figure III.12. Activité antibactérienne des fractions F2 et F4

a)*P. Aerogenosa*, b) *E.Col*

III.2.4.4 Analyse par résonnance magnétique nucléaire

D'après le résultat d'analysepar résonnance magnétique nucléaire (^{1}HNMR) de l'extrait partiellement purifié (Figure III.13), on remarque la présence de six signaux correspondant aux groupements méthyle quaternaire dans l'intervalle δ (0.84 - 1.07) ppm, protons oléfiniques àδ5.4ppm, groupements mèthine portant d'oxygène dans l'intervalle δ (3.0 à 4.0) ppm et un alcool primaire entre 0.84 et 1.07ppm.

Selon Gokhan et al. [142], ces groupements fonctionnels correspondent à la présence d'une partie non glucidique nommée génine ou aglycone. Le spectre ^{1}HNMR dévoile aussi la présence des signaux où tous les protons résonnent entre 3.5 et 5.2 ppm. Selon la littérature ces signaux correspondent à la présence d'une partie glucidique dans le composé analysé. Le pic majoritaire résonant à δ4.5ppm est attribué au pic du solvant utilisé (D_2O). L'analyse ^{1}HNMR affirme que la fraction F2 est un hétéroside composé d'une partie aglycone de type oléanane responsable du pouvoir thérapeutique de la plante dont elle est extraite et d'une partie glucidique. L'extrait partiellement purifié appartient à la famille des saponines triterpéniques. Ces résultats sont en accord avec ceux de Mehta et al. [143] et Bora et al. [144] et confirment la réussite de l'extraction des saponines triterpéniques.

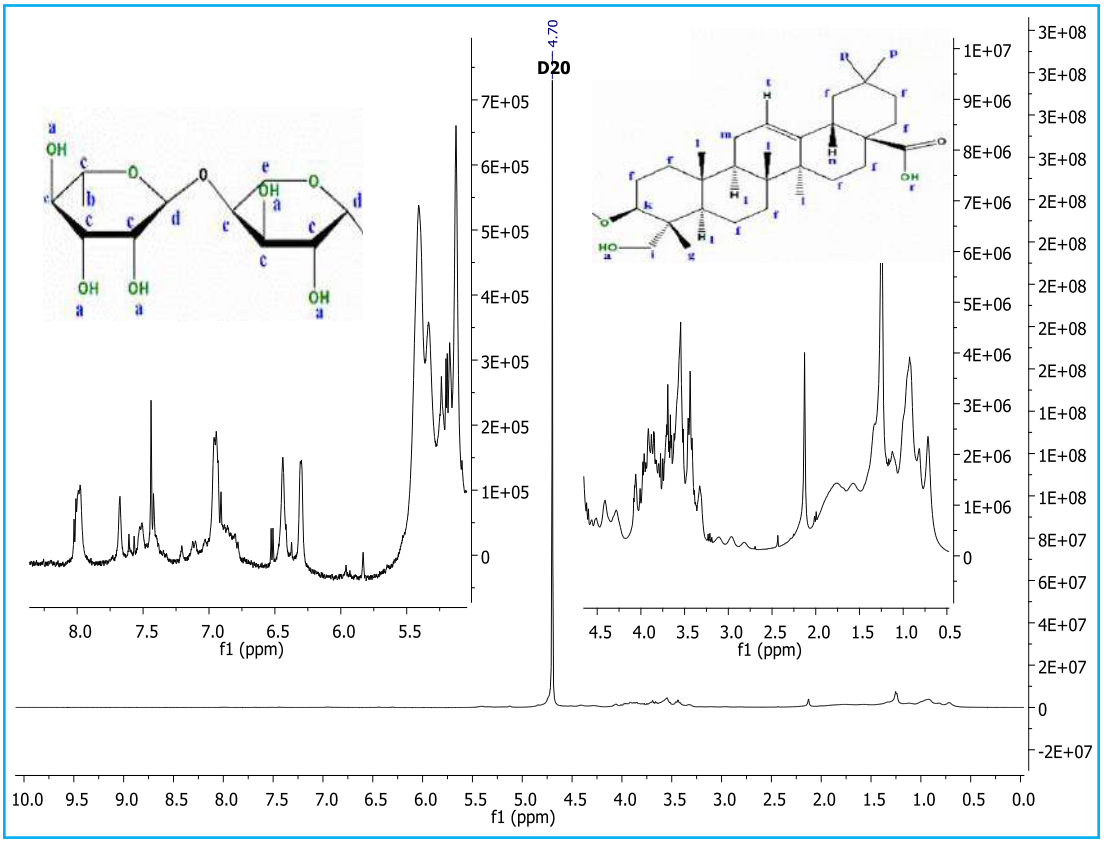


Figure III.13. ^{1} H NMR d'extrait partiellement purifié de saponine

III.2.4.5 Propriétés de surface des extraits de lierre grimpant

La Figure III.14 illustre la variation de la tension superficielle de l'eau pure en fonction de la concentration d'extrait de saponines triterpéniques. La tension de surface diminue avec l'augmentation de la concentration de saponines jusqu'à une concentration située entre 0.04 et 0.06% de saponine, à cette concentration la surface est saturée par les molécules de saponines et à partir de laquelle la baisse de la tension superficielle ralentit avec l'augmentation de la concentration puis l'abaissement atteint son minimum à 38 dynes/cm et devient non significatif. Cette concentration représente la concentration micellaire critique (CMC) à partir de laquelle les surfactants commencent à former des micelles.

Les saponines triterpéniques extraites de la plante *Hedera hélix* Algeriensis abaissent la tension superficielle, ce qui traduit leur caractère tensioactif. Ces résultats sont en accord avec ceux de Mitra et al. [95] qui ont déterminé la CMC des saponines triterpéniques extraites de différentes sources et qui ont conclu que les valeurs de la CMC varient entre 0.013 et 0.074%.

Par ailleurs Mironenko et al. [145] ont trouvé également que la CMC des saponines triterpéniques extraites à partir de la racine de betterave à sucre se situe entre 0.068 et 0.076%. D'autre part, Stanimirova et al. [146] ont montré que la CMC des solutions de saponines extraites des racines de Quillaja est approximativement de l'ordre de 0.025%. Selon leurs travaux, la CMC des saponines triterpéniques est variable et dépend de la source et de la méthode d'extraction.

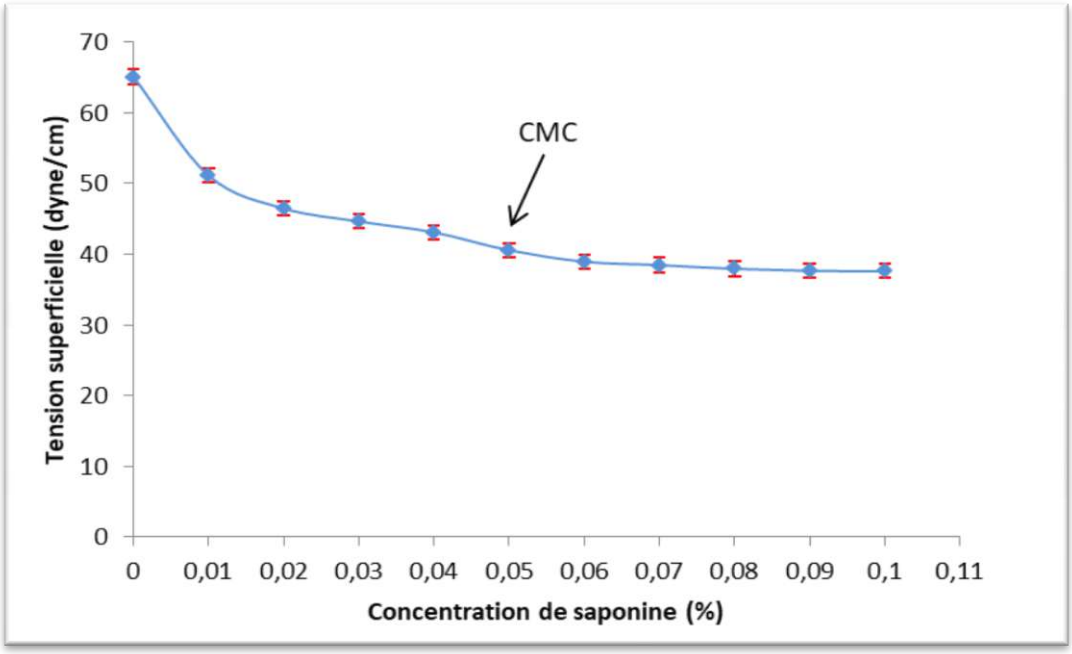


Figure III.14. Variation de la tension superficielle d'une solution aqueuse à base d'extrait de lierre

III.2.4.6 Propriétés émulsifiantes des extraits de lierre grimpant

La technique de propagation d'huile est une méthode rapide, facile et fiable pour déterminer les propriétés de surface des tensioactifs [147]. Youssef et al. [148] ont démontré que cette technique est efficace pour repérer les composés possédant une activité de surface.

La Figure III.15-A représente une zone claire avec un diamètre important qui correspond à l'activité de surface des saponines triterpéniques. Dans la Figure III.15-B, on note l'absence de propagation d'huile en l'absence de saponines. Ce résultat indique que les saponines triterpéniques extraites de l'*Hedera hélix* appartenant à la flore algérienne possèdent une importante activité de surface.

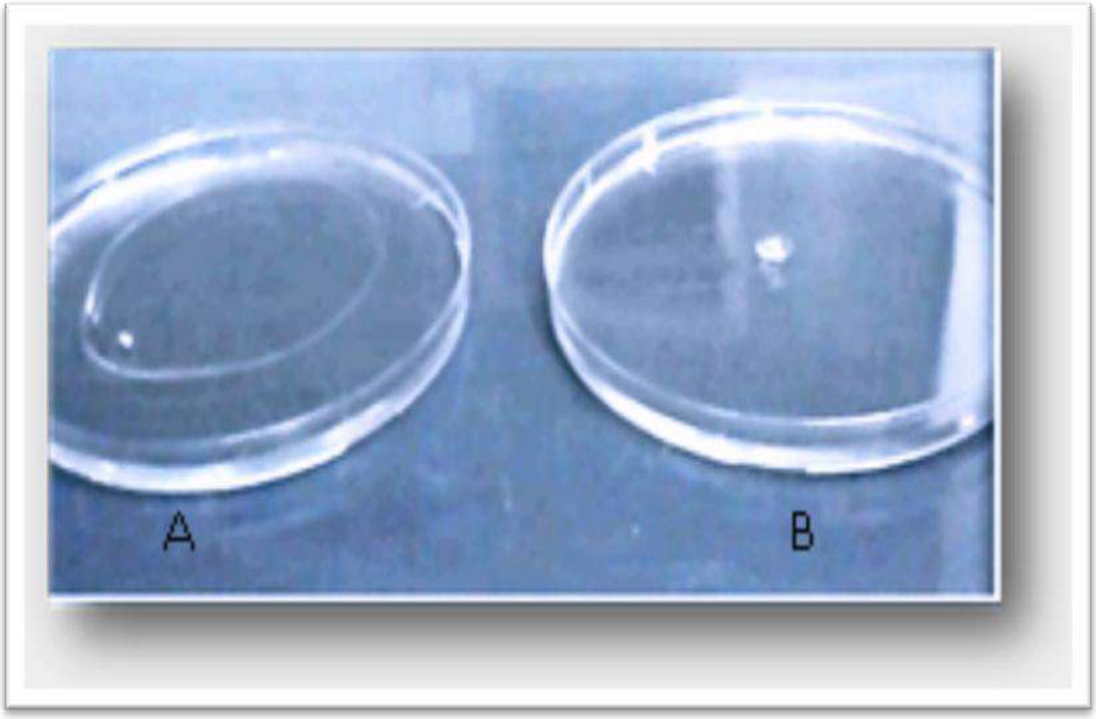


Figure III.15. Méthode qualitative d'oïl spearding

III.2.4.7 Capacité d'émulsification des extraits de lierre grimpant

La capacité d'émulsification et la stabilité de l'émulsion sont deux paramètres importants pour démontrer la possibilité d'utiliser les saponines extraites comme agents émulsifiants. Le Tableau III.7 illustre les variations de CE_{24} (Capacité d'émulsification) et SE (Stabilité de l'émulsion) en fonction de la concentration de saponines triterpéniques extraites de l'*Hedera hélix Algeriensis*. Les résultats montrent que la CE et la SE augmentent avec l'augmentation de la concentration des extraits de saponines triterpéniques.

Tableau III.7. Capacité d'émulsification et stabilité de l'émulsion

Concentration de saponines (%)	Capacité d'émulsification (CE) $_0$%	Capacité d'émulsification (CE) $_{24}$%	Stabilité de l'émulsion (SE)%
0.05	56.66	6.67	11.75
0.5	60.06	7.87	12.98
1	22.86	17.14	74.97
2	28.57	22.85	80

La Figure III.16 illustre l'influence du rapport volumique (E/H) sur le volume d'émulsion (ml). D'après les résultats obtenus, on constate qu'à la concentration micellaire critique (CMC = 0.05%), le volume d'émulsification est proportionnel au rapport volumique (E/H) et le meilleur rapport enregistré à cette concentration est de 80/20. Pour les concentrations supérieures à la CMC (0.5 et 1%), le plus grand volume d'émulsification est obtenu pour un rapport de 50/50. D'après ces résultats on peut conclure que l'efficacité de l'émulsification des systèmes huile /eau dépend de la concentration de surfactant et du rapport volumique de l'huile.

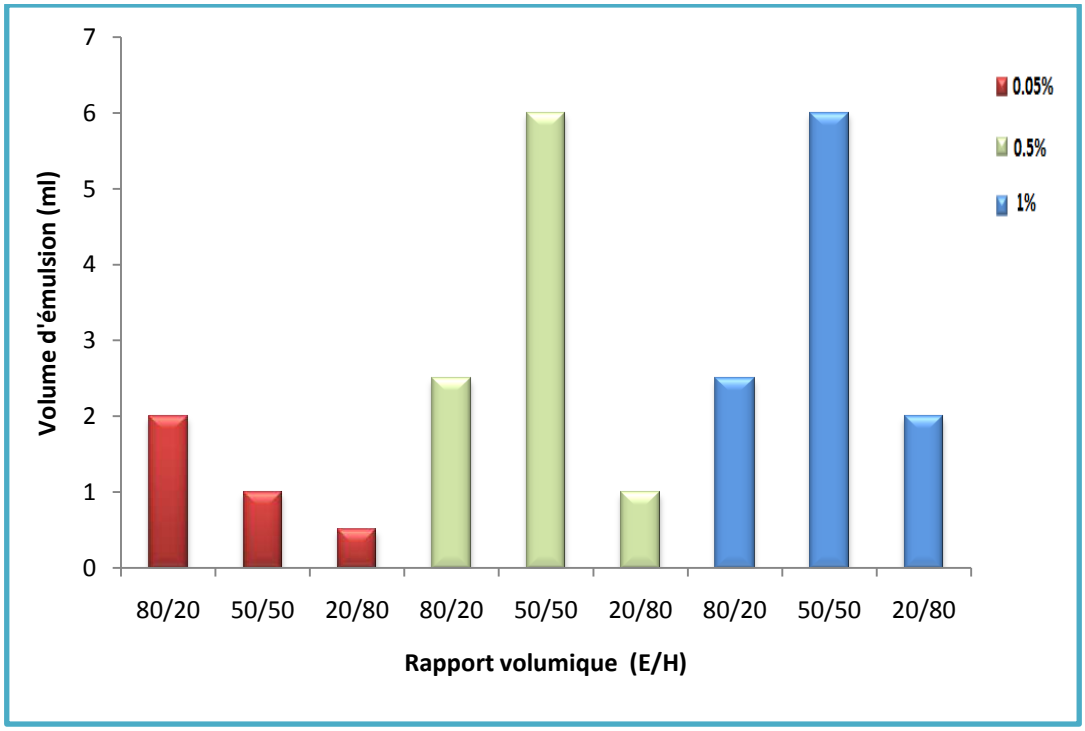


Figure III.16. Influence du rapport volumique (E/H) sur le volume de l'émulsion

III.3 Formulation et caractérisation des émulsions à base de saponines

III.3.1 Morphologie des émulsions

Les émulsions préparées sont facilement diluées dans une solution milli Q, ce qui implique que la nature des émulsions préparées est de type huile-dans-eau (H/E). Cette constatation est confirmée par la mesure de la conductivité à 20°C et, qui a été trouvé supérieure à celle de l'eau distillée.

L'analyse microscopique des émulsions fraichement préparées révèle la présence d'une dispersion parfaite des goulettes huileuses dans la phase aqueuse(Figure III.17). Ce résultat prouve la capacité d'émulsification des saponines extraites. L'extrait du lierre grimpant récupéré peut être utilisé comme bioémulsifiant efficace pour former des émulsions Huile-dans-eau (H/E).

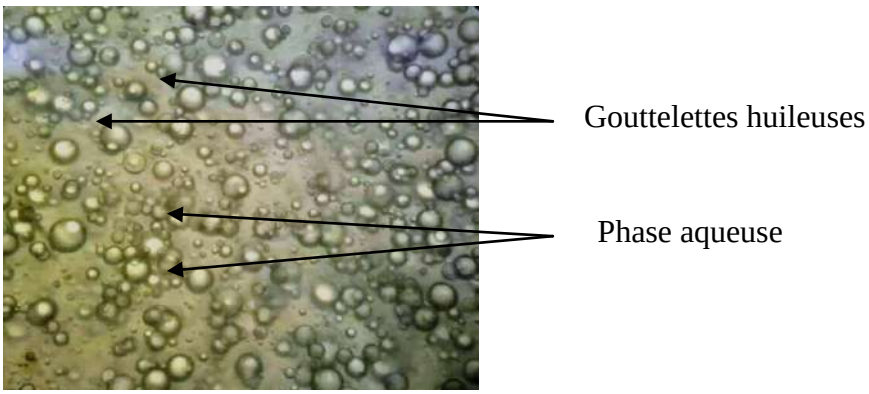


Figure III.17. Photo microscopique de l'essai n° 13
(Agrandissement 100 fois)

III.3.2 Caractérisation rhéologique

C'est à l'issu de l'ajustement des courbes d'écoulement par le modèle de Carreau, que la viscosité initiale η_0 et le temps de relaxation K ont été sélectionnés comme des caractéristiques rhéologiques des émulsions. Egalement, on a déterminé expérimentalement le comportement viscoélastique des émulsions suite à un test oscillatoire, en rampe de déformation. On enregistre alors une courbe donnant la variation du module de conservation (G') et du module de perte (G") en fonction de la déformation.

Les rhéogrammes associés pour toutes les émulsions présentent la première région newtonienne dans la gamme de faible cisaillement ($< 0.01s^{-1}$) et la deuxième région où le comportement est rhéfluidifiant. La Figure III.18 représente la courbe d'écoulement de l'échantillon 5 (choisi comme modèle).

Les courbes d'écoulement des émulsions préparées ont été ajustées par le modèle de Carreau (Eq.III.1) en utilisant le logiciel STATISTICA (version 8.0, StatSoftInc, France), qui offre une multitude de méthodes d'optimisation non linéaires se basant sur un calcul itératif.

Pour toutes les émulsions, le coefficient de régression R^2a été trouvé supérieur à 0.97, ce qui confirme le choix du modèle.

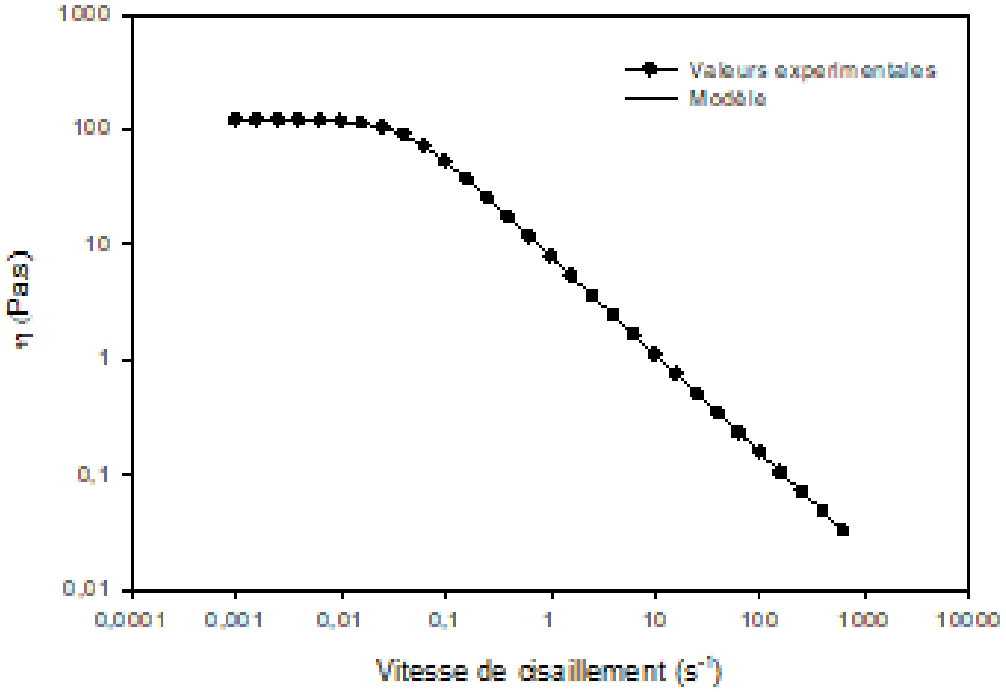


Figure III.18. Courbes d'écoulement de l'essai N°5

Le modèle rhéologique qu'on estime le plus représentatif est celui de Carreau (Eq III.1):

$$\frac{\eta-\eta\infty}{\eta 0-\eta\infty}=\frac{1}{(1+(\mathrm{K}\,\gamma)\hat{}\,\dot{2})\hat{}\,n} \qquad \text{(III.1)}$$

Où η_0 est la viscosité du palier Newtonien à faible vitesse de cisaillement, η est la viscosité apparente, η_∞ est la viscosité limite obtenue pour une vitesse de cisaillement infinie, $\dot{\gamma}$ est lavitesse de cisaillement, K représente le temps de relaxation des émulsions défini comme l'inverse de la déformation ($1/\dot{\gamma}$) et n est un paramètre adimensionnel compris entre 0 et 1 et pouvant être considéré comme un indice d'écoulement.

La Figure III.19 représente l'évolution du module de conservation G' et celui de perte G" en fonction de la déformation pour l'essai N°5 (choisi comme modèle). Le module G'représente le comportement élastique correspondant à l'énergie de déformation stockée dans l'échantillon pendant le cisaillement et, G"est la valeur approximative de l'énergie de

déformation utilisée dans le matériau pendant le cisaillement et perdu ultérieurement. Cette énergie est employée pendant le processus de changement de la structure ou dissipée dans l'environnement sous forme de chaleur. Le module G"représente le comportement visqueux.

Les courbes de viscoélasticités dévoilent que G'est supérieur à G", ce qui permet de déduire que les émulsions se comportent comme un solide viscoélastique où le comportement élastique domine sur le comportement visqueux. Cette mesure a permis de tirer le module de conservation au reposG'_0, et le module de perte au reposG''_0, représentés par le palier dans la courbe de la Figure III.19.

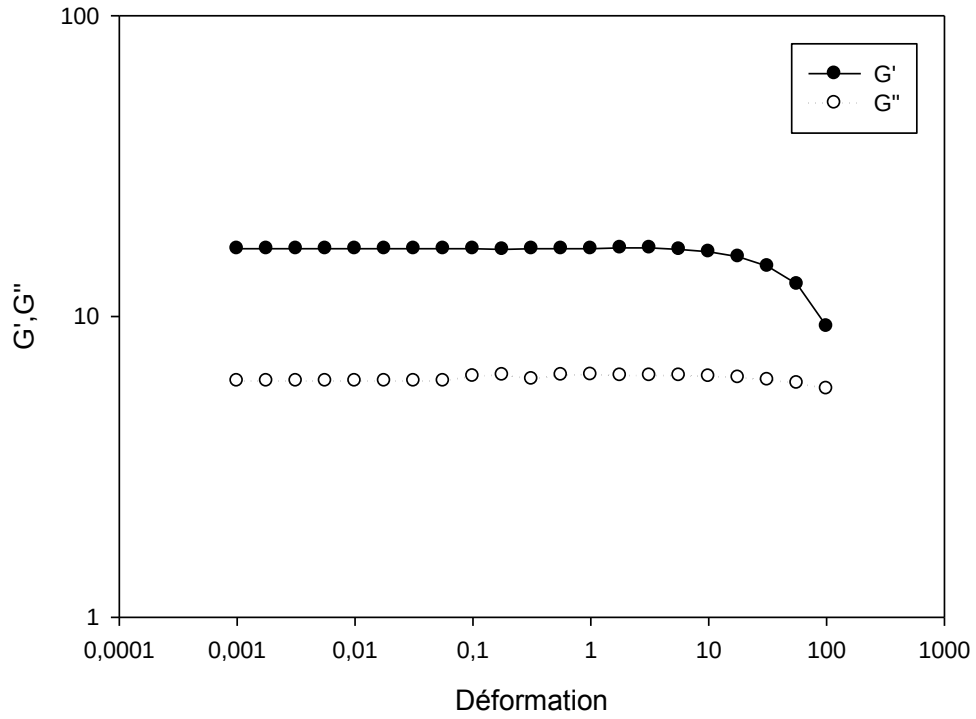


Figure III.19. Courbes de viscoélasticité de l'essai N°5

III.3.3. Modélisation en surfaces de réponses

Dans l'objectif de connaitre les réponses dépendantes utilisées dans le plan d'expérience de type cubic faces centrées (CCF), on explore les corrélations entre les réponses sélectionnées.

Au regard des valeurs des cinq réponses dans la matrice de corrélation (Tableau III.8), on remarque une forte corrélation entre G'_0, G''_0 et η_0. Donc ce n'est pas nécessaire de garder les trois réponses et, on propose de maintenir uniquement G'_0 et K comme réponses rhéologiques. La matrice d'expériences convenue aux valeurs expérimentales des paramètres rhéologiques est représentée dans le Tableau III.9.

Tableau III.8. Matrice de corrélation

	K	η_0	G'_0	G''_0	IC
K	1	-0.155076	-0.255641	-0.287680	0.239752
η_0	-0.155076	1	**0.968168**	**0.904532**	-0,680997
G'0	-0.255641	**0.968168**	1	**0.978153**	-0.737747
G''0	-0.287680	**0.904532**	**0.978153**	1	-0.759666
IC	0.239752	-0.680997	-0.737747	-0.759666	1

Tableau III.9. Matrice d'expériences

Essai	TA (%)	Xth(%)	Huile(%)	K	I-C (%)	G'_0
9	0.25	0.2	10	1.51	90	0.68
5	0.05	0.8	10	41.84	10	187.35
12	0.25	0.8	10	41.66	0	161.35
14	0.05	0.2	20	625	90	9.62
2	0.05	0.8	20	69.93	64	256.61
10	0.25	0.8	20	52.91	0	178.93
7	0.05	0.5	15	5.25	70	6.39
3	0.25	0.5	15	36.10	60	73.35
1	0.15	0.8	15	36.36	0	82.64
6	0.15	0.5	10	44.44	4	152.97
8	0.15	0.5	20	34.60	70	37.37
4	0.15	0.5	15	17.15	80	21.07
13	0.15	0.5	15	17.01	80	21.06
11	0.15	0.5	15	17.01	80	21.06

En se basant sur les valeurs des coefficients de régression (0.931, 0.940 et 0.889) pour K, G'_0 et I-C, respectivement) en termes d'ajustement et de prédiction, la qualité des modèles est satisfaisante. Les modèles polynomiaux exprimant chaque réponse (K, I-C et G'_0) en fonction des facteurs de formulation sont donnés respectivement par les équations suivantes:

$$K = 22{,}31 - 67{,}35X_1 - 127{,}57X_2 + 61{,}78X_3 + 10{,}68X_1^2 + 134{,}35X_2^2 + 13{,}51X_3^2 + 79{,}81X_1X_2 - 4{,}11X_1X_3 - 68{,}72X_2X_3 \quad \text{(III.2)}$$

$$G'_0 = 5{,}52 - 0{,}33X_1 + 7{,}64X_2 - 0{,}58X_3 + 0{,}66X_1^2 - 0{,}74X_2^2 + 4{,}25X_3^2 - 0{,}68X_1X_2 - 0{,}84X_1X_3 + 1{,}90X_2X_3 \quad \text{(III.3)}$$

$$I - C = 65{,}76 + 3{,}80X_1 - 31{,}66X_2 + 24{,}20X_3 - 9{,}90X_1^2 - 12{,}75X_2^2 - 18{,}09X_3^2 - 24{,}50X_1X_2 - 13{,}50X_1X_3 - 8{,}50X_2X_3 \quad \text{(III.4)}$$

Les Figures III.20-A, III.20-B et III.20-C dévoilent une bonne concordance entre les valeurs expérimentales et celles prédites par les modèles avec un coefficient de corrélation supérieur à 0.9 pour les réponses K et G', ce qui signifie que les modèles sont statistiquement significatifs, alors que le modèle représentatif de I-C (0.889) peut être considéré comme statistiquement non significatif.

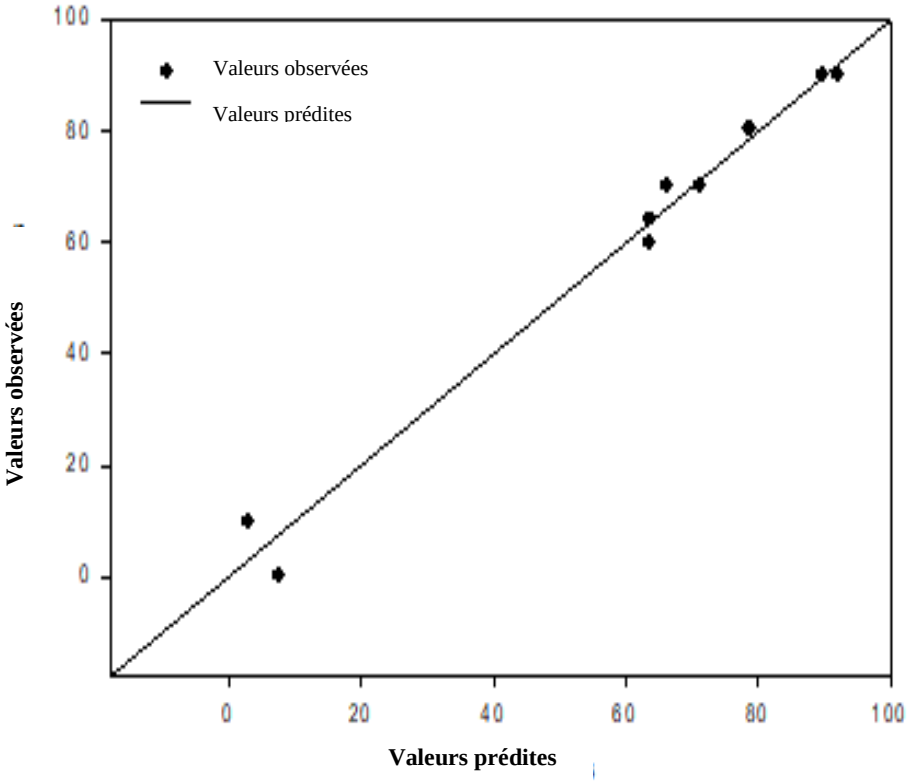


Figure III.20-A. Comparaison des valeurs prédites et observées de I-C

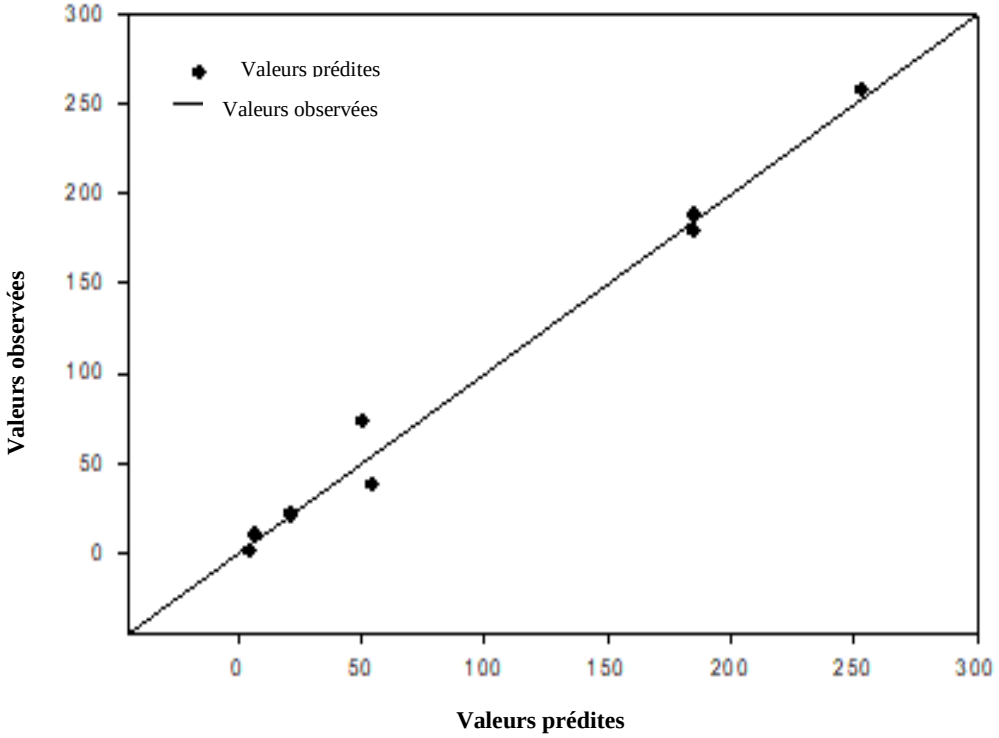


Figure III.20-B. Comparaison des valeurs prédites et observées de G'_0

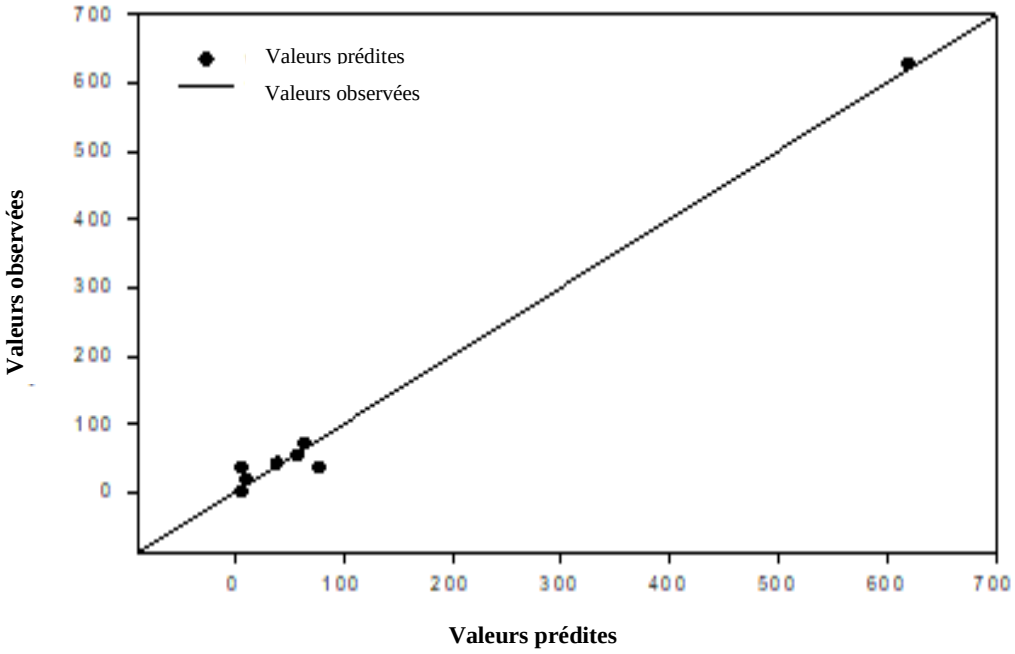


Figure III.20-C. Comparaison des valeurs prédites et observées de K

Le Tableau III.10 représente les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) pour les réponses (K, G'_0 et I-C) ; le rapport F est employé pour déterminer la signification statistique des deux réponses. C'est une proportion de deux estimations indépendantes de l'erreur expérimentale et, la valeur P quantifie le risque d'erreur.

Les résultats obtenus révèlent que les trois modèles sont statistiquement significatifsen se basant sur les valeurs de F pour K, G'_0et I-C (6.0082, 6.9443 et 3.5617) et les faibles valeurs de P ($p<0.05$) pour K et G'_0.Cependant, la valeur de p pour I-C est relativement supérieure ($p>0.05$), Ce qui explique que les valeurs de I-C sont non significatives statistiquement (P = 0.117). On peut conclure que I-C est une faible réponse qualitative.

Tableau III.10. Analyse de la variance (ANONA)

Source		SC	DL	CM	F	P
Modèle	G'_0	452.163	9	50.1403	6.9443	0.039
	K	303548	9	33727.6	6.0082	0.05
	IC	16191.3	9	1799.04	3.5617	0.117
Résidus	G'_0	28.939	4	7.2347		
	K	22454.1	4	5613.53		
	IC	2020.39	4	505.096		
Erreur pure	G'_0	0.12166	2	0.0608		
	K	03974	2	0.1987		
	IC	$9.09e^{-013}$	2	$4.54e-^{013}$		

III.3.4 Effets des facteurs de formulation sur les propriétés des émulsions

III.3.4.1 Propriétés rhéologiques

La Figure III.21 montre que le xanthane a un effet important sur G'_0(module élastique) indépendamment des quantités de saponines et de l'huile utilisées. En effet, le polysaccharide de grand poids moléculaire joue le rôle d'épaississant, en formant un réseau polymérique au sein de l'émulsion qui renforce la cohésion de la structure. L'augmentation de la concentration de xanthane fait croitre le module de rigidité par l'accroissement du nombre de macromolécules du biopolymère. Ce caractère est expliqué par l'enchevêtrement des bâtonnets rigides de xanthane formant un réseau par des interactions ioniques et hydrogènes imposant une rigidité élevée du milieu. Aussi, on note que les saponines triterpéniques n'influent pas sur la rigidité du milieu jusqu'à une concentration de 0.15% ; au-delà de cette

concentration, il semble que les saponinespossèdent un effet relativement significatif selon la quantité d'huile utilisée.

En effet, pour une concentration d'huile de 10%, l'augmentation des saponines au-delà de 0.15% influe négativement sur G'_0tandisque pour une concentration d'huile de 15 ou 20%, G'_0augmente au-delà de cette concentration critique de saponines. Selon Holmoberg [149], les surfactants au-delà d'une certaine concentration forment des larges micelles qui s'enchevêtrent sous forme de polymères et permettent de viscosifier le milieu et par ailleurs augmenter la rigidité de l'émulsion. Ce résultat est en accord avec les travaux de Wojciechowski [150] qui a démontré que la phase hydrophobe possède un remarquable impact sur les propriétés rhéologiques. Ainsi, l'augmentation de G'_0est peut être due à l'emprisonnement des gouttelettes d'huile au sein du réseau polymérique du xanthane empêchant ainsi les gouttelettes de se floculer.

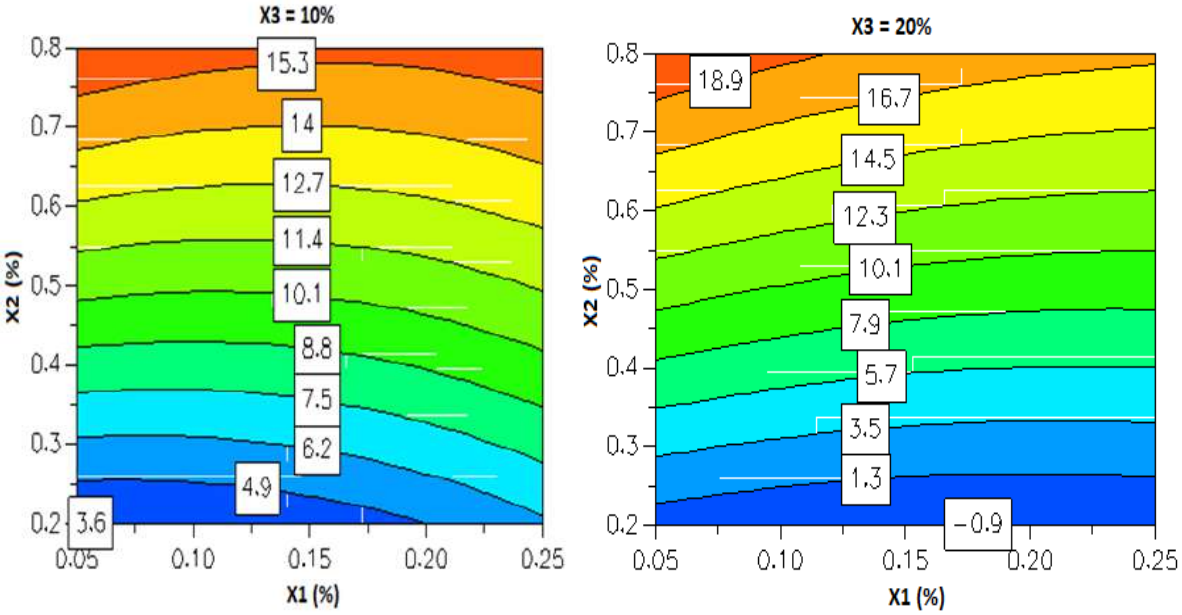


Figure III.21. Effet des facteurs de formulation sur G'_0

La gomme xanthane semble réduire K (temps de relaxation) dans tous les cas de la variation des autres constituants (Figure III.22). En outre, le paramètre K qui caractérise l'intervalle de la région newtonienne décroit avec l'augmentation de la concentration de xanthane ; en conséquent, l'augmentation de la quantité de xanthane fait croitre les interactions hydrophobes installé entre les chaines enchevêtrer. Sous l'effet du cisaillement, une réorganisation des liaisons s'établi pour former des intra-chaines hydrophobiques ce qui explique le phénomène rhéfluidifiant. Ce comportement est typique au polymère observé particulièrement pour les polysaccharides semi flexible [151,152]. Ce résultat est en harmonie

avec ceux accompli par Ghannam et Rodd [153, 154] qui indique que le xanthane est un polysaccharide avec des propriétés rhéfluidifiante résistantes.

En ce qui concerne l'effet du surfactant, selon les iso-réponses de la Figure III.22, il est clair que les saponines possèdent un effet négatif sur le temps de relaxation ; aussi la vitesse de cisaillement diminue avec l'augmentation de la concentration des saponines triterpéniques. Ce résultat indique que les saponines triterpéniques possèdent également une capacité rhéfluidifiante robuste. Néanmoins, les émulsions diluées manifestent un comportement newtonien [155].

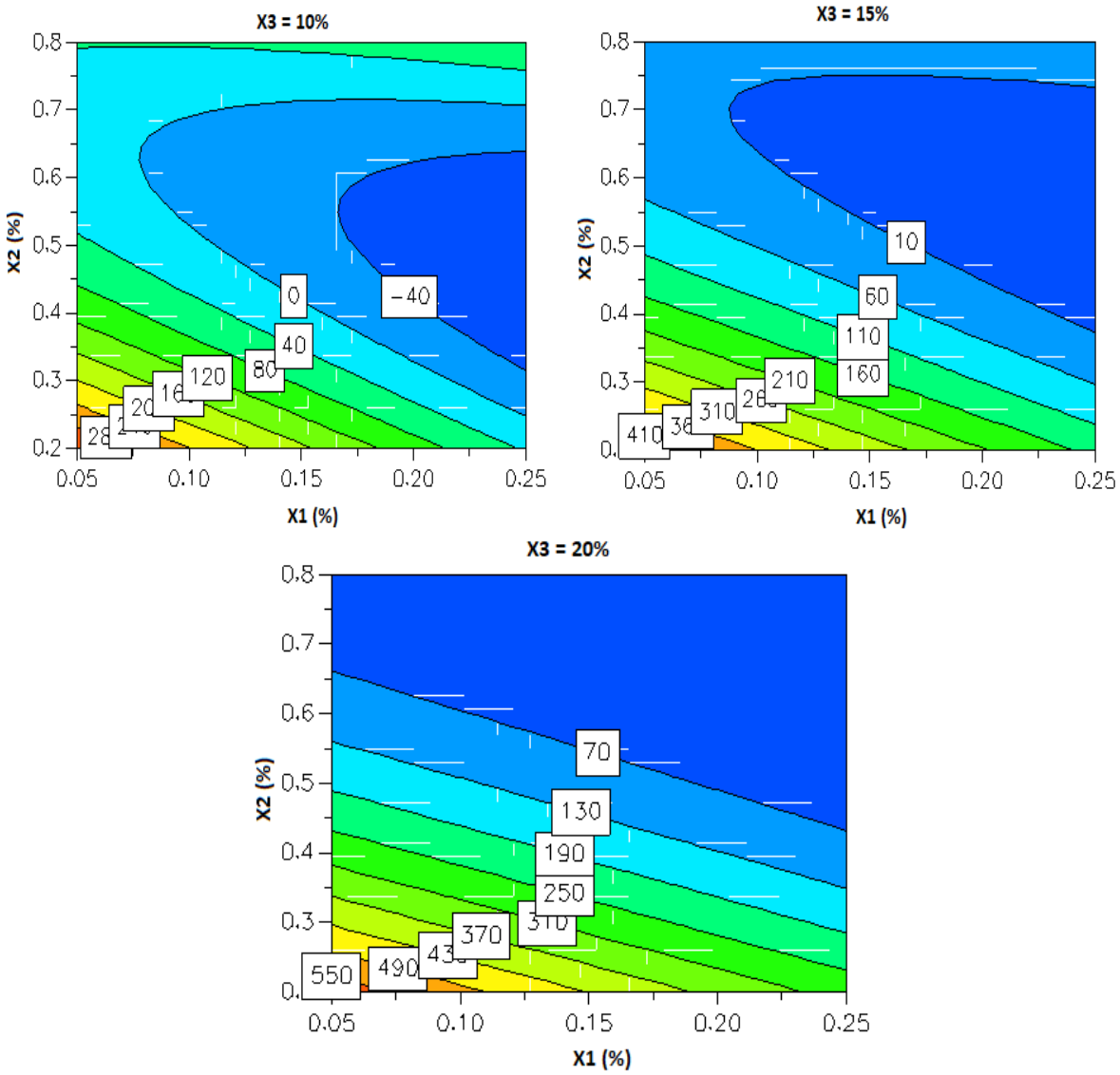


Figure III.22. Effet des facteurs de formulation sur (K)

III.3.4.2 Stabilité des émulsions

La stabilité des émulsions est calculée par l'évaluation de l'indice de crémage (I-C). La Figure III.23 représente les iso-réponses de I-C. L'examen de cette figure révèle que le xanthane abaisse considérablement l'indice de crémage (I-C) dans tous les cas de figure. Ce polysaccharide améliore la stabilité de l'émulsion en jouant le rôle d'un épaississant en empêchant les gouttelettes de se floculer. Ce résultat est en accord avec les travaux des auteurs qui ont utilisé ce polymère pour la stabilité des émulsions [156,157]. Pour l'influence des extraits de saponines sur I-C, il apparait que l'augmentation de la concentration en saponines influe négativement sur I-C pour une concentration d'huile de 10%. A cette concentration, la quantité de saponines inadsorbées est importante ; les molécules tensioactives libres peuvent interagir négativement par ségrégation avec le xanthane et donc abaisser l'homogénéité de l'émulsion par floculation des gouttelettes huileuses.En revanche, pour une concentration d'huile de 20% et une concentration de xanthane en dessous de 0.35%, les saponines n'ont aucun effet car la quantité de xanthane est insuffisante pour interagir négativement avec les quantités de saponines utilisées. Au-delà de cette concentration, l'effet de saponines triterpéniques devient positif car les surfactants occupent toute l'interface huileuse empêchant la floculation des gouttelettes d'huiles et améliore ainsi la stabilité de l'émulsion. L'effet le plus significatif correspond à la concentration maximale d'huile et de surfactant.

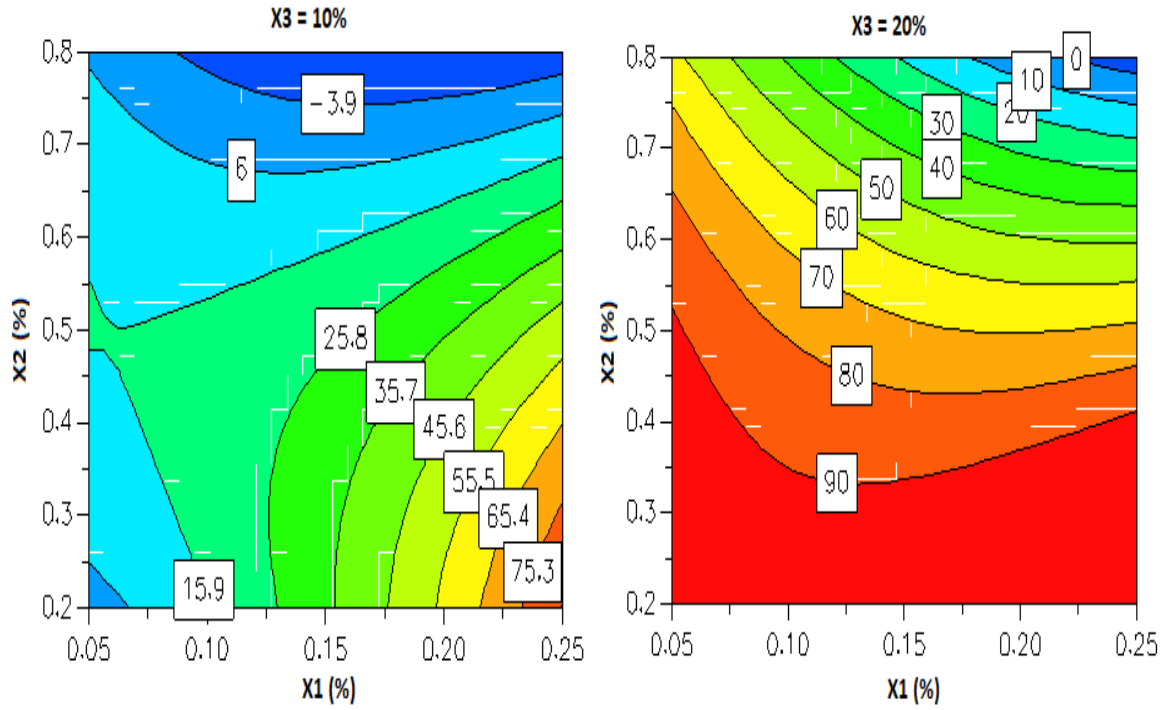


Figure III.23. Effets des facteurs de formulation sur I-C

III.4 Formulation et caractérisation d'un gel antibactérien à base de saponines

III.4.1 Introduction

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 au comportement similaire à celui de la référence. Le gel choisi est un gel hydro-alcoolique désinfectant pour les mains commercialisé sous le nom de Manigel ; il est constitué d'alcool éthylique, de carbopol, de propylène glycol, de parfum et d'eau déminéralisée.

III.4.2 Optimisation de la concentration de xanthane pour la formulation du gel

L'étude viscoélastique du gel antibactérien commercial (Manigel) utilisé comme référence est déterminé afin d'optimiser la quantité de l'agent gélifiant (xanthane) pour formuler un gel de comportement similaire. La Figure III.24 illustre l'évolution de G'et G" en fonction de la déformation.

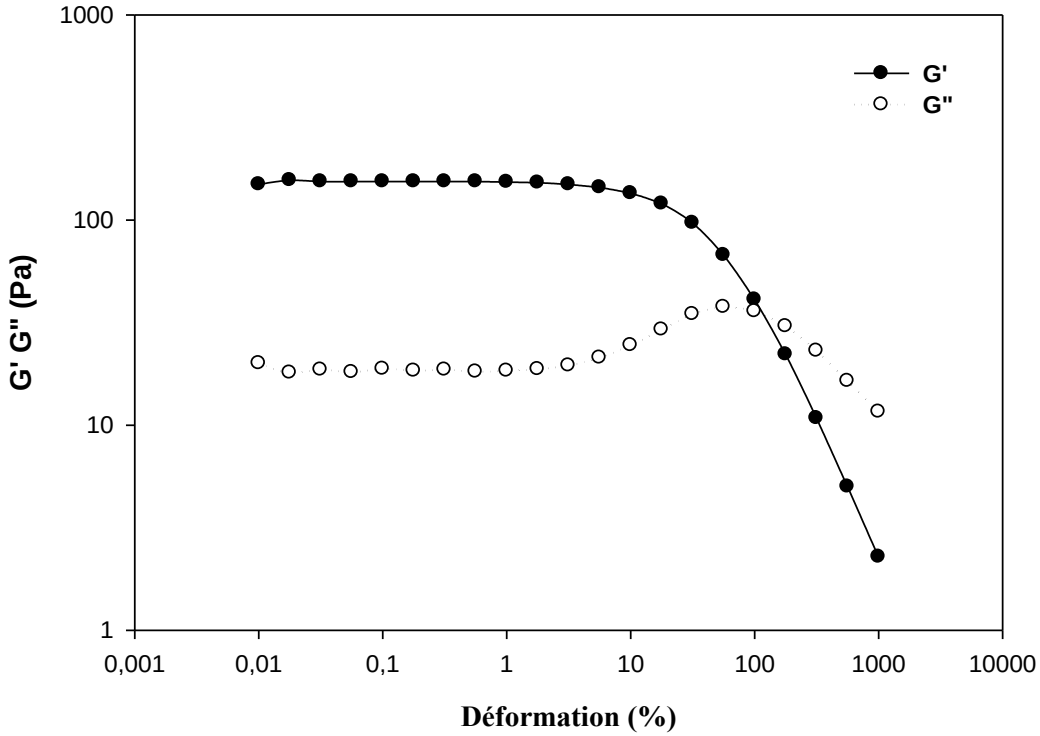


Figure III.24. Variation du module de G' et G" du gel de référence (T = 20 °C, F = 1 Hz)

On remarque qu'aux faibles déformations, un palier est enregistré ; il correspond au domaine de la viscoélasticité linéaire oùG' et G"sont constants et donc ne dépendent pas de la sollicitation. Aussi, G'>G", ce quiindique que le gel se comporte comme un solide. Dans ce domaine, la déformation est réversible au sens élastique. 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 et au-delà du point gel, le produit se comporte comme un liquide viscoélastique [158].

La Figure III.25 illustre le comportement viscoélastique du gel de référence ainsi que celui des quatre essais réalisés dans les mêmes conditions. Les paramètres importants qu'on pourrait ressortir de ce test sont le module de rigidité au repos (G'_0) et le point de gélification (γ_l). Au vu de ces courbes, on remarque que le comportement des gels à base de xanthane (GX) est comparable à celui du gel de référence. On remarque aussi que la rigidité augmente avec la concentration de GX traduisant le rôle souhaité de ce polysaccharide considéré comme un agent gélifiant et épaississant.

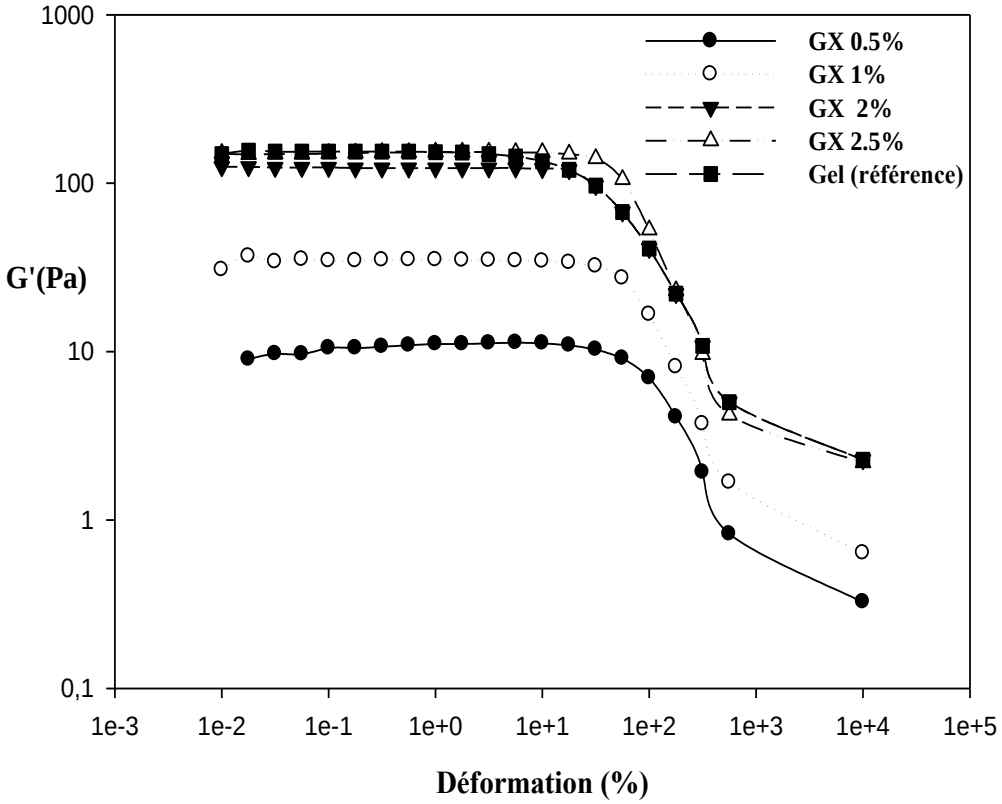


Figure III.25. Variation du module d'élasticité (G') du gel de référence et des essais réalisés à base de GX (T=20°C, F=1 Hz)

Le Tableau III.11 résumé les paramètres rhéologiques de l'étude viscoélastique des essais des gels à base de GX et du gel commercial. A noter que le gel de référence ne contient pas les mêmes ingrédients que le gel formulé, donc on a jugé inutile de rechercher exactement la même rigidité. On s'est basé alors sur celui qui donne une rigidité proche du produit de référence. D'après l'examen des résultats obtenus, il semble que l'essai contenant 2% (en masse) de GX correspond au mieux et donc il a été choisi comme solution optimale pour la suite de cette étude.

Tableau III.11.Paramètres rhéologiques de l'étude viscoélastique

Tests	$\mathbf{G'_0}$ (Pa)	(γ_L)(G' = G") (%)
Référence	135.10	116.26
0.5% GX	11.19	3.31
1.0% GX	34.87	11.19
2.0% G X	127.93	115.01
2.5% GX	167.43	102.41

Les courbes d'écoulement du gel de référence et celles des gels de GX en termes de viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement révèlent une similitude dans leur comportement (Figure III.26). Il apparait clairement la présence de 2 zones distinctes, une zone au comportement Newtonien dans la gamme de faible cisaillement (< 0,01 s^{-1}), une deuxième zone rhéofluidifiante et l'apparition d'une troisième zone au fort cisaillement au comportement Newtonien pour le produit de référence.

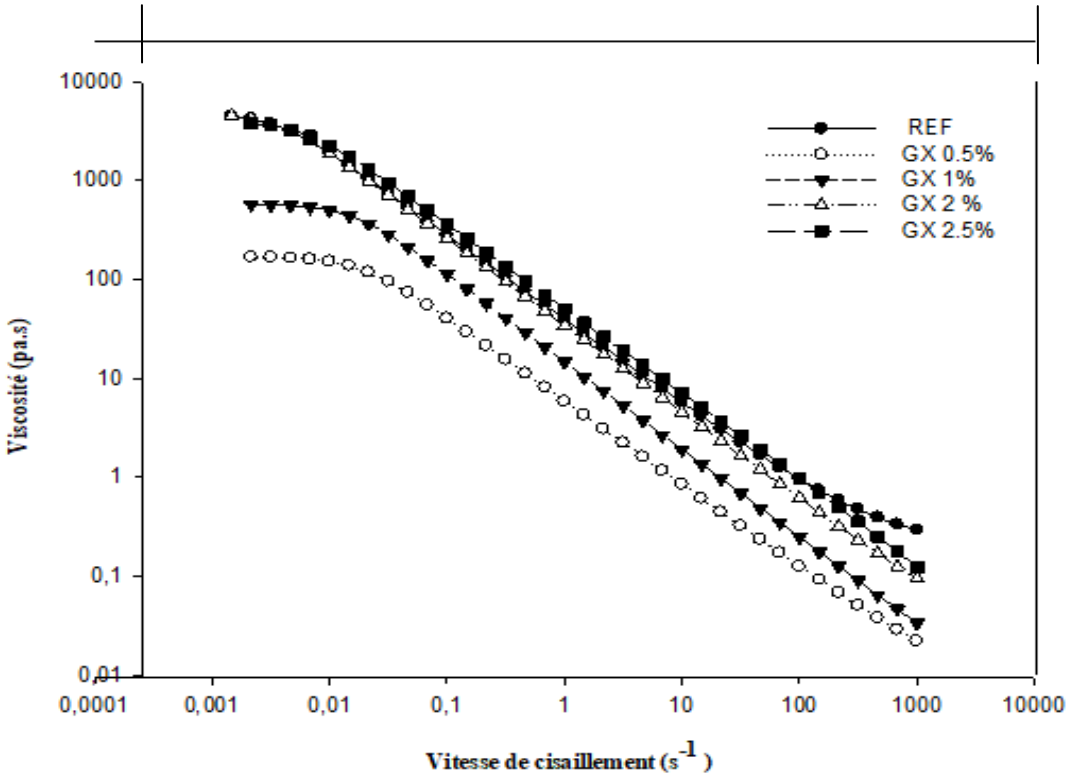


Figure III.26. Courbes d'écoulement des gels de GX et du gel de référence.

La modélisation rhéologique des courbes d'écoulement expérimentales par le modèle de Carreau permet de faire ressortir les paramètres caractéristiques représentatifs du comportement des gels de GX et du produit de référence. Les paramètres de la modélisation rhéologique des différents essais et celui du gel commercial, ainsi que la qualité de l'ajustement exprimée par R^2 sont présentés dans le Tableau III.12.

Tableau III.12 Paramètres rhéologiques

	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
GX 1%	580.59	0.001	0.015	0.44	0,99
GX 2%	4879.10	0.015	0.003	0.43	0,99
GX 2.5%	4004.72	0.014	0.006	0.42	0,99
Référence	4862.83	0.018	0.003	0.42	0.99

Les courbes d'écoulement du gel commercial (référence) et de la solution contenant 2% de GX sont similaires ; elles obéissent au même modèle (modèle de Carreau) avec un coefficient de régression (R^2 =0.99), ce qui justifie le choix du modèle. Par ailleurs, les résultats du test viscoélastique et du test d'écoulement des solutions de GX justifient également le choix de la solution contenant 2% de GX pour la formulation du gel antibactérien.

III.4.3 Propriétés du gel antibactérien

III.4.3.1 pH du gel

Le pH du gel obtenu est égal à 6.26, c'est un pH favorable et conforme aux normes. La peau possède un pH légèrement acide pH (5.5-6.5), ce qui permet au film hydrolipidique de fournir une défense contre l'environnement externe. Le gel doit avoir un pH approprié pour ne pas perturber l'équilibre du film hydrolipidique. Selon la littérature [159], le pH des produits cosmétiques doit être entre 4 et 7 pour une peau saine.

III.4.3.2. Propriétés rhéologiques

L'allure des courbes d'écoulement de la référence (Gel Manigel) et du gel formulé sont similaires aussi bien que celui de gel à base de GX (2%) comme la montre la Figure III.27.

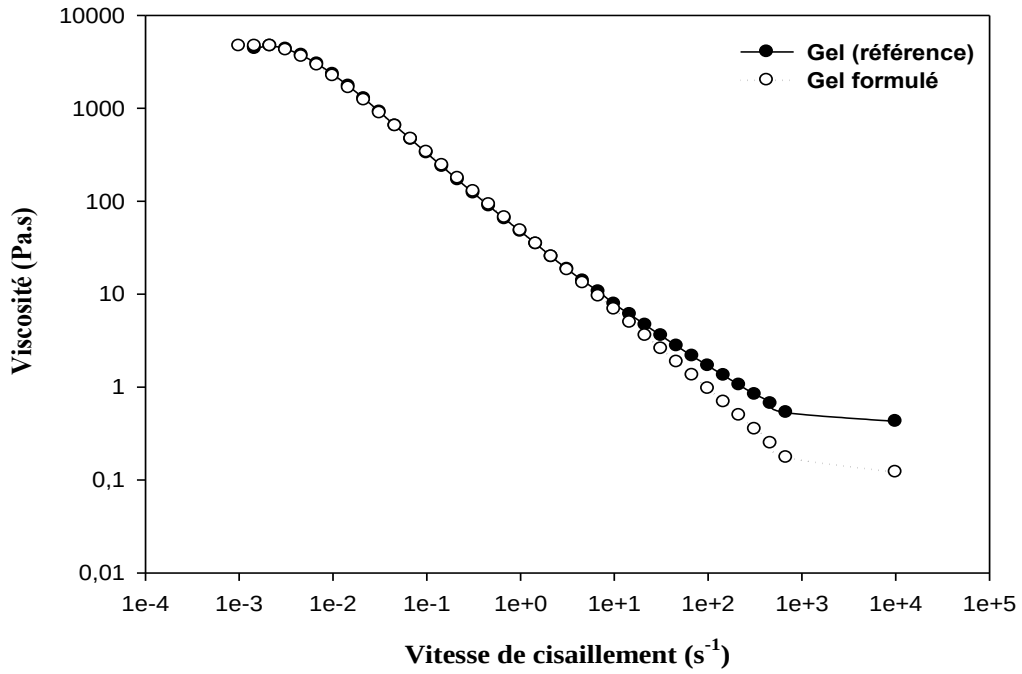


Figure III.27.Courbes d'écoulement du gel formulé et du gel de référence.

Les paramètres de la modélisation rhéologique obtenus après ajustement sont présentés dans le Tableau III.13. Il est à noter que l'ajout de saponines n'influe pas sur les propriétés rhéologiques du gel. Les valeurs des paramètres rhéologiques restent presque constantes.

Tableau III.13. Paramètres rhéologiques du modèle de Carreau.

	η_0	η_∞	$\dot{\gamma}_C$	n	R^2
Gel formulé	5028.57	0.016	0.003	0.42	0.99
Gel (2% GX)	4879.102	0.015	0.003	0.43	0.99
Gel Référence	4862.839	0.018	0.003	0.42	0.99

La Figure III.28 montre l'évolution des modules G' et G" en fonction de la fréquence dans le domaine linéaire (γ = 1%). Le gel présente un comportement de fluide purement rigide (G'>G") dans tout le domaine de fréquence étudié, ce qui démontre la stabilité du gel formulé au cours du temps.

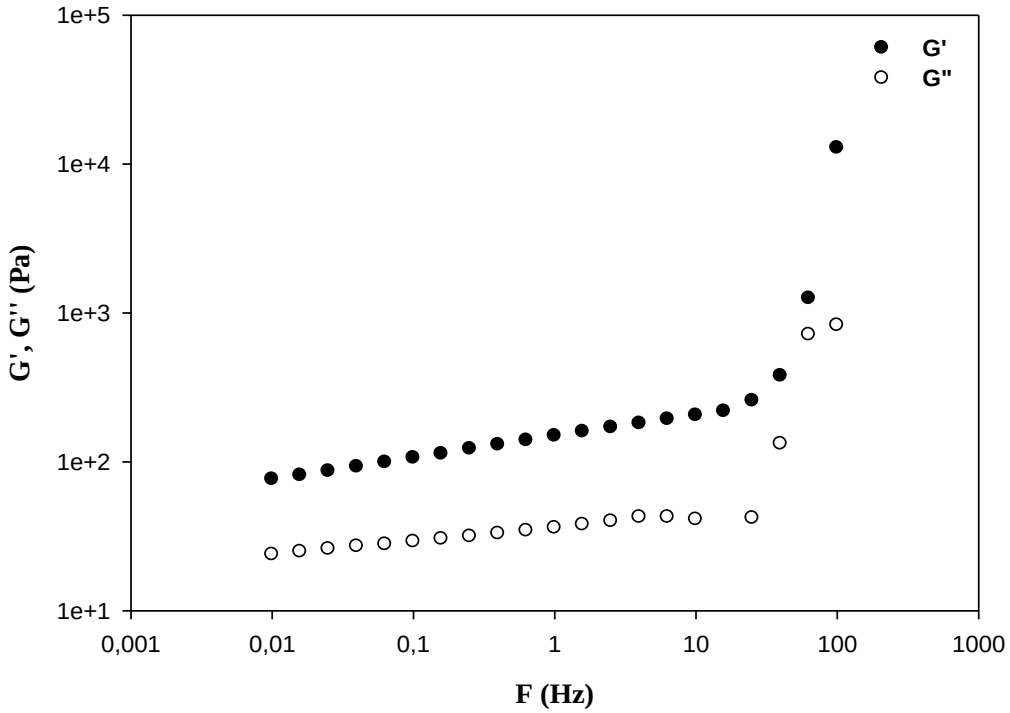


Figure III.28. Tests de fréquence du gel final

L'étude de la rampe de température est réalisée afin de mettre en évidence le phénomène d'agrégation et de gélification des biopolymère en solution. Pendant le refroidissement, la transition devrait se manifester par une augmentation brutale des modules viscoélastiques à une certaine température qu'on appelle la température critique de refroidissement (Tc).

Cette augmentation est due à la formation d'agrégats qui conduit à un liquide viscoélastique ou à un gel [160]. Pendant le chauffage, la transition se manifesterait par une diminution brutale des modules de rigidité et de perte 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 III.29. Au vu des courbes obtenues pour G' et G", la stabilité du gel pendant le chauffage est remarqué. Ainsi, les modules viscoélastiques demeurent constants, tout en conservant leur comportement de solide (G' >G"). Par contre, au cours du refroidissement, une augmentation brutale de G' et G" est observée. Ce même phénomène a été observé par d'autres auteurs en utilisant le carraghénnane [161].

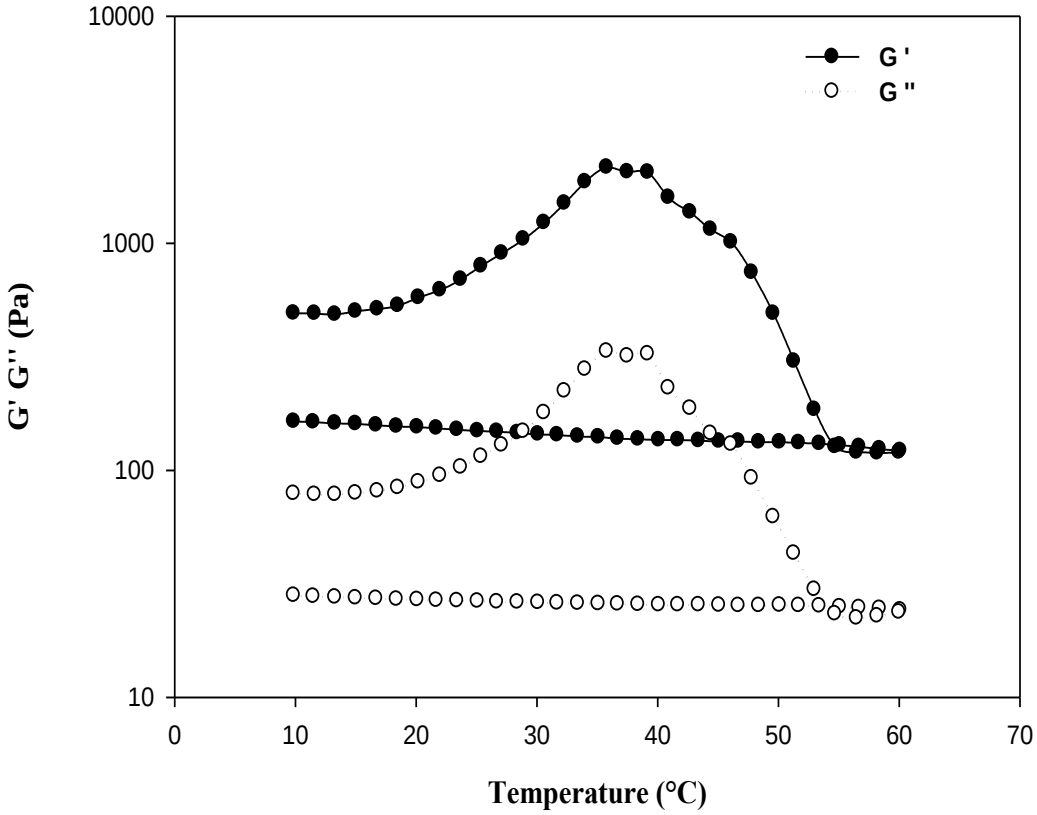


Figure III.29. Variation de G' et G" en fonction de la température

III.4.3.3 Evaluation de l'activité antibactérienne

Les résultats du test antibactérien contre les quatre microorganismes sélectionnés en utilisant la diffusion sur milieu gélosé montrent une activité antibactérienne importante présentée par la réduction significative de la croissance bactérienne dans la zone d'inhibition. L'action du gel commercial et du gel optimal est déterminée par le diamètre du halo d'inhibition (Tableau III.14).

Le gel optimal présente une activité bactéricide très significative contre la bactérie à gram négative*(Pseudomonas aeroginosa*) avec une zone d'inhibition de 35mm. Par contre, on enregistre une légère activité bactéricide pour la bactérie*(E.coli).* Pour les bactéries à gram positive (*Staphylococcus aureus* et *Bacilluss pp*), l'activité bactéricide du gel optimal est importante avec une zone d'inhibition de 22 et 34 mm, respectivement.

Tableau III.14. Résultats de l'activité antibactérienne in vitro.

Souches bactériennes		*Bacillusspp*	*Staphylococcus Epidermidis*	*Pseudomonas Aeroginosa*	*Escherichia coli*
Diamètre d'inhibition (mm)	Gel formulé	34	22	35	9.4
	Gel de référence	35	21	10	7.8

III.5. Conclusion

Au terme de cette étude, on peut faire quelques conclusions :

- La plante *Hedera hélix* d'origine Algérienne possède des constituants à effet bactéricide et le responsable majeur de ces effets sont les saponines triterpéniques,
- L'extraction assistée par induction électromagnétique et par micro-ondes ont montré leur efficacité dans l'extraction des saponines triterpéniques,
- L'extraction assistée par micro-ondes est la technique de choix pour l'extraction des saponines triterpéniques pour un rendement d'extraction de 1.22%, une quantité de solvant minimale et un court temps d'extraction,
- La chromatographie sur colonne a permis d'isoler deux saponines triterpéniques de différents poids moléculaires dotés d'une activité microbienne importante,
- Les résultats de la caractérisation par FT-IR, CCM, RMN ont confirmé la présence des saponines terpéniques dans l'extrait récupéré,

- L'extrait récupéré a montré une activité tensioactive intéressante, ce qui a permis son utilisation comme bioémulsifiant dans la formulation des émulsions H/E,
- Les saponines triterpéniques extraites n'ont pas un effet propre sur les propriétés rhéologiques des émulsions,
- La caractérisation rhéologique du gel de référence a permis d'optimiser la concentration de l'agent gélifiant (gomme xanthane) pour la formulation du gel,
- Le résultat de l'étude microbiologique du gel formulé in-vitro a révélé une activité antibactérienne satisfaisante.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La croissance de l'industrie pharmaceutique et le développement incessant de nouveaux produits médicamenteux synthétiques et biologiques plus efficaces n'a pas diminué l'importance des plantes médicinales dans beaucoup de sociétés. Au contraire, la croissance démographique dans le monde en développement et l'intérêt croissant manifesté dans les nations industrialisées ont considérablement augmenté la demande pour les plantes médicinales pour leurs principes actifs à effet thérapeutique.

Le présent travail est un projet de recherche visant à la mise en évidence et l'identification de nouveaux produits naturels d'origine végétale issus de la biodiversité méditerranéenne et, utilisés postérieurement pour un usage pharmaceutique.

L'objectif de cette étude était la valorisation de la plante *Hedera hélix* appartenant à la flore Algérienne dont le but d'extraire des principes actifs ayant une bioactivité potentielle. On s'est intéressé en particulier à l'effet bactéricide des substances extraites à partir des feuilles de cette plante. Ces substances ont été étudiées seules ou bien encapsulées dans des émulsions ou dans des gels.

L'extraction des saponines triterpéniques à partir de la plante *Hedera hélix* est assurée par trois méthodes distinctes : Extraction assistée par micro-ondes, extraction par induction électromagnétique et extraction par macération. Le meilleur rendement d'extraction obtenu est celui de l'extraction assistéepar micro-ondes qui était de l'ordre de 1.22% pour un temps d'extraction de 10 min en utilisant une quantité de solvant minimale. Ainsi, il s'est avéré que l'extraction assistée par micro-ondes est la méthode de choix pour l'extraction des saponines triterpéniques.

Les résultats du criblage des métabolites secondaires ont montré que les feuilles de la plante *Hedera hélix* sont très riches en saponines.

Les résultats de la caractérisation physicochimique de l'extrait récupéré par formation de mousse, CCM, FT-IR et RMN ont confirmé que l'extrait ainsi obtenu appartient à la famille des saponines de type triterpéniques.

Cet ingrédient actif est un bio-émulsifiant efficace ; il possède une bonne activité de surface et il est efficace pour la formation des émulsions (H/E) à des basses concentrations et pour un rapport volumique de l'émulsion optimal (80/20).

La planification des essais a été accomplie suivant un plan d'expérience type CCF qui avait comme objectif une modélisation en surfaces de réponses (RSM), utilisé pour

déterminer l'effet des facteurs de formulation sur les propriétés rhéologiques et la stabilité des émulsions.

D'après les résultats obtenus, il a été trouvé que les saponines triterpéniques n'ont pas un effet propre sur les propriétés rhéologiques des émulsions, mais contribuent fortement à sa stabilité en s'interagissant avec les autres excipients de l'émulsion. Aussi, on a noté que la phase hydrophobe possède un remarquable impact sur les propriétés rhéologiques. Les émulsions à base de saponines triterpéniques exhibaient un comportement rhéfluidifiant et viscoélastique.

Cette étude prouve que la plante *Hedera hélix* riche en saponines triterpéniques peut être exploitée comme source de surfactants naturels, biodégradables et renouvelables.

Cette étude démontre aussi selon les résultats biologiques que l'extrait de saponines triterpéniques possède une activité antibactérienne remarquable.

Le deuxième volet de ce travail était la formulation d'un gel naturel à base de gomme xanthane doté de propriétés antibactériennes. Il a démontré que le gel formulé à base de saponines triterpéniques comme agent antibactérien et de la gomme xanthane comme épaississant se comporte pareillement au gel commercial utilisé comme référence (Manigel).

La caractérisation rhéologique du gel formulé et du gel de référence a permis l'optimisation de la concentration de la gomme xanthane qui a été trouvée égale à 2% (en masse).

Les résultats de la caractérisation rhéologique (test d'écoulement, viscoélasticité, rampe de température et test de fréquence) du gel formulé ont montré que ces caractéristiques sont proches de celles du gel de référence ; il est stable dans le temps et résiste à la chaleur. Cette caractérisation a été suivie par une étude microbiologique du gel formulé in vitro qui a révélé une activité antibactérienne captivante.

A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que la plante *Hedera hélix* appartenant à la flore algérienne peut servir comme une source utile et inépuisable de substances bioactives. Ce travail a contribué à l'enrichissement de la base de données des saponines, en indiquant que le genre *Hedera* est également une source de saponines dans la famille des araliacées.

Il serait intéressant de poursuivre les recherches dans cet axe en étudiant les autres propriétés biologiques des saponines triterpéniques à savoir, l'activité anti-brulure, antioxydante et antispasmodique. Il est également intéressant de recommander l'utilisation de ce principe actif comme ingrédient dans des produits pharmaceutiques, cosmétiques, et parapharmaceutiques produits localement.

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

[1] Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S., Bollinger, W.H. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. Science, 1985, 228, 1154-1160.

[2] Seidl, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, 2002, 74, 145-150.

[3] Stauss-Grabo, M., Atiye, S., Warnke, A., Wedemeyer, R.S., Donath, F., Blume, H.H. Observational study on the tolerability and safety of film-coated tablets containing ivy extract (Prospan® Cough Tablets) in the treatment of colds accompanied by coughing. Phytomedicine, 2011, 18, 433-436.

[4] Melzer, B., Seidel, R., Steinbrecher, T., Speck, T. Structure, attachment properties, and ecological importance of the attachment system of English ivy (Hedera helix).Journal of Experimental Botany, 2012, 63(1), 191-201.

[5] Cwientzek, U., Ottillinger, B.,Arenberger, P. Acute bronchitis therapy with ivy leaves extracts in a two-arm study. A double-blind, randomised study vs. ivy leaves extract. Phytomedicine, 2011, 18, 1105-1109.

[6] Green, A.F., Ramsey, T.S., Ramsey, J. Phylogeny and biogeography of ivies (Hedera spp., Araliaceae), a polyploid complex of woody vines.Systems Botany, 2011, 36, 1114-1127.

[7] Ferrara, L., Naviglio, D., Faralli, S. Identification of active principles of Hedera helix L. in aqueous extracts.The Journal of Phytochemistry-Photon, 2013,114, 170-175.

[8] Sareedenchai, V.,Zidorn, C. Sequestration of polyacetylenes by the parasite Orobanche hederae (Orobanchaceae) from its host Hedera helix (Araliaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 2008, 36, 10, 772-776.

[9] Sun, S.X., Li, Y.M., Fang, W.R., Cheng, P., Liu, L., Li, F. Effect and mechanism of AR-6 in experimental rheumatoid arthritis. Clinical and Experimental Medicine, 2010, 10, 113-121.

[10] Tapondjou, L.A., Ponou, K.B., Teponno, R.B., Mbiantcha, M., Djoukeng, J.D., Nguelefack, T.B., Watcho, P., Cadenas, A.G., Park, H.J. In vivo antiinflammatory effect of a new steroidal saponin, mannioside A, and itsderivatives isolated from Dracaena mannii. Archives of Pharmacal Research, 2008, 31, 653–658.

[11] Hostettmann, K., Marston, A. Saponins, Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1995.

[12] Van Dyck, S., Flammang, P., Meriaux, C., Bonnel, D., Salzet, M., Fournier, I., Wisztorski, M. Localization of secondary metabolites in marine invertebrates:

contribution of MALDI MSI for the study of Saponins in Cuvierian Tubules of H. Forskali. PLoS One, 2010, 5, 11, e13923.

[13] Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. British Journal of Nutrition, 2002, 88, 587-605.

[14] Sparg, S.G., Light, M.E., van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 94, 219-243.

[15] Lorent, J.H., Quetin-Leclercq, H., Mingeot-Leclercq, M. The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells.Organic and Biomolecular Chemistry, 2014, 12, 8803-8822.

[16] Takagi, K. Yano, R. Tochigi, S. Fujisawa, Y. Tsuchinaga, H. Takahashi, Y. Takada, Y. Kaga, A. Anai, T. Tsukamoto, C. Seki, H. Muranaka, T. Ishimoto, M.Genetic and functional characterization of Sg-4 glycosyltransferaseinvolved in the formation of sugar chain structure at the C-3 position of soybean saponins.Phytochemistry, 2018,156, 96-105.

[17] Salnitskaya, M.A., Pasiuga, V.N., Magda, I.Y., Yakovishin, L.A., Grishkovets, V.I., Shckorbatov, Y.G. Effect of some triterpene glycosides applied in vitro on chromatin state in human cells. Current Bioactive Compounds, 2014, 10, 37-43.

[18] Pandey, S. Preliminary phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of *Bauhinia variegataLinn.*against human pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2015, 5, 123-129.

[19] Saiah, H. Allem, R. El Kebir, F.Z.Antioxidant and antibacterial activities of six Algerian medicinal plants. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science, 2016, 8, 367-374.

[20] Zhang, Y., Liu, C., Qi, Y., Li, S., Wang, J. Application of accelerated solvent extraction coupled with counter-current chromatography to extraction and online isolation of saponins with a broad range of polarity from Panaxnotoginseng. Separation and Purification Technology, 2013,106, 82-89.

[21] Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. Journal of Food Engineering, 2013, 117, 426-436.

[22] Cheok, C.Y., Karim Salman, H.A., Sulaiman, R. Extraction and quantification of saponins: a review. Food Research International, 2014, 59, 16-40.

[23] 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.

[24] Chen, J., Li, W., Yang, B., Guo, X., Lee, F.S.C., Wang, X. Determination of four major saponins in the seeds of Aesculuschinensis Bunge using accelerated solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography and electrospray-time of flight mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 2007,596, 273-280.

[25] Li, J., Zu, Y.G., Fu, Y.J., Yang, Y.C., Li, S.M., Li, Z.N. et al. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpénes saponins from defatted residue of yellow horn (Xanthoce, rassorbifolia Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010,11, 637-643.

[26] Xu, H.j., Shi, X.w., Ji, X., Du, Y.f., Zhu, H., Zhang, L.t. A rapid method for simultaneous determination of triterpenoidsaponins in Pulsatillaturczaninovii using microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography–tandemmass spectrometry. Food Chemistry, 2012,135, 251-258.

[27] Kwon, J.H., Bélanger, J.M.R., Pare, J.R., J. Yaylayan, V.A. Application of themicrowave-assisted process (MAP™) to the fast extraction of ginseng saponins. Food Research International, 2003, 36, 491-498.

[28] McClements, J. Food Emulsions: Principle, practice and techniques. Boca Raton, Published August 21, 2015 by CRC Press 690 Pages - 352 B/W Illustrations .

[29] Skurtys, O., and Aguilera, J.M. Formation of O/W macroemulsions with a circular microfluidic device using saponin and potato starch. Food Hydrocolloids, 2009, 23, 1810-1817.

[30] Peschel, W., Abaneda, F.S., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzía, I.,Jiménez, D.,Lamuela-Raventós, R.,Buxaderas, S.,Codina, C. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. Food Chemistry, 2006, 97, 3, 137-150.

[31] Mendel, M., Chłopecka, M., Dziekan, N., Wiechetek, M. The effect of the whole extract of common ivy (Hedera helix) leaves and selected active substances on the motoric activity of rat isolated stomach strips. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 3, 796-802.

[32] Anton, J.G., Puche, J.C., Valles, A.G., Passerini, E. Composition for the prevention and treatment of cellulitis.U.S.Patents, 2007,0031516.

[33] Bedir, E., Kirmizipermez, H., Sticher, O., Calis, I. Triterpene Saponins from fruits of hedera helix.Phytochemistry, 2000, 53, 905-909.

[34] Tucker, A.O.,Maciarello, M.J. Essential Oil of English Ivy, Hedera helix L. 'Hibernica'.Journal of Essential Oil Research, 1994, 6, 187-188.

[35] Trute, A., Nahrstedt, A. Separation of Rosmarinic Acid Enantiomers by Three Different Chromatographic Methods (HPLC, CE, GC) and the Determination of Rosmarinic Acid in Hedera helix. Phytochemical Analysis, 1996, 7,204-208.

[36] Trute, A., Gross, J. Mutschler, E. Nahrstedt, A. In vitro antipasmodic compounds of the dry extract obtained from Hedera helix. PlantaMedica, 1997a, 63,125-129.

[37] Trute, A., Nahrstedt, A. Identification and Quantitative Analysis of Phenolic Compounds from the Dry Extract of Hederahelix. PlantaMedica, 1997b, 63,177-179.

[38] Chichiricco, G., Cifani, M.P., Frizzi, G., Tammaro, F. Phytotherapy in Subequana Valley, Abruzzo, Central Italy. Journal of Ethnopharmacology, 1980, 2, 247-257.

[39] Grishkovets, V. I., Sidorov, D.Yu., Yakovishin, L.A., Arnautov, N.N., Shashkov, A. S., Chirva, V.Ya. Glycoside triterpeniques de hedera helix canariensis.I.structures des glycosides LA, LB1, LB2, LC, LD,LE1,Lg1, LG2, LG3, LG4 , LH1, LH2 et LI1 des feuilles de Hedera canariensis. Chemistry of Natural Compounds, 1996, 32, 3.

[40] Grishkovets, V.I., Tolkacheva, N.V., Shashkov,A.S., Chirva, V.Ya., Khim, P.S. Glycosides triterpeniques de hederataurica X. structures des composés F4, I et J des feuilles de lierre de crimée.Chemistry of Natural Compounds, 1992, 522.

[41] Crespin, F., Elias, R., Morice, C., Ollivier, E, Balansard, G., Faure, R. Identification of 3-O-β-D-glucopyranosylhederagenin from the leaves of Hedera helix. Fitoterapia LXVI, 1995, 5,477.

[42] Elias, R., Diaz Lanza, A.M., Vidal Ollivier, E., Balansard, G., Faure, R., Babadjamian, A. Triterpene saponins from leaves of Hedera helix. Journal of Natural Products, 1991, 54, 98-103.

[43] Haberlein, H. Hedera helix – mode of action evidenced by cell biological and biophysical investigation. PrzewodnikLekarski, 2008, 1, 255-256.

[44] Fazioa, S., Pousob, J., Dolinskyc, D., Fernandezd, A., Hernandeze, M., Clavierf, G., Heckerg, M.Tolerance, safety and efficacy of Hedera helix extract in inflammatory bronchial diseases under clinical practice conditions, Phytomedicine, 16, 2009, 17-24.

[45] Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E.M. Plant Drug Analysis — a Thin Layer Chromatography Atlas. XIII + 320 S., 170 farb.Abb. 23 Tab. Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo 1984. Springer Verlag. DM 169, 00. ISBN: 3-540-13195-7. Journal of Basic Microbiology, 1986, 26, 2, 128-128.

[46] Meyer-Wegener, J., Liebscher, K., Hettich, M., Kastner, H.G. Efeu versus Ambroxol bei chronischer Bronchitis. Zeitschrift für Allgemein medizin, Heft 3, 69.Jhrg 3, 31. 1. 1993, S, 61 - 66.

[47] Süleyman, H., Mshvildadze,V., Gepdiremen, A., and Elias, R. Acute and chronic anti-inflammatory profile of ivy plant, hedera helix, in rats. Phytomedicine, 1984, 10, 370-374.

[48] Hänsel, R., Keller, K., Rimpler, H., Schneider, G., Drogen, EO.,Berlin. Springer-Verlag, 1993, 399 - 404.

[49] Lásztity, R., Hídvégi, M., Bata, Á. Saponins in food. Food Reviews International, 1998,14,4, 371- 390.

[50] Bruneton, J. Plantes toxiques. Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Ed. Tec et Doc et EMI, Paris, 2001.

[51] Fintelmann, V., Weiss, RF. Manuel pratique de phytothérapie, Edité par Vigot. Paris, 2004.

[52] Martin, P. Les familles des plantes à fleurs d'Europe. Botanique systématique et utilitaire. Press Universitaires de Namur, Belgique, 2014.

[53] Bruneton, J. Pharmacognosie- phytochimie plante médicinales. Technique et Documentation. Ed. Lavoisier, 3eme édition, Paris, 1999.

[54] Fritzsch, S. Les baies toxiques. Thèse de Doctorat en médecine, Strasbourg, 1983.

[55] Hausen, BM., Bro¨han, J., Ko¨nig, WA. Allergic and irritant contact dermatitis from falcarinol and dihydrofalcarinol in common ivy (Hedera helix L). Contact Dermatitis, 1987, 17, 1-9.

[56] Cooper, MR., Johnson, AW. Poisonous Plants and Fungi.An Illustrated Guide. London, HMSO, 1991.

[57] Massmanian, A., Valcuen de Cavero, F., Ramirez Bosca, A. Contact dermatitis from variegated ivy (Hedera helix subsp. canariensisWilld). Contact Dermatitis.1988, 18, 247-248.

[58] PDR for herbal medecine 4th edition, Thomson Healthcare, US. 2007.

[59] Verhaeghe, P. Clef des plantes sarmenteuses rustiques en Belgique, Taxonomania, 2004, 11, 1-26.

[60] Jean-François, L. Référentiel des trachéophytes de France métropolitaine, Benoît Bock & al. Version 3.02 du 26 Janvier 2016.www. Tela3botanica.org, 2007.

[61] Clarke, M.M., Reichard, S. H., Hamilton, C. W. Prevalence of different horticulture taxa of ivy (Hedera spp. Araliaceae) in invading populations : Biological Invasion, 2006, 8, 149-157.

[62] Foote, L.E., and S.B. Jones, J.R. Native Shrubs and Woody Vines of the Southeast: Landscaping Uses and Identification, 1989.

[63] Hitchcock, C.L., and Cronquist, A. Flora of the Pacific Northwest: An Illustrated Manual, 1973.

[64] Cooper rider, T.S. The Dicotyledoneae of Ohio Part 2. Columbus, Ohio, USA,1995.

[65] Gleason, H.A. The New Britton and Brown Illustrated Flora of the Northeastern United States and Adjacent, Canada, 1963.

[66] Ackerfield, J., Wen, J. A morphometric analysis of Hedera L. (the ivy genus, Araliaceae) and its taxonomic implications, Adansonia, 2002,24/2, 197-212.

[67] Vargas, P., Mcallister, H.A., Morton, C., Jury, S.L., Wilkinson, M.J. Polyploid speciation in *Hedera* (Araliaceae): phylogenetic and biogeographic insights based on chromosome counts and ITS sequences. Plant Systematics and Evolution. 1999, 219, 165-179.

[68] Vincken, J.P., Heng, L., De Groot, A., and Gruppen, H. Saponins classification and occurrence in the plant kingdom.Photochemistry ,2007, 68, 275-297.

[69] Guglu-Ustundag, Q., Mazza, G., Saponins, properties, applications and processing.Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2007, 47, 231-258.

[70] Sparg, S.G. Light, M.E. and Van Staten, J. Biological activities and distribution of plant saponins, Journal of Ethnopharmacology,2004, 94, 219-243.

[71] Hu, J., Lee, S.O., Hendrich, S., Murphy, P.A. Quantification of the group B soyasaponins by high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50, 2587-2594.

[72] Decroos, K., Vincken, J.P., Heng, L., Bakker, R., Gruppen, H., Verstraete, W. Simultaneous quantification of differently glycosylated, acetylated, and 2,3- dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one-conjugated soyasaponins using reversed-phase high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection.Journal of Chromatography A, 2005, 1072, 185-193.

[73] Ha, T.J., Lee, B.W., Park, S.H., Jeong, S.H., Kim, H.T., Ko, J.M., Baek, I.Y., Lee, J.H. Rapid characterisation and comparison of saponin profiles in the seeds of Korean Leguminous species using ultra performance liquid chromatography with photodiode array detector and electrospray ionisation/mass spectrometry (UPLC–PDA–ESI/MS) analysis. Food Chemistry, 2014,146, 270-277.

[74] Sarkhel, S. Evaluation of the anti-inflammatory activities of Quillaja saponaria Mol. saponin extract in mice. Toxicology Reports, 2015, 2, 1-3.

[75] Moghimipour, E., Handali, S. Saponin: Properties, methods of evaluation and applications.Annual Research and Review in Biology, 2015, 5/3, 207-220.

[76] Augustin, J.M., Kuzina, V., Anderson, S. B., Bak, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. Phytochemistry, 2011, 72, 435 - 457.

[77] Demeyer, M., DeWinter, J., Caulier, G., Eeckhaut, I., Flammang, P., Gerbaux, P. Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star Asteriasrubens by mass spectrometry. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2014, 168, 1-11.

[78] Qian, Z.M., Lu, J., Gao, Q. P., Li, S. P. Rapid method for simultaneous determination of flavonoid, saponins and polyacetylenes in Folium Ginseng and Radix Ginseng by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2009, 1216, 3825-3830.

[79] Vongsangnak, W., Gua, J., Chauvatcharin, S., Zhong, J. Towards efficient extraction of notoginsengsaponins from cultured cells of Panaxnotoginseng. Biochemical Engineering Journal, 2004, 18, 115-120.

[80] Wu, J., Lin, L., Chau, L.T. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. Ultrasonic Sonochemistry, 2001, 8, 347-352.

[81] Zhang, H., Cheng, Y. Solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometric analysis of saponins in a Chinese patent medicine of formulated Salvia miltiorrhizae and Panaxnotoginseng. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 40, 429-432.

[82] Lai, L.R., Hsieh, S.C., Huang, H. Y., Chou, C.C. Effect of lactic fermentation on thetotal phenolic, saponin and phytic acid contents as well as anti-colon cancer cell proliferationactivity of soymilk. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013,115, 552-556.

[83] Ridout, C. L., Price, K. R., Parkin, G., Dijoux, M. G., Lavaud, C. Saponins from sugar beet and the floc problem. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42, 279-282.

[84] Serventi, L., Vodovotz, Y., Chitchumroonchokchai, C., Schwartz, S.J., Failla, M. L., Riedl, K. M. et al. Saponins from soy and chickpea: Stability during breadmaking and in vitro bioaccessibility. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 201, 61, 6703- 6710.

[85] Vázquez-Castilla, S., Jaramillo-Carmona, S., Fuentes-Alventosa, S.J.M., Jiménez-Araujo, A., Rodriguez-Arcos, R., Cermeño-Sacristán, P. Optimization of a method for the profiling and quantification of saponins in different green Asparagus genotypes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61, 6250-6258.

[86] Yoon, K.R., Wrolstad, R. E. Investigation of marion blackberry, strawberry, and plum fruit for the presence of saponins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1984, 32,691-693.

[87] Huhman, D.V., Berhow, M. A., Sumner, L.W. Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of Medicagotruncatula. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53, 1914-1920.

[88] Mostafa, A., Sudisha, J., El-Sayed, M. Ito, S.I., Yamauchi, N., Shigyo, M. et al. Aginosidesaponin, a potent antifungal compound, and secondary metabolite analysesfrom Allium nigrum L. Phytochemistry Letters, 2013, 6, 274-280.

[89] Lee, S.T., Mitchell, R.B., Gardner, D.R., Wang, Z., Azadi, P., Heiss, C. Isolation, characterization, and quantification of steroidal saponins in Switchgrass (Panicumvirgatum L). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57, 2599-2604.

[90] Estrada, A., Katselis, G.S., Laarveld, B., Barl, B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from Polygala senega L. Comparative Immunology. Microbiology & Infectious Diseases, 2000,23, 27-43.

[91] Sun, S. H. Hemolytic activities and adjuvant effect of Bupleurum Chinese Saponin on the immune responses to ovalbumin in mice. Vaccine, 2006, 24, 1324-1331.

[92] Sun, H., Chen, L., Wang, J., Wang, K., Zhou, J. Structure–function relationship of the saponins from the roots of Platycodongrandi florum for hemolytic and adjuvant activity. International Immunopharmacology, 2011, 11, 2047-2056.

[93] Verza, S.G., Silveira, F., Cibulski, S., Kaiser, S., Ferreira, F., Gosmann, G. et al. Immunoadjuvant activity, toxicity assays, and determination by UPLC/Q-TOF-MS oftriterpenicsaponins from Chenopodium quinoa seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60, 3113-3118.

[94] Hassan, S.M., Haq, A.U., Byrd, J.A., Berhow, M.A., Cartwright, A. L., Bailey, C.A. Hemolytic and antimicrobial activities of Saponin-rich extracts from guar meal. Food Chemistry, 2010, 119, 600-605.

[95] Teshima, Y., Ikeda, T., Imada, K., Sasaki, K., El-Sayed, M., Shigyo, M. et al. Identification and biological activity of antifungal saponins from shallot (Allium cepal. Aggregatum group). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61, 7440-7445.

[96] Chan, K.W., Khong, N.M.H., Iqbal, S., Ismail, M. Isolation and antioxidative properties of phenolics-saponins rich fraction from defatted rice bran. Journal of Cereal Science. 2013, 57, 480 - 485.

[97] Dini, I., Tenore, G.C., Dini, A. Saponins in Ipomoea batatas tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. Food Chemistry, 2009, 113, 411-419.

[98] Cheng, T.C., Lu, J.F., Wang, J.S., Lin, L. J., Kuo, H.I., Chen, B. H. Anti-proliferation effect and apoptosis mechanism of prostate cancer cell PC-3 by flavonoids and saponins prepared from Gynostemmapentaphyllum. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59, 11319-11329.

[99] 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, 22, 672-688.

[100] Joseph, B., Jini, D., Antidiabetic effects of Momordicacharantia (bitter melon) and its medicinal potency. Asia Pacific Journal of Tropical Disease, 2013, 3, 93-102.

[101] Yun, J.W. Possible anti-obesity therapeutics from nature-A review. Phytochemistry, 2010, 71, 1625-1641.

[102] Woldemichael, G.M. & Wink, M. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from Chenopodium quinoa. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49, 2327-2332.

[103] Iorizzi, M., Lanzotti, V., De Marino, S., Ranalli, G., Zollo, F. Antimicrobial furostanol Saponin from the seeds of Capsicum annuum L. Var. acuminatum. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50, 4310-4316.

[104] Mitra, S., Dungan, S. Micellar properties of quillaja saponin.1.Effects of temperature, salt, and pH on solution properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45, 5, 1587-1595.

[105] Güc¸lü-Üstündag, Ö., Mazza, G. Saponins: properties,applications and processing. Critical Review in Food Science and Nutrition, 2007, 47, 3,231-258.

[106] Wang, L., Weller, C.L. Recent advances in extraction of pharmaceuticals from plants. Trends in Food Science and Technology, 2006, 17, 300-312.

[107] Reichardt, C., Welton, T. Solvents and solvent effects in organic chemistry (4th ed.).Weinheim: Wiley-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011, 63-64.

[108] Bart, H. J. Extraction of natural products from plants-An introduction.Industrial scale natural products extraction. Verlag: Wiley-VCH, 2011, 1-26.

[109] Zhang, S.Q., Zhang, J.S., Wang, C.Z., Extraction of steroid saponins from Paris polyphylla Sm. var. yunnanensis using novelultrahigh pressure extraction technology.Pharmaceutical Chemistry Journal , 2007, 41,8, 27-33.

[110] Ong, E.S.Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. Journal of Chromatography, 2004, 812, 23-33.

[111] Lagunez Rivera, L., Vilarem, G., Hydro distillation of caraway by direct induction heating-assisted by magnetic field process.Flavour and Fragrance Journal, 2007, 22, 178-183.

[112] Fache, P ., Nuns, J., Tuaz, F. Le chauffage des liquides fortement conducteurs de l'electrecité ; l'inductiondirecte, une solution qui ignore l'encrassement et la corrosion ; congrès, UNIPEDE, Barcelona, 1995.

[113] Takeuchi, T. M., Pereira, C.G., Braga, M.E. M., Maróstica, 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 M. A. A. Meireles (Ed.), Extracting bioactive compounds for food products-Theory and applications (pp. 140-144). Boca Raton: CRC Press. 2009, pp: 151-158.

[114] Waller, G. R., Yamasaki, K., Traditional and modern medicine, Vol. 404. New York, NY: Plenum Press. 1996b.

[115] Van Setten, D.C., Ten Hove, G.J., Wiertz, E. J., H. J., Kamerling, J. P., Van de Werken, G. Multiple-stage tandem mass spectrometry for structural characterization of saponins. Analytical Chemistry, 1998, 70/20, 4401-4409.

[116] Yang, Y.L., Martin, E., Alexander, A.S., Mc Clements, D.J. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale_) Food Hydrocolloids, 2013, 30, 589-596.

[117] de Faria, J.T., de Oliveira, E.B., Minim, V.P.R., Minim, L.A. Performance of *Quillaja* bark saponin and β-lactoglobulin mixtures on emulsion formation and stability, Food Hydrocolloids, Journals, Food hydrocolloids, 2017, 1, 013.

[118] Durant, D. Les réseaux macromoléculaires et les gels, Groupe français d'étude et d'application des polymères, 1990,5, 121-182.

[119] Jayant, L., Snehal D, J., Chetan, D., Diksha, J. Formulations of Herbal Hand Wash with Potential Antibacterial Activity. International Journal of Research in Advent Technology, 2015, 13-14.

[120] Prakash, P, Gupta, N. Therapeutic uses of Ocimum sanctum linn (tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. Indian Journal of Physiology and Pharmacology, 2005, 49(2), 125-131.

[121] Ali, H., Dixit, S.In vitro antimicrobial activity of flavonoids of Ocimum sanctum with synergistic effect of their combined form.Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2012, 2, 396 - 398.

[122] Saraf, S., Sahu, S., Kaur, C., Saraf, S. Comparative measurement of hydration effects of herbal moisturizers. Pharmacognosy Research, 2010, 2, 3, 146-151.

[123] Yang, C.H., Huang ,Y.C., Chen, Y.F., Zhang, M.X. Foam properties, detergent abilities and long term preservative efficacy of the Saponin from Sapindusmukorossi. Journal of Food and Drug Analysis, 2010, 18, 155-160.

[124] Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U. Biological activities and medicinal properties of neem (Azadirachtaindica).Current Science, 2002, 82/11, 1336-1345.

[125] Audigie, C.l., Figurearella, J., Zonszain, F. Manipulations d'analyses biochimiques. Ed. Doin, Paris, 1978.

[126] Laurent, L. Eléments minéraux. In : Techniques d'analyses et de contrôle dans les Industries agroalimentaires. Ed. Lavoisier, Vol 4, Paris, 1991,78-98.

[127] Virot, M., Tomao, V., Colnagui, G., Visinoni, F., & Chemat, F. New microwave-integrated Soxhlet extraction. Journal of Chromatography A, 2007, 1174(1-2), 138-144.

[128] Süleyman H., Mshvildadze., Gepdiremen, V.A., and Elias, R. Acute and chronic antiinflammatory profile of the ivy plant, Hedera helix, in rats. Phytomedicine, 2003, 10, 370-374.

[129] Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry (1st ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Chromatographic science Series 2008, Vol 89, pp 896.

[130] Pandey, S. Preliminary phytochemical screening and in vitro antibacterial activity of Bauhinia variegataLinn.Against human pathogens.Asian Pacifique Journalof Tropical Disease, 2015, 5, 123-129.

[131] Om, P., Sharma, A., Neeraj Kumar, B., Bikram Singh , B., Tej, K., Bhat, A. An improved method for thin layer chromatographic analysis of saponins. Food Chemistry, 2012,132, 671-674.

[132] Stahl, E. Thin-layer chromatography a laboratory hand book, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2nd Ed., New York, 1969, pp: 240-357.

[133] Burgos-Dıaz, C., Pons, R., Espuny, M.J., Aranda, F.J., Teruel, J.A., Manresa, A., Ortiz, A., Marqués, A.M. Isolation and partial characterization of a biosurfactant mixture produced by Sphingobacterium sp. isolated from soil. Journal of Colloid Interface Science, 2011, 361, 195-204.

[134] Merculieff, Z., Ramnath, S., Sankoli, S.M., Venkataramegowda, S., Murthy, G.S., Ceballos, R.M. Phytochemical, antioxidant and antibacterial potential of Elaeagnuskologa (Schlecht) leaf.Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 2014, 7, 599-602.

[135] BurgosDıaz, C., Rubilar, M., Morales, E., Medina, C., Acevedo, F., Marques, A.M., Shene, C. Naturally occurring protein–polysaccharide complexes from linseed (Linumusitatissimum) as bioemulsifiers. European Journal of Lipid Science and Technology, 2016, 118,165-174.

[136] Zouambia, Y., Youcef-Ettoumi, K., Krea, M. Moulai-Mostefa, N. Electromagnetic induction heating as a new approach for pectin extraction- Comparative study. Arabian Journal of Chemistry, 2014, 11,011.

[137] Greunke, C., Hage-Hülsmann, A., Sorkalla, T., Keksel, N., Häberlein, F., Häberlein, H. A systematic study on the influence of the main ingredients of ivy leaves dry extract on the β2 adrenergic responsiveness of human air way smooth muscle cells. Pulmonary Pharmacology and Therrapeutics Journal, 2015, 31, 92-98.

[138] Saiah, H., Allem, R., El Kebir, F.Z. Antioxidant and antibacterial activities of six Algerian medicinal plants.International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science,2016, 8, 367-374.

[139] Silversteine, R.M., Webster, F.X. Spectrometric identification of organic compounds, 6^{th} Ed., John Wiley and Sons Inc., new York, 2005.

[140] Sarikahya, N.B., Aristatosides, A.C. Hederagenin-type triterpenes Saponins from Cephalaria aristata.Phytochemistry Letters, 2014, 8, 149-155.

[141] Yu, M., Shin, Y.J., Kim, N., Yoo, G., Park, S., Kim, S.H. Determination of saponins and flavonoids in ivy leaf extracts using HPLC-DAD. Journal of ChromatographicScience, 2015, 53, 478-483.

[142] Gokhan , S., Derya, G., Milena, M., Sonia, P., Tamer, K. Oleanane- Type Glycosides from Tremastelmapalaestinum (L.) Janchen. Chemistry & Biodiversity, 2014, 11, 3, 408-418.

[143] Mehta, B.K., Meenal, G. Isolation , Characterization and biological activity of compound isolated from the seeds of Nigella sativa L, Natural Product An Indian Journal, 2016, 12/2, 48-56.

[144] Bora, K., Jae, W.H., Men, T.N., Quang, L.D., Jin-Cheol, K., Hun, K., Gyung, J.C. Identification of novel compounds, oleanane-and ursane-type triterpénes glysosides, from TrevesiaPalmata : their biocontrol activity against phytopathogenic fungi. Scientific Reports, 2018,8,14522.

[145] Mironenko, N.V., Brezhneva, T.A., Poyarkova, T.N., Selemenev, V.F. Determination of some surface-active Characteristics of solutions of triterpénes Saponin derivatives of oleanolicacid. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2010, 44, 157-160.

[146] Stanimirova, R., Marinova, K., Tcholakova, S., Denkov, N.D., Stoyanov, S., Pelan, E. Surface rheology of Saponin adsorption layers. Langmuir, 2011, 27, 12486-12498.

[147] Benna-Zayani, M., Kbir-Ariguib, N., Trabelsi-Ayadi, M., Grossiord, J.L. Stabilization of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels.Colloids and Surfaces. A, 2008, 316, 46-54.

[148] Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., McInerney, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms.Journal of Microbiological Methods, 2004, 56, 339-347.

[149] Holmoberg, K., Jonsson, B., Kronberg, B., Lindman, B. Surfactants and polymers in aqueous solution; 2nd edition, New York: John Wiley & Sons, 2003.

[150] Wojciechowski, K. Surface activity of saponin from Quillaja bark at the air/water and oil/water interfaces.Colloids and Surfaces B, 2013, 108, 95-102.

[151] Ren,Y., Ellisa, P.R.I., Sutherland, W.S., Ross-Murphy, S.B., Dilute and semi-dilute solution properties of an exopolysaccharide from Echerichia coli strain S61. Carbohydrate Polymers, 2002, 52, 189-195.

[152] Ren, Y., Ellisa, P.R.I., Ross-Murphy, S.B., Wang, Q., Wood, P.J. Dilute and semi-dilute solution properties of (1-3), (1-4) -β-*D*-glucan, the endosperm cell wall polysaccharide of oats (*Avenasativa L*). Carbohydrate Polymers, 2003, 53, 401-408.

[153] Ghannam, M.T., Esmail.M.N.J. Properties of carboxy methyl cellulose.Journal of Applied Polymer Science, 1997, 64, 289-301.

[154] Rodd, A.B,. Dunstan, D.E., Boger, D.V. Characterisation of xanthan gum solutions using dynamic light scattering and rheology,Polymer, 2000, 42, 159-174.

[155] Drapala, K.P., Mulvihill, D.M., O'Mahony, J.P. A review of the analytical approach used for studying the structure, interactions and stability of emulsions in nutritional beverage systems,Food Structure, 2018,01,00.

[156] Krstonosic, V., Dokic, L., Nikolic, I., Milanovic, M. Influence of xanthan gum on oil-in-water emulsion characteristics stabilized by OSA starch. Food Hydrocolloids,2015,45, 9-17.

[157] Sun, C., Gunasekaran, S., Richards, M.P. Effects of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. Food Hydrocolloids, 2007, 21, 555-564.

[158] Winter, H.H. Can the gel point of a cross-linking polymer be detected by the G'-G" crossover. Polymer Engineering Science, 1987, 27/22, 1698-1702.

[159] Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., Finkel, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. International Journal of Cosmetic Science, 2006,28/5, 359-370.

[160] Ravani, L., Esposito, E., Bories, C.B., Lievin-LeMoal, V., Loiseau, P.M., Djabourov, M., Cortesi, R., Bouchemal, K. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and in vitro studies. International Journal of Pharmaceutics, 2013, 454, 695-702.

[161] Liu, S., Huang, S., Li, L. Thermo reversible gelation and viscoelasticity of κ-carrageenan hydrogels.Journal of Rheology, 2016,60, 203-214.

ANNEXE

Annexe

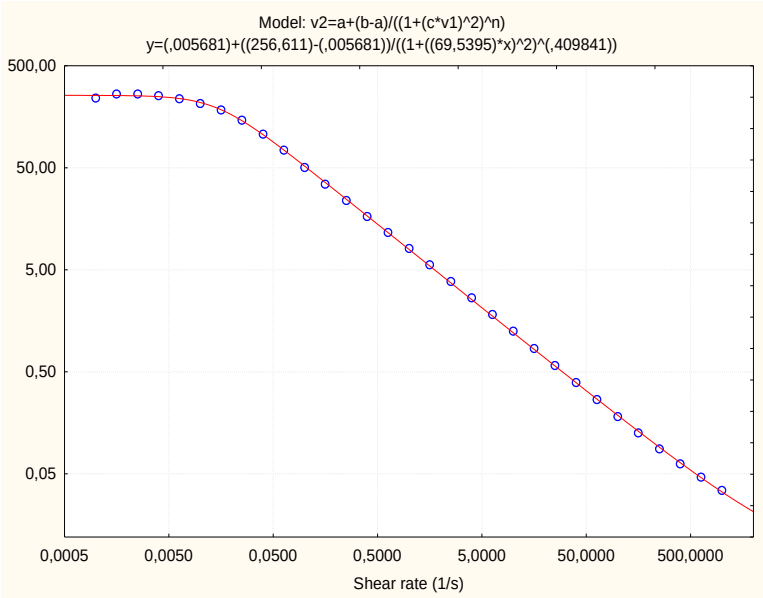


Figure 1 : Courbe d'écoulement de l'essai N°2 ajusté par le modèle de Carreau

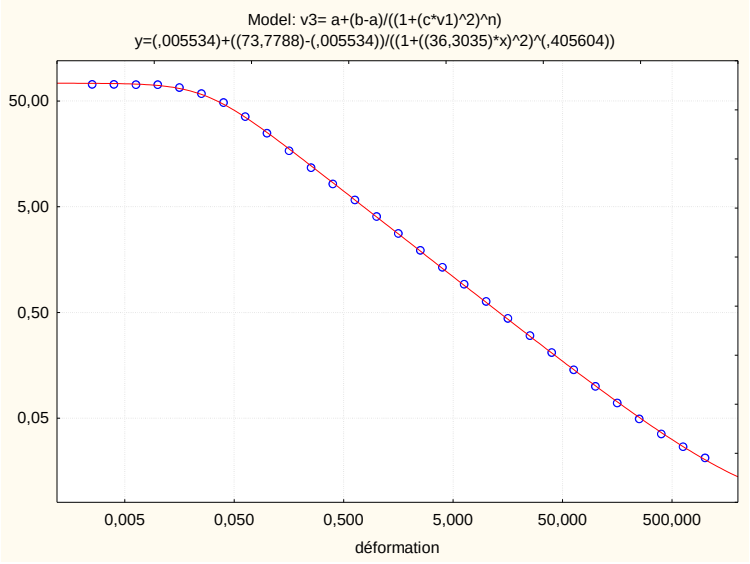


Figure 2 : Courbe d'écoulement de l'essai N°3 ajusté par le modèle de Carreau

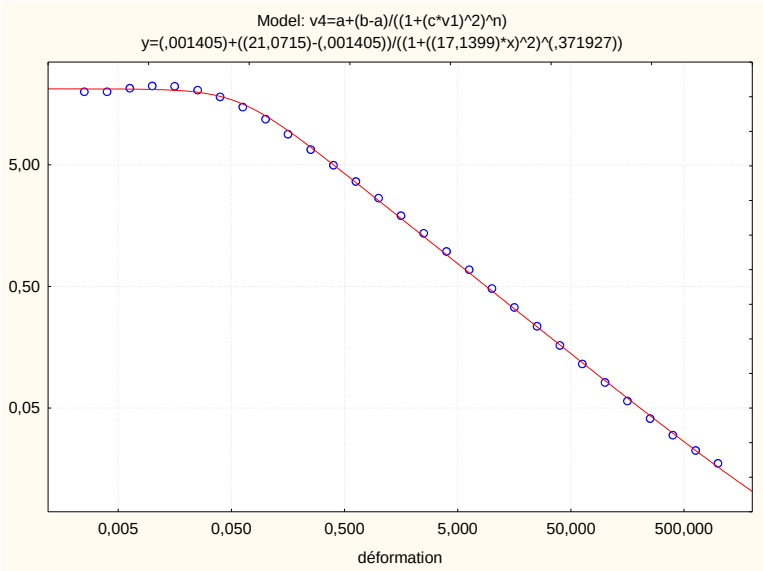


Figure 3 : Courbe d'écoulement de l'essai N°4 ajusté par le modèle de Carreau

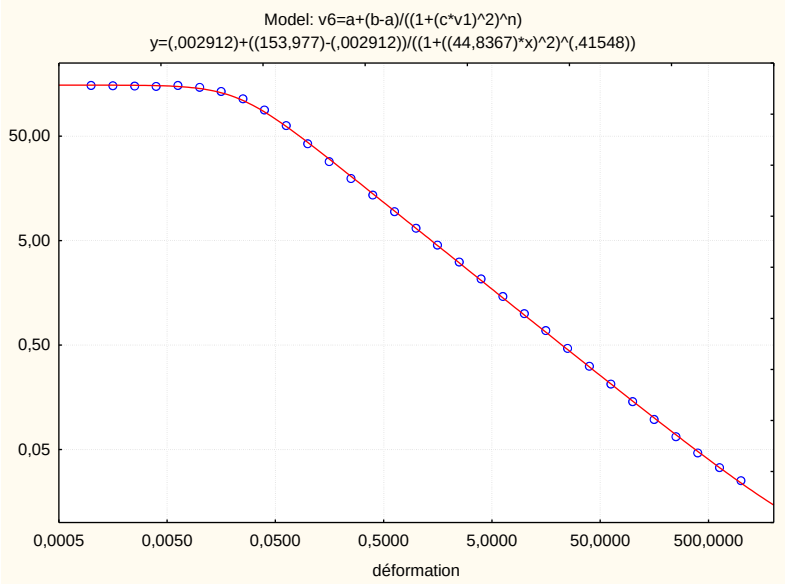


Figure 4 : Courbe d'écoulement de l'essai N°6 ajusté par le modèle de Carreau

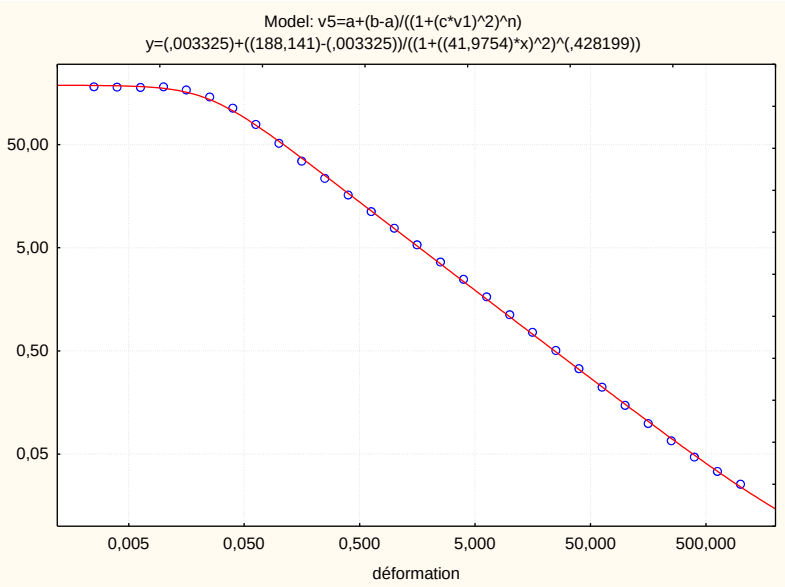


Figure 5 : Courbe d'écoulement de l'essai N°5 ajusté par le modèle de Carreau

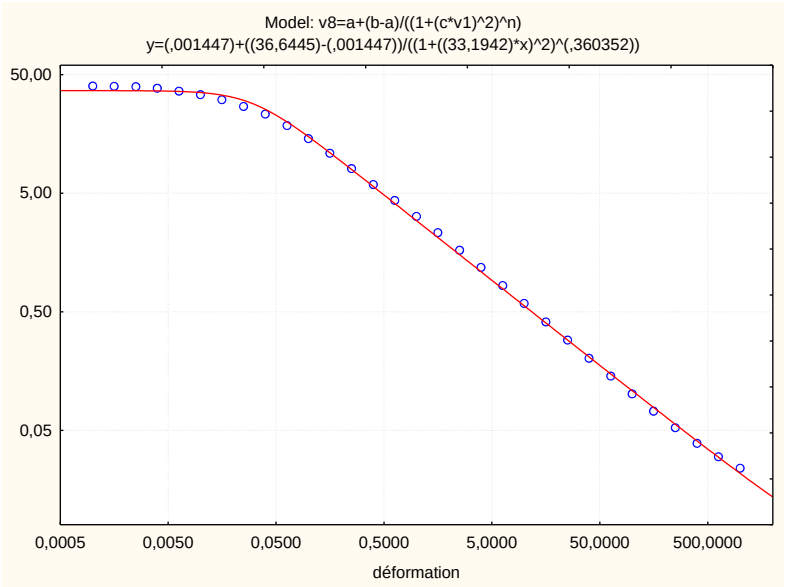


Figure 6 : Courbe d'écoulement de l'essai N°8 ajusté par le modèle de Carreau

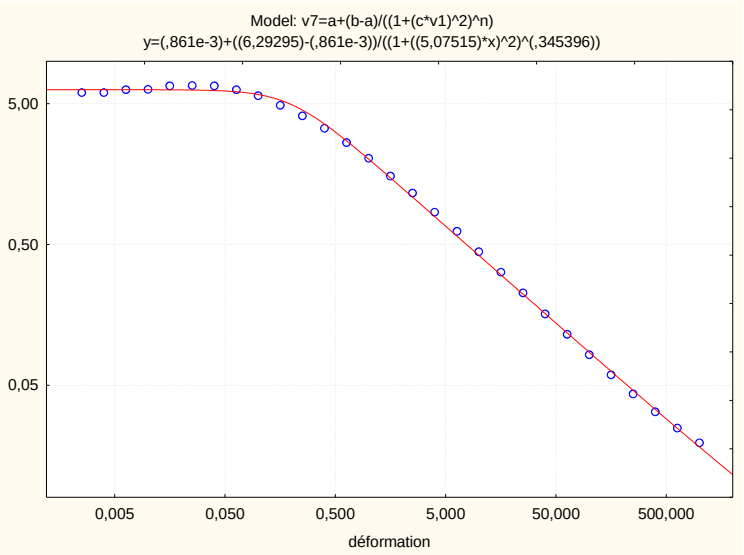


Figure 7 : Courbe d'écoulement de l'essai N°7 ajusté par le modèle de Carreau

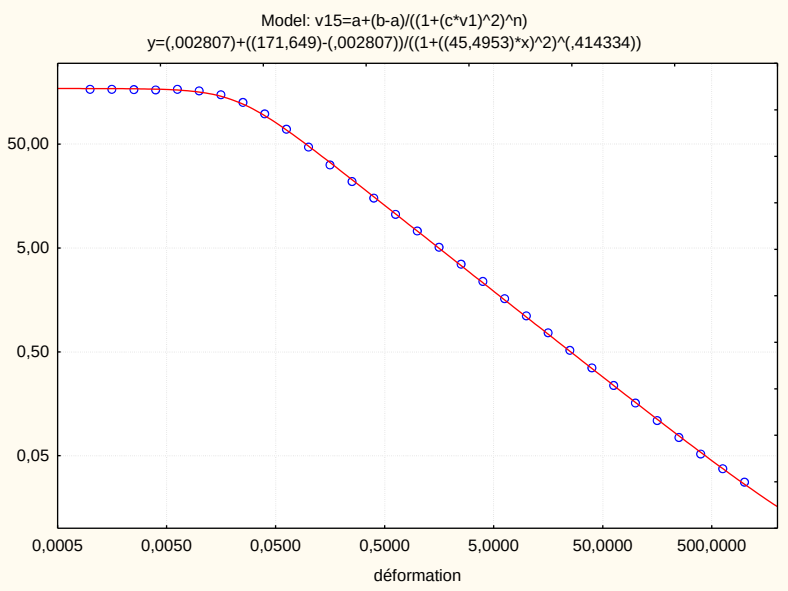


Figure 8 : Courbe d'écoulement de l'essai N°15 ajusté par le modèle de Carreau

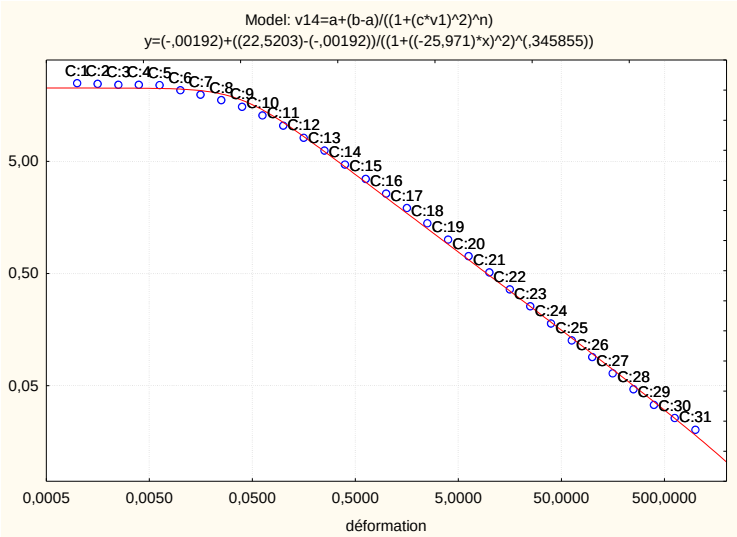


Figure 9 : Courbe d'écoulement de l'essai N°14 ajusté par le modèle de Carreau

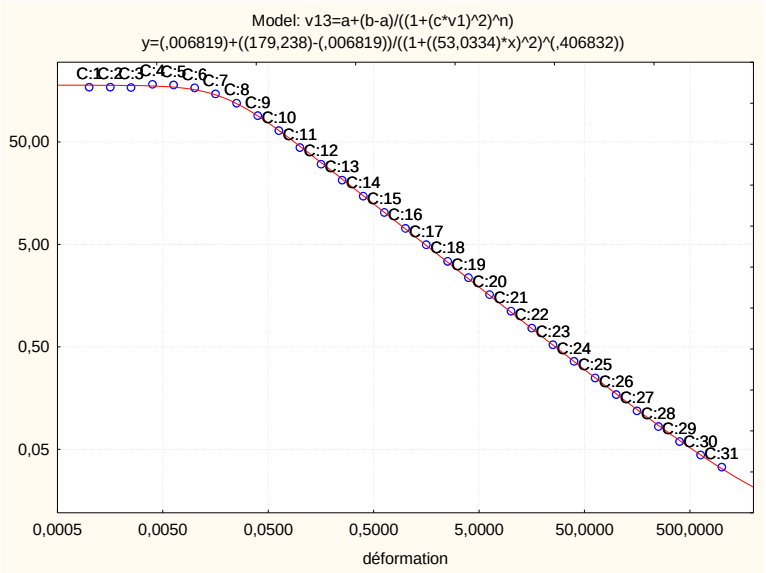


Figure 10 : Courbe d'écoulement de l'essai N°13 ajusté par le modèle de Carreau

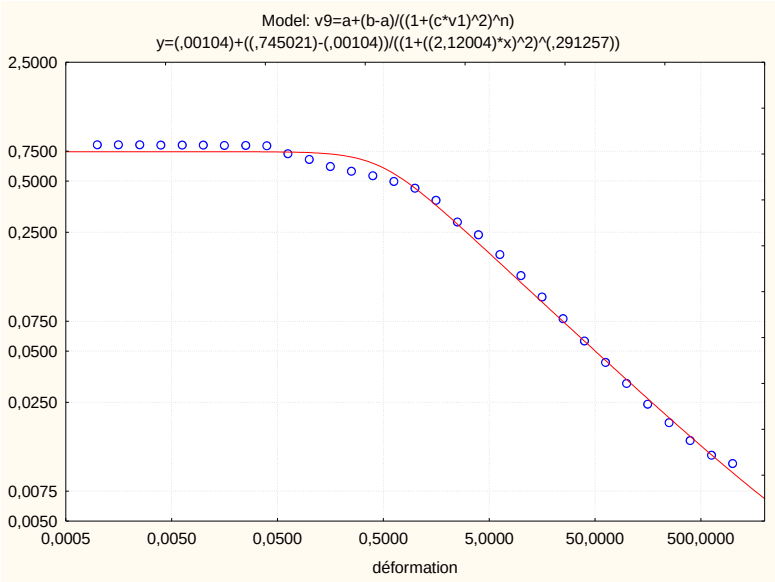


Figure11 : Courbe d'écoulement de l'essai N°9 ajusté par le modèle de Carreau

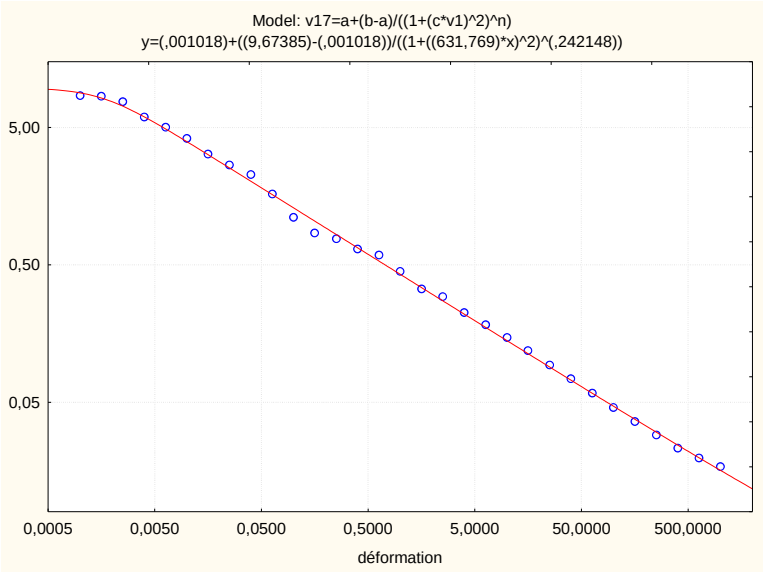


Figure 12 : Courbe d'écoulement de l'essai N°17 ajusté par le modèle de Carreau

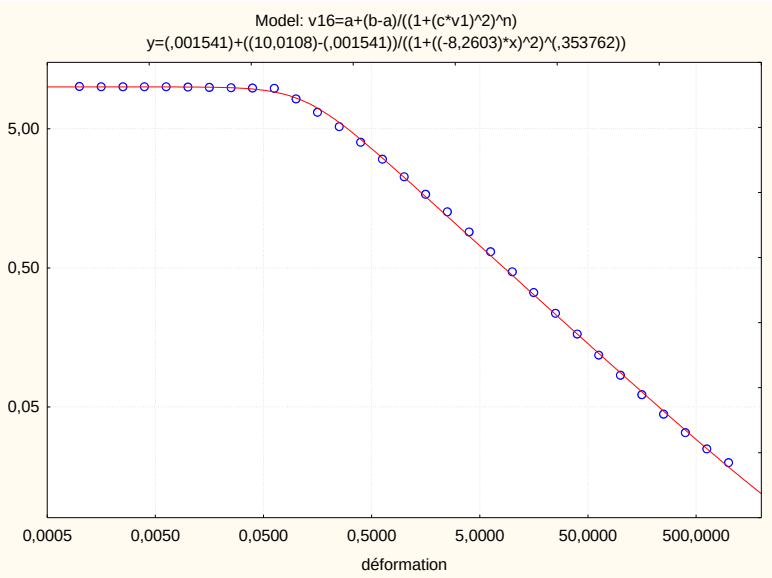


Figure 13 : Courbe d'écoulement de l'essai N°16 ajusté par le modèle de Carreau

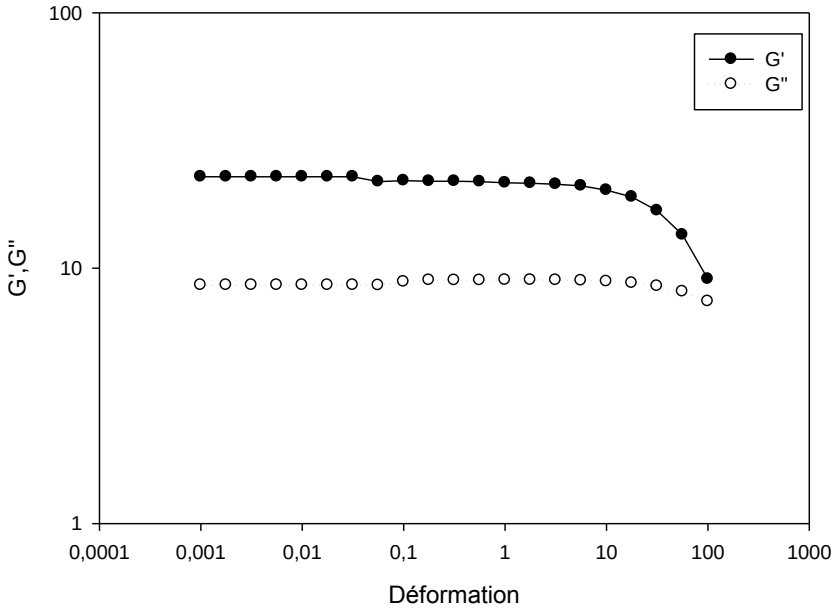


Figure 14: Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 02

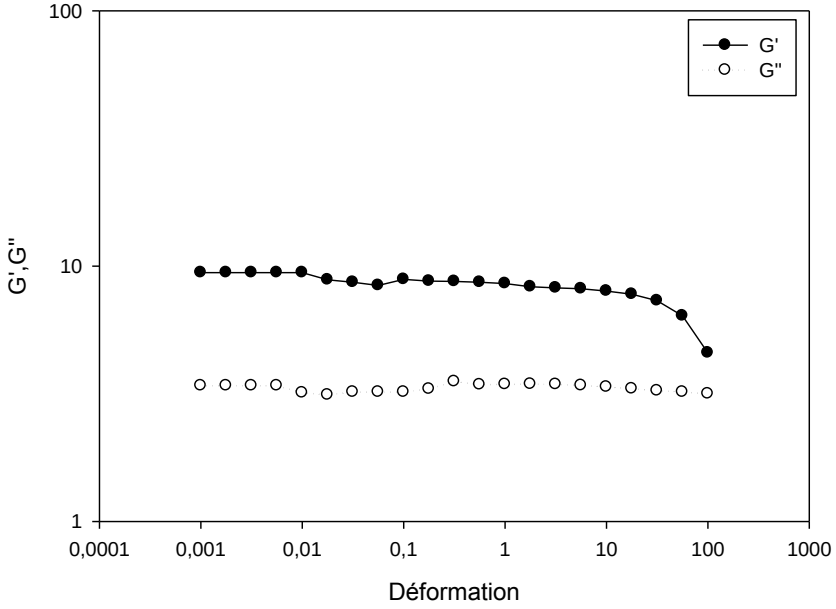


Figure 15 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 03

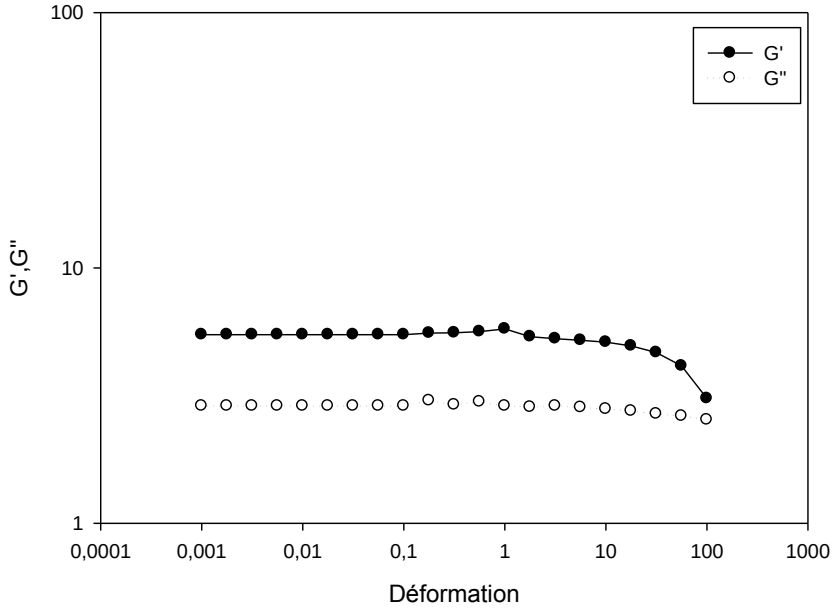


Figure 16 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 04

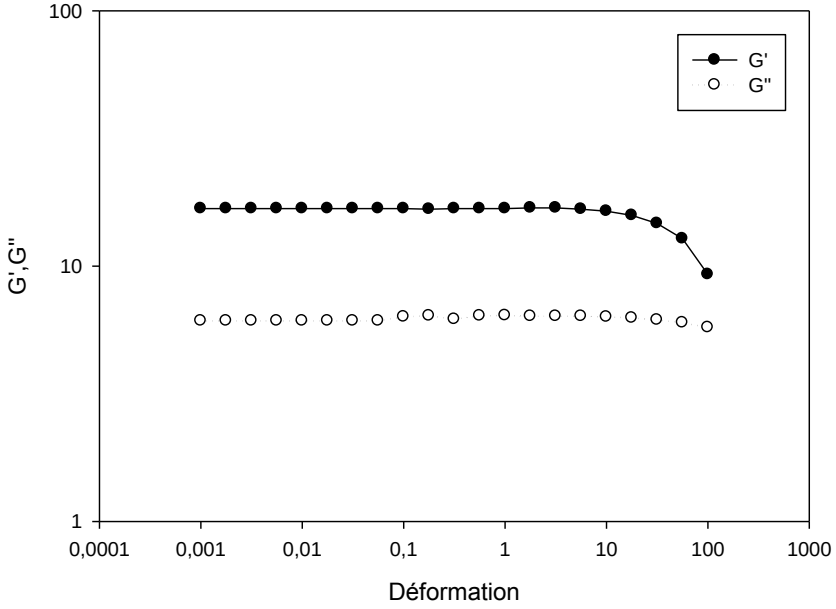


Figure 17 : Courbe de viscoélasticité essai N° 05

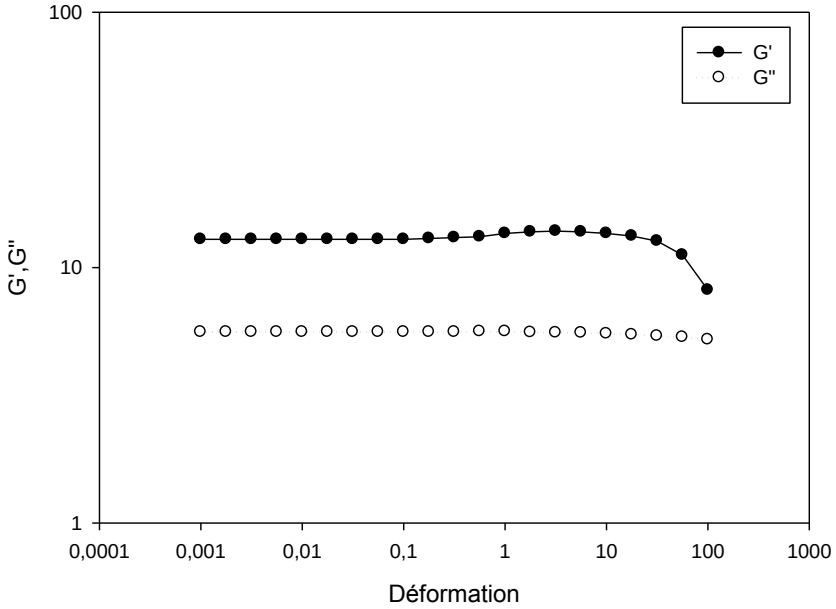


Figure 18 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 06

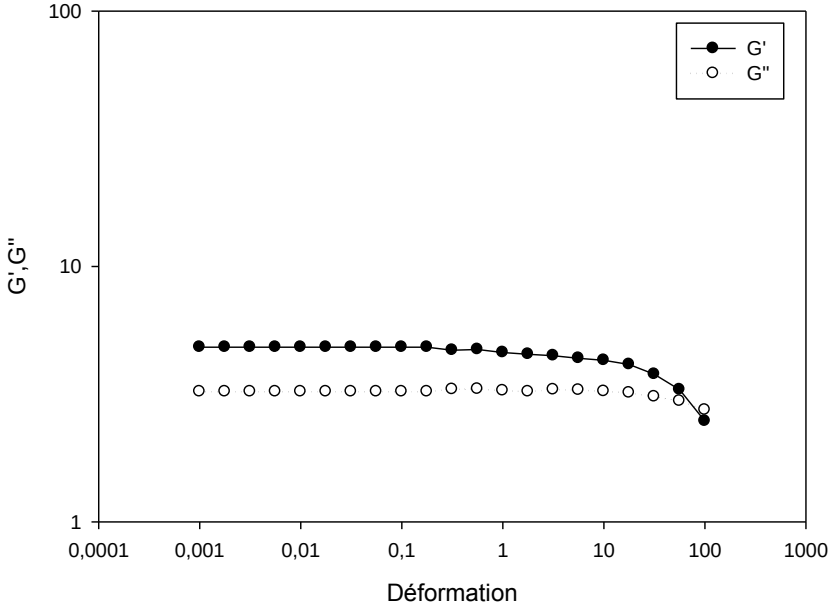


Figure 19 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 07

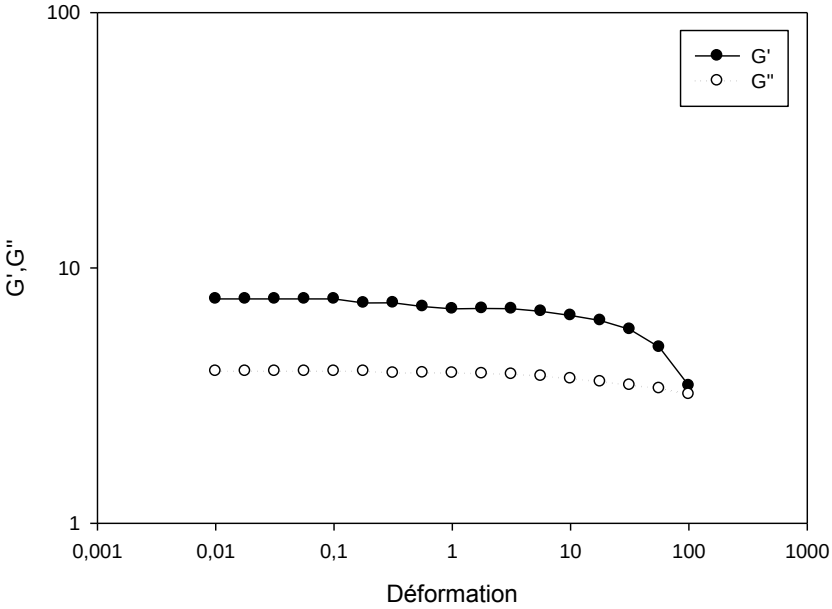


Figure 20 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 08

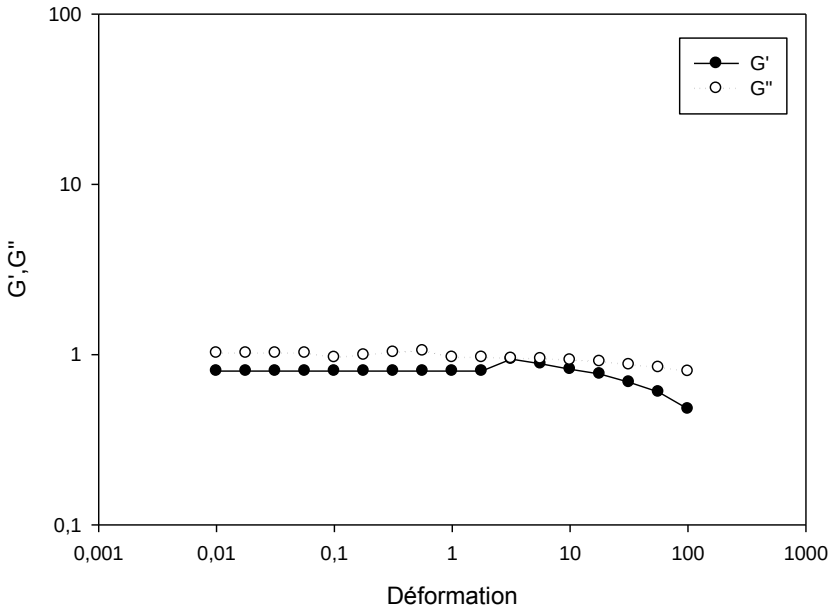


Figure 21 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 09

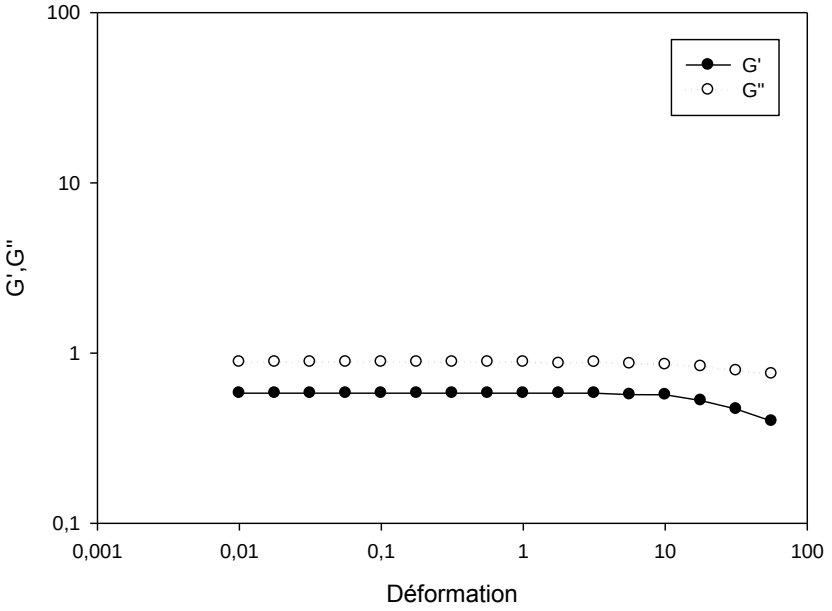


Figure 22 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 10

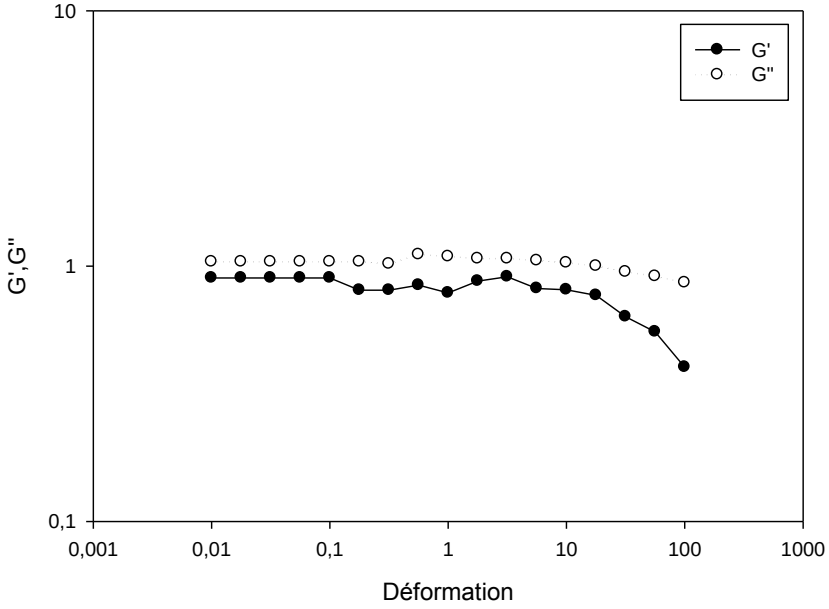


Figure 23 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 11

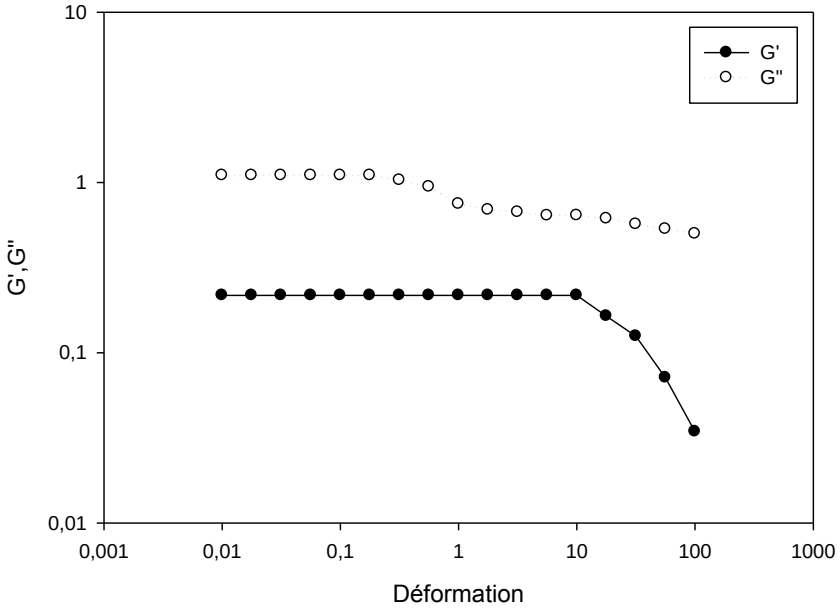


Figure 24 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 12

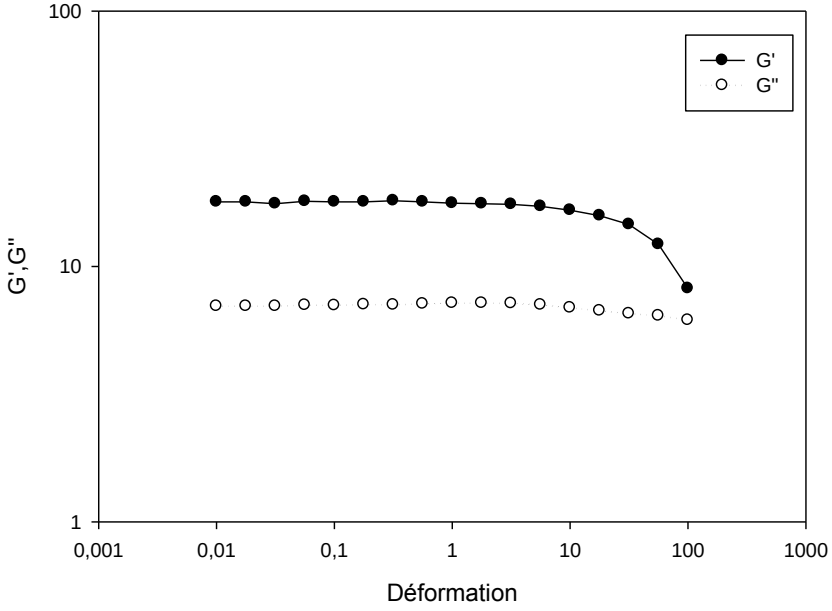


Figure 25 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 13

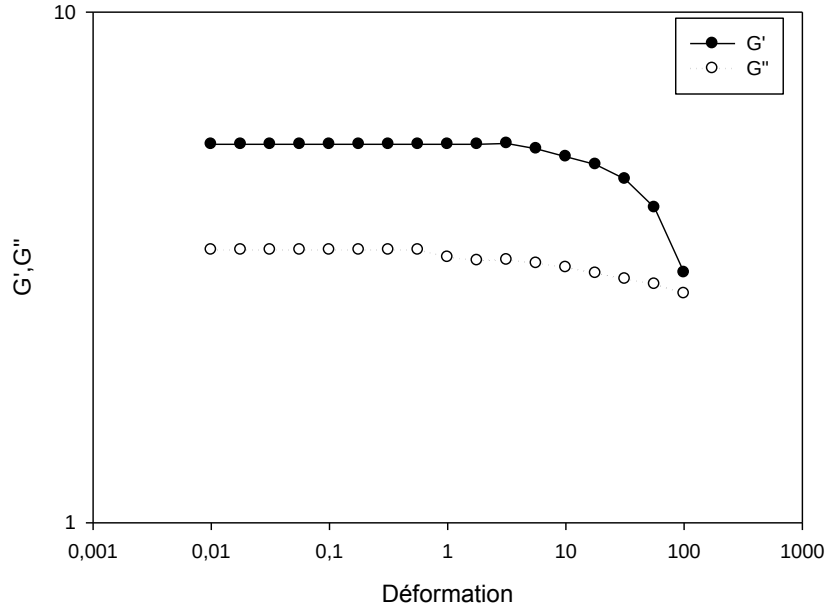


Figure 26 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 14

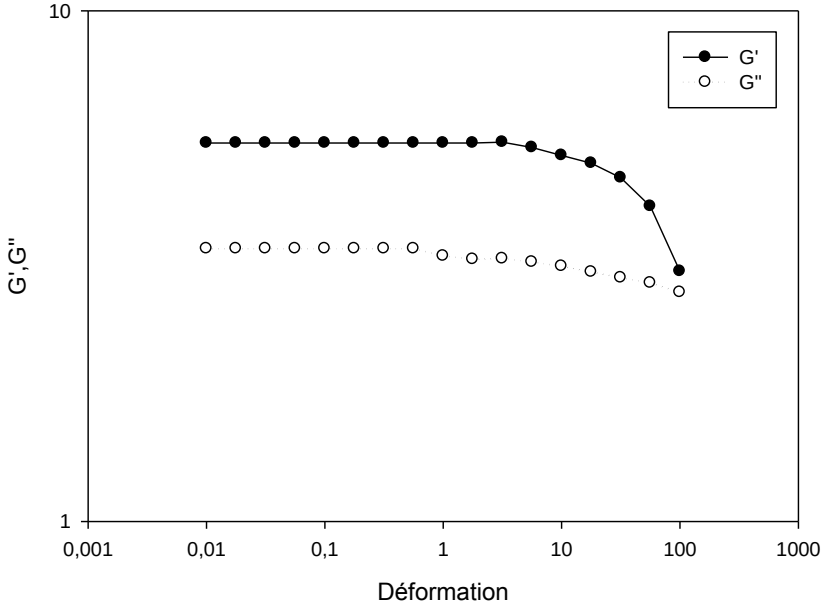


Figure 27 : Courbe de viscoélasticité de l'essai N° 16