

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES



En vue de l'obtention du Diplôme de Master Académique en Biologie
Option: Alimentation Humaine et Qualité des Produits

Thème

Essai de valorisation de quelques ressources agricoles par l'extraction des saponines à partir des feuilles de noyer et leur application dans l'élaboration d'une pommade cosmétique et les pectines à partir d'écorces de melon et leur caractérisation.

Présenté par :

M^{elle} CHEMOUL Tamazouzt

M^{elle} KAL Samia

Encadré par : M^{elle} BENAHMED DJILALI A. Maître de conférences B (UMMTO)

Devant le jury composé de :

M^r AMROUCHE T. (Président)

Maître de conférences A (UMMTO)

M^{me} HELLAL Z. (Examinatrice)

Maître assistante A (UMMTO)

M^r SADOUDI R. (Examineur)

Maître de conférences B (UMMTO)

Soutenu le : 29.10.2015

2014-2015

Remerciements

On remercie avant tout, Dieu tout puissant pour nous avoir donné la santé, le courage et la foi afin de réaliser ce travail.

Au terme de notre travail de mémoire nous tenant à exprimer toutes nos reconnaissances et remerciements à Madame BENAHMED DJILALI ADIBA pour avoir accepté de diriger ce travail.

On remercie également Monsieur HOUALI K, de nous avoir accueilli dans son laboratoire et mis à notre disposition certains matériaux nécessaires pour la réalisation de ce travail. On lui adresse nos sincères remerciements.

Nous tenons aussi à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements aux membres de jury :

M^r AMROUCHE T

M^{me} HELLAL Z

M^r SADOUDI R

D'avoir accepter d'examiner ce modeste travail.

On remercie Monsieur BEZAZI, responsable de l'unité de recherche (FSI) de nous avoir accueilli dans son laboratoire et spécialement l'ingénieur de laboratoire de rhéologie (FATIHA) de l'université M'hamed Bouguerra de Boumerdes de nous avoir effectuer la viscosité de nos pommades élaborées.

On remercie Monsieur Saifi Amirouche ingénieur de laboratoire de chimie de Hasnaoua de l'UMMTO de nous avoir effectuer l'analyse de la microstructure des pectines.

On tient à remercier, tous les membres des laboratoires communs (d'Agronomie et de Biologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou) pour leurs aide et gentillesse à notre égard.

Nous remercions nos familles respectives pour tout le soutien et l'aide précieuse qu'ils nous ont apportés.

On remercie enfin, tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents : en témoignage de l'amour, du respect et de la gratitude que je vous porte. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre soutien, votre dévouement, votre compréhension et pour l'attention dont vous avez et vous faites toujours preuve. Les mots me manquent pour vous exprimer ma reconnaissance.

Que dieu vous réserve bonne santé et longue vie.

Mon très cher frère : merci pour ton soutien. Restons unis et soyons fidèles aux espérances de nos parents.

TAMAZOUZT

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à

A mon cher père qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifices conseils et ses encouragements.

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.

Je souhaite qu'ils trouvent à travers ce mémoire le faible témoignage de leurs efforts et sacrifices. Que Dieu vous protège.

A mes chers frères et mes chères sœurs ;

A tous ceux qui me sont chère et que je n'ai pas pu citer ;

A l'ensemble de tous les étudiants et étudiantes de ma promotion.

SAMIA

Résumé

Ce travail entre dans le cadre de la valorisation des déchets agricoles et des sous- produits de l'alimentation de notre pays. Les extractions des pectines à partir d'écorces de melon, et des saponines à partir des feuilles de noyer ont été réalisées. Les pectines et les saponines représentent une classe très intéressante de produits actifs, et sont identifiés comme composés multifonctionnels, avec plusieurs activités pharmacologiques.

Le rendement en saponines obtenu est de 22,8%. L'application de ces dernières dans des pommades a conduit à l'obtention de deux formulations jugées de bonnes qualités sensorielle, physicochimique et microbiologique.

Les rendements en pectines obtenus en utilisant les sulfates d'aluminium et le chlorure d'aluminium comme agents de précipitation sont respectivement 6,916% et 9,166 %. Les pectines précipitées par le sulfate d'aluminium ont présenté une microstructure et les mêmes groupes fonctionnels que de ceux des pectines commerciales.

Mots clés : écorces de melon, feuilles de noyer, valorisation, pectines, saponines.

Summary

This work falls within the framework of the development of agricultural wastes and by-products of food in our country. Extractions pectins from melon rinds and saponins from the leaves of walnut were performed. Pectins and saponins are a very useful class of active ingredients, and are identified as multifunctional compounds, with several pharmacological activities. The yield of saponins obtained is 22.8%. The application of the latter in ointments led to obtaining two formulations of good sensory, physicochemical and microbiological qualities. Pectin yields obtained using aluminum sulphate and aluminum chloride as precipitating agents are 6.916% and 9.166% respectively. Pectin precipitated by aluminum sulfate showed a microstructure similar to those of commercial pectins.

Keywords: melon peel, walnut leaves, valuation, pectin, saponins.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Résumé | |
| Table des matières | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Introduction | 1 |
| <i>Synthèse bibliographique</i> | |
| Chapitre I : Généralités sur le melon et le noyer | |
| ❖ <u>Le melon</u> | |
| I.1. Définition..... | 3 |
| I.2. Systématique | 3 |
| I.3. Morphologie de melon..... | 3 |
| I.4. Variétés de melon..... | 4 |
| I.5. Production de melon en Algérie | 4 |
| I.6. Composition nutritionnelle..... | 4 |
| I.7. Bienfaits de melon sur la santé..... | 5 |
| ❖ <u>Le noyer commun</u> | |
| I.1. Définition | 5 |
| I.2. Systématique | 5 |
| I.3. Caractéristiques morphologiques..... | 5 |
| I.4. Composition des feuilles de noyer et propriétés..... | 6 |
| I.5. Production en Algérie..... | 6 |
| I.6. Importance de la culture de noyer..... | 7 |
| Chapitre II : Généralités sur les pectines | |
| II.1. Définition | 8 |
| II.2. Structure..... | 8 |
| II.3. Localisation..... | 9 |
| II.4. Biosynthèse des pectines..... | 9 |
| II.5. Dégradations des pectines..... | 9 |
| II.6. Principales sources de pectines à usages industriels..... | 9 |
| II.7.Méthodes d'extraction des pectines | 10 |
| II.8. Propriétés des pectines..... | 11 |

| | |
|---|----|
| Chapitre III : Généralités sur les saponines | |
| III.1. Définition..... | 16 |
| III.2. Constitution chimique..... | 16 |
| III.3. Structure des saponines | 16 |
| III.3.1. Saponines à génines triterpéniques..... | 16 |
| III.3.2. Saponines à génines stéroïdiques..... | 17 |
| III.4. Biosynthèse des saponines..... | 18 |
| III.5. Caractéristiques physico-chimiques..... | 18 |
| III.6. Méthodes d'études des saponines | 18 |
| III.7. Propriétés | 19 |

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| IV.1. Cadre de l'étude..... | 21 |
| IV.2. Matériel biologique | 21 |
| IV.3. Appareillages et réactifs | 22 |
| IV.4. Méthodes..... | 22 |
| IV.4.1. Analyses physico-chimiques des matières premières..... | 23 |
| IV.4.2. Analyse phytochimique des feuilles fraîches de noyer..... | 25 |
| IV.4.3. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)..... | 27 |
| IV.4.5. Extraction des saponines | 29 |
| IV.4.5.1. Calcul de rendement | 30 |
| IV.4.5.2. Application des saponines dans une pommade..... | 31 |
| IV.4.5.2.1. Contrôle de la qualité des excipients..... | 31 |
| IV.4.5.2.2. Élaboration des pommades..... | 31 |
| IV.4.5.2.3. Analyses physico-chimiques des pommades élaborées.. | 32 |
| IV.4.5.2.4. Analyse sensorielle des pommades élaborées..... | 32 |
| IV.4.5.2.5. Test microbiologique..... | 33 |
| IV.4.6. Extraction des pectines..... | 34 |
| IV.4.6.1. Prétraitement des écorces | 34 |
| IV.4.6.2. Extraction des pectines..... | 35 |
| IV.4.6.3. Calcul de rendement..... | 37 |
| IV.4.6.4. Détermination de la teneur en eau et en cendres des pectines | 38 |
| IV.4.6.5. Détermination de la microstructure des pectines au MEB... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| IV.4.6.6. Analyse des groupements fonctionnels des pectines par IR..... | 38 |
| Chapitre V : Résultats et discussions | |
| V.1. Résultats de la caractérisation physico-chimique des matières premières..... | 39 |
| V.2. Résultats d'analyse phytochimique des feuilles fraîches de noyer | 40 |
| V.3. Résultats de dosage des polyphénols totaux des extraits (feuilles fraîches et poudre des feuilles) de noyer..... | 41 |
| V.4. Résultats de rendement d'extraction des saponines..... | 42 |
| V.5. Résultats de contrôle de la qualité des excipients..... | 43 |
| V.6. Résultats de contrôle des pommades élaborées..... | 43 |
| V.6.1. Résultats des analyses physico-chimiques des pommades..... | 43 |
| <i>V.6.1.1. Résultats de pH</i> | <i>43</i> |
| <i>V.6.1.2. Résultats de la viscosité.....</i> | <i>44</i> |
| V.6.2. Résultats de l'analyse sensorielle..... | 45 |
| <i>V.6.2.1. La couleur.....</i> | <i>45</i> |
| <i>V.6.2.2. L'odeur.....</i> | <i>46</i> |
| <i>V.6.2.3. La texture.....</i> | <i>46</i> |
| <i>V.6.2.4. L'homogénéité.....</i> | <i>47</i> |
| V.6.3. Résultats de test microbiologique..... | 48 |
| V.6.4. Résultats des rendements en pectines | 49 |
| V.6.5. Résultats de la teneur en eau et en cendres..... | 52 |
| V.6.6. Résultats de MEB..... | 54 |
| V.6.7. Résultats IR..... | 54 |
| Conclusion | 57 |
| Références bibliographiques | |
| Annexes | |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau I : Principales sources de pectines d'intérêt industriel | 10 |
| Tableau II: Les souches utilisées dans notre étude microbiologique | 22 |
| Tableau III : Composition des formulations élaborées | 31 |
| Tableau IV : Résultats des paramètres physico-chimiques des écorces de melon fraîches | 39 |
| Tableau V : Résultats des paramètres physico-chimiques des feuilles de noyer fraîches | 39 |
| Tableau VI: Résultats des tests phytochimiques effectués sur la poudre des feuilles de noyer. | 40 |
| Tableau VII: Résultats du dosage des PPT des extraits de (feuilles fraîches et poudre) de noyer | 41 |
| Tableau VIII : Rendement d'extraction des saponines à partir de la poudre des feuilles de noyer | 43 |
| Tableau IX : Résultats de pH des formulations de pommades | 43 |
| Tableau X : Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne \pm ET) exprimés pour l'extrait des saponines et les pommades F2 et F3 et la sensibilité des souches testées. | 48 |
| Tableau XI : Rendements en pectines extraites à partir d'écorces de melon selon deux méthodes de précipitation. | 49 |
| Tableau XII : Teneurs en humidité, en cendres des pectines d'écorces de melon précipitées par le chlorure et le sulfate d'aluminium. | 53 |

LISTES DES FIGURES

| | |
|--|-----|
| Figure 1: Fruit de melon jaune canari (Tizi-Ouzou) | 3 |
| Figure 2 : Arbre de noyer (Tizi-Ouzou) | 6 |
| Figure 3: représentation schématique de la structure des pectines | 8 |
| Figure 4 : modèle de gélification des pectines HM | 13 |
| Figure 5: Phénomène de gélification des pectines LM selon le modèle de la boîte à œuf. | 14 |
| Figure 6: Structure des principaux squelettes des génines triterpéniques | 16 |
| Figure 7: Structure des principaux squelettes des génines stéroïdiques | 17 |
| Figure 8 : Principaux saccharides rencontrés dans les saponines | 17 |
| Figure 9: aspect général des feuilles de noyer et les écorces de melon coupées. | 21 |
| Figure 10 : Protocole d'extraction des polyphénols totaux (PPT) | 28 |
| Figure 11 : Diagramme de dosage des polyphénols totaux(PPT) | 29 |
| Figure 12 : Protocole d'extraction des saponines par des solvants de polarité croissante | 30 |
| Figure 13 : Pectines fraîches précipitées | 37 |
| Figure 14 : Variation des viscosités (η) des pommades en fonction du taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) | 44 |
| Figure 15 : Rhéogramme représentant la contrainte de cisaillement (τ) des pommades en fonction de leur taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$) | 44 |
| Figure 16 : Aspects des pommades élaborées | 45 |
| Figure 17 : Résultats relatifs à la qualité de la couleur des formulations de pommades | 45 |
| Figure 18 : Résultats relatifs à la qualité d'odeur des formulations de pommades | 46 |
| Figure 19: Résultats relatifs à la qualité de la texture des formulations de pommades | 46 |
| Figure 20 : Résultats relatifs à la qualité d'homogénéité des formulations de pommades | 47 |
| Figure 21 : Aspects des pectines obtenues | 50 |
| Figure 22 : Structures microscopiques des pectines | 54 |
| Figure 23 : Spectre infrarouge des pectines | 555 |

LISTE DES ABREVIATIONS

DSAT : Direction du Service Agricole de la Wilaya de Tizi-Ouzou

KDa: Kilo dalton

HM: High-méthoxy

LM: low-méthoxy

HG : homogalacturonique

aw : activité de l'eau

DM : Degré de méthylation

DAc : Degré d'acétylation

SIN : Système International de Normalisation

CCM : Chromatographie sur couche mince

MPLC : Chromatographie Liquide à moyenne pression

HPLC : Chromatographie liquide à haute pression

ATCC: American Type Culture Collection

MEB : microscope électronique à balayage

IR : Infra-rouge

AFNOR : Association Française de Normalisation

N: Normal

V/V : Volume à Volume

nm: Nanomètre

mg EAG/g : Milligramme équivalent en acide gallique par gramme de matière sèche.

DMSO: Dimethylsulfoxyde

DO : Densité Optique

OGA : Gélose Glucosé à l'Oxytetracycline

Kv: Kilovolt

CDTA : cyclohexane-trans-1, 2- diamine tétra-acétate

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, un regard particulier est porté sur la recherche de nouvelles sources de molécules végétales, afin de mettre au point de nouveaux principes actifs ou de découvrir des analogues de structures des molécules existantes.

Les polysaccharides sont connus et exploités depuis de nombreuses années par l'industrie à cause de leur abondance, leurs sources renouvelables, non-toxiques, biodégradables, et sont à l'origine de plusieurs produits dérivés après modifications chimiques et biochimiques (ESPIARD, 2002). La pectine additif naturel utilisé intensivement dans l'industrie alimentaire est l'un des fruits de la valorisation des sous-produits. Ça demande sur le marché mondial est au-dessus de 30.000 tonnes annuellement et se développe d'environ 4-5 % par an (YEOH *et al.*, 2008).

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît.

Face aux limites thérapeutiques de ces derniers les scientifiques ont été poussé à orienter les recherches vers des nouvelles voies et surtout l'utilisation des métabolites secondaires des plantes (composés phénoliques, saponines, alcaloïdes, huiles essentielles...) qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et possèdent un très large éventail d'activités biologiques (HAMILTON-MILLER et SHAH, 2004).

Les saponines ou saponosides sont des composés produits naturellement par certaines plantes, caractérisées par leurs propriétés tensioactives leur conférant un pouvoir moussant. Différentes saponines isolées comportent des propriétés immunomodulatrice, cytotoxique, antitumorale, anti-inflammatoire, antifongique, antivirale, expectorante pour ne citer que les principales propriétés (BRUNETON, 1999).

L'Algérie possède un grand potentiel de ressources naturelles, et notamment du monde végétal, qui n'est pas ou peu exploité à l'heure actuelle. Les activités agricoles et domestiques humaines génèrent d'importantes quantités de sous-produits qui sont jetés dans la nature, constituant ainsi une nuisance certaine pour l'environnement et un gaspillage de matières organiques utiles. Ces sous-produits pourraient être transformés en capitaux, si des bioproduits potentiellement commercialisables peuvent être extraits à partir de ces derniers.

L'objectif de notre travail est de contribuer à cet axe de valorisation d'actualité et ce par : l'étude de la possibilité d'extraction des pectines et des saponines à partir de différentes matières végétales (écorces de melon et feuilles de noyer) disponibles en grande quantité dans la région de Tizi-Ouzou.

Cette opération de valorisation permettrait :

Un gain économique : en évitant les importations aux prix imposés par les pays producteurs. En outre, ces substances pourraient constituer une source originale pour le développement de nouveaux produits dérivés pour de nombreuses industries.

Un gain écologique : en réduisant la charge de pollution de l'environnement.

La présente étude comprend deux parties : la première est une synthèse des données bibliographiques qui se divise en trois chapitres : le premier correspond à une représentation générale de melon et de noyer. Les deux autres chapitres traitent les généralités concernant les pectines et les saponines respectivement.

La deuxième partie porte sur les manipulations et les résultats obtenus. Dans le quatrième chapitre, l'expérimentation est initiée par des analyses physicochimiques communes (teneur en eau et en cendres, pH et acidité titrable) des feuilles de noyer et écorces de melon frais. Ensuite le travail est divisé en 2 parties :

- **Celle de feuilles de noyer**

Où l'expérimentation est initiée par une analyse photochimique des feuilles fraîches de noyer suivi d'un dosage des polyphénols totaux. Ensuite, l'extraction des saponines à partir de la poudre des feuilles de noyer et leur application dans une pommade cosmétique ont été réalisées. Les contrôles physico-chimiques et microbiologiques des pommades élaborées (pH, viscosité, test sensoriel, test microbiologique) ont été faits également.

- **Celle d'écorces de melon**

Dans cette partie, l'extraction des pectines à partir des écorces et leur analyse ont été effectuées.

Les résultats et la discussion de chaque expérimentation de notre travail, seront exposés dans le cinquième chapitre.

Synthèse Bibliographique

Chapitre I

Généralités sur le melon et noyer

❖ *Le melon*

I.1. Définition

Le melon est une plante herbacée annuelle, largement cultivée comme plante potagère pour son fruit comestible. Le terme désigne aussi le fruit lui-même très savoureux, sucré et parfumé. Il est originaire d'Inde ou d'Afrique. Les melons sont principalement cultivés dans les pays à climat chaud. C'est un fruit typiquement méditerranéen (VAROQUAUX, 2006).

I.2. Systématique

Selon GUIGNARD et DUPONT (2004), le melon appartient au :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous- embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Cucurbitales

Famille : Cucurbitaceae

Genre : Cucumis

Espèce : *Cucumis melo*

I.3. Morphologie de melon

Le melon est une espèce polymorphe, à tige herbacée, rampante ou grimpante grâce à ses vrilles (CHAUX et FOURY, 1994).

Les feuilles peuvent être de dimensions et de formes variables, entières, réniformes, pentagonales à 3 ou à 7 lobes. L'axe principal de la tige est un sympode.

La tige possède des vrilles pour s'accrocher au tuteur. Le melon possède des racines abondantes et traçantes. Quelques-unes peuvent descendre à 1 mètre de profondeur (JETT, 2005).



Figure 1: Fruit de melon *Jaune canari* (Tizi-Ouzou)

I.4. Variétés de melon

Il existe plusieurs variétés qui se distinguent entre elles par un certain nombre de caractères qui sont : nom, forme, grosseur du fruit, couleur de l'écorce et de la chair. Ces variétés sont regroupées en deux catégories :

I.4.1. Melon d'été

Le véritable cantaloup (*C.melo var.cantalupensis*) : ce melon a une chair orangée se reconnaît à ses côtés marqués et rugueux vert pâle (BANNEROT et GALLAIS, 1992).

Le melon brodé (*C.melo var.reticulatus*) : ce melon fort savoureux à une chair de couleur rose saumon ou jaune orangé (ODET, 1991).

I.4.2. Melon d'hiver

Le melon jaune canari ou melon brésilien : de forme oblongue, à une écorce lisse de couleur jaune vif, d'une chair blanchâtre, très savoureux et sucrée. Il est parfumé lorsqu'il est mûr (ODET, 1991).

Le melon tendral ou melon vert olive : de forme allongée, a une écorce plissée de couleur vert très foncé, d'une chair blanche verdâtre (ODET, 1991).

I.5. Production de melon en Algérie

Le melon est l'une des productions « légumières » principales de l'Algérie. Il est consommé en grande partie en été. Le melon est cultivé en été dans presque dans toutes les régions d'Algérie.

La superficie occupée par le melon varie selon les saisons, et elle dépend de divers facteurs notamment l'eau qui constitue un facteur essentiel pour son développement. Les agriculteurs utilisent souvent des variétés locales qui donnent de très bons rendements (MESBAH et BOUHALOUFA, 2012).

Dans la wilaya de Tizi-Ouzou, la surface cultivée cette année est de l'ordre de 760 hectares, avec des rendements de 80 quintaux par hectare. Ces chiffres sont à titre indicatif (DSAT, 2015)

I.6. Composition nutritionnelle

Le melon est un fruit riche en nutriments, il figure parmi les fruits les plus consommés en Algérie. C'est un fruit complet, qui a presque tous les nutriments en proportion adéquate. Il est très riche en eau (90%), ce qui le rend particulièrement rafraichissant.

Il renferme des fibres, ne contient aucune quantité de gras. Il est également riche en plusieurs vitamines et minéraux, dont le potassium, l'acide folique et la vitamine A. Le melon à chair orangée constitue aussi une source de caroténoïdes et de vitamine C (ESPIARD, 2002).

I.7. Bienfaits de melon sur la santé

Plusieurs études prospectives et épidémiologiques ont démontré que la consommation du melon diminuait le risque de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies chroniques. En outre, il est diurétique, laxatif et excellent détoxifiant (LADOGRAVE, 2008).

❖ Le noyer commun

I.1. Définition

Le noyer commun est une espèce forestière et fruitière de grande importance, du fait que ses fruits, son bois, son écorce et ses feuilles trouvent une large utilisation dans la vie quotidienne. Il est originaire des régions montagneuses d'Asie, répandus sur tous les continents et dont il existe une vingtaine d'espèces (BONEV, 1973).

I.2. Systématique

Selon SPICHIGER *et al.*, (2004), le noyer commun appartient au :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicotylédones

Ordre : Fagales

Famille : Juglandaceae

Genre : Juglans

Espèce : *Juglans regia L.*

I.3. Caractéristiques morphologiques

Les feuilles de noyer, assez grandes et longuement pétiolées sont composées et imparipennées, elles dégagent une odeur très caractéristique quand on les froisse.

Les fleurs femelles sont très discrètes, verdâtres, à l'extrémité des petites branches, l'inflorescence mâle est constituée en chatons pendants. Le Fruit est une drupe (la noix) à péricarpe vert et charnu (brou) qui recouvre une coque à deux valves qui contient la graine oléagineuse à l'aspect d'un petit cerveau (cérébroïde) (SPICHIGER *et al.*, 2004).



Figure 2 : Arbre de noyer (Tizi-Ouzou)

I.4. Composition des feuilles de noyer et propriétés

Le principal constituant identifié dans les feuilles est la juglone (5-hydroxy-1,4-naphtoquinone) qui existe dans la plante fraîche (feuille, brou) sous forme de glucoside du 1, 4,5-trihydroxynaphtalène (2% dans le brou, 0,6 % dans les feuilles), mais aussi sous forme libre. La juglone est une substance colorant en jaune la peau et les phanères, anti-inflammatoire et semble-t-il active contre de nombreux microorganismes (bactéries, champignons pathogènes, virus) et parasites (WEIR *et al.*, 2004).

Les feuilles sont riches en tanins galliques et éllagiques. Ils sont astringents (forment un complexe chimique avec les protéines et assèchent les écoulements muqueux), antiseptiques et cicatrisants, anti-inflammatoires et anti-radicaux libres.

Elles renferment également une faible quantité d'huile essentielle, de l'acide ascorbique, des acides phénols (acides caféyl- et p- coumaroylquiniques), des flavonoïdes (hétérosides du quercétol), connu pour leur propriété antioxydante (BRUNETON, 2009).

I.5. Production en Algérie

Le noyer commun est cultivé traditionnellement en Algérie et sa culture n'a pas connu une grande extension, car elle est confrontée à plusieurs problèmes entravant son développement. Il se trouve souvent sous forme de peuplement dans différentes régions de l'Algérie constituées généralement d'hybrides naturels (BONEV, 1973).

Dans la wilaya de Tizi-Ouzou, la surface cultivée cette année est de l'ordre de 54 hectares, avec des rendements de 20 quintaux par hectare. Ces chiffres sont à titre indicatif (DSAT, 2015).

I.6. Importance de la culture de noyer

I.6.1. Importance médicinale

L'espèce *Juglans regia* a été abondamment utilisée en médecine. Les principaux emplois internes de l'espèce ont porté sur la tuberculose et la scrofule (ou écrouelles), maladie d'origine tuberculeuse qui s'accompagnait de fistules. Mais ce sont ses usages externes qui impressionnent tout particulièrement par leur nombre. On l'a employé pour soigner toutes sortes d'affections cutanées - eczéma, impétigo, psoriasis, abcès froids, plaies atones - de même que la transpiration excessive des mains et des pieds (WEIR *et al.*, 2004)

Ladite espèce est aussi efficace contre la bactérie induisant la maladie du charbon. En outre, elle est utilisée pour soigner les pellicules et freiner la chute des cheveux. D'ailleurs, elle rentre dans la composition de certains shampoings du commerce en rendant la chevelure souple et luisante (VANIER, 1999).

I.6.2. Importance économique

I.6.2.1. Le bois et brou

Son bois est d'une valeur inestimable, car très recherché dans l'armurerie et l'ébénisterie; il est bien connu pour sa grande résistance et sa dureté, par sa couleur caractéristique. Les brous entrent dans la préparation d'une teinture employée en ébénisterie pour donner une couleur brune au bois blanc.

I.6.2.2. Le fruit

Les noix sont comestibles, ont une valeur nutritionnelle élevée et contiennent une huile aux propriétés diététiques (OUNIS et ZITOUNI, 1996).

CHAPITRE II

Généralités sur les pectines

II.1. Définition

Les pectines sont des polysides complexes entrant dans la composition des parois cellulaires de la plupart des végétaux supérieurs (DONATO, 2004). Le terme pectine demeure néanmoins ambigu en ce sens qu'il décrit plusieurs catégories de molécules distinctes.

En fait, il désigne une famille d'oligo- et polysaccharides qui présentent des caractéristiques communes. Cependant, si l'on s'en réfère à leur structure fine, pourront être très différente. Il est à signaler que toutes les pectines présentent une caractéristique commune, d'être riche en acide galacturonique qui est considéré comme monosaccharide marqueur (RIDLEY *et al.*, 2001).

II.2. Structure

Les polysaccharides pectiques sont formés de chaînes principales constituées de galacturonane et de rhamnogalacturonane, et de chaînes latérales constituées d'arabinane et de galactane (SCHOLS et VORAGEN, 2002).

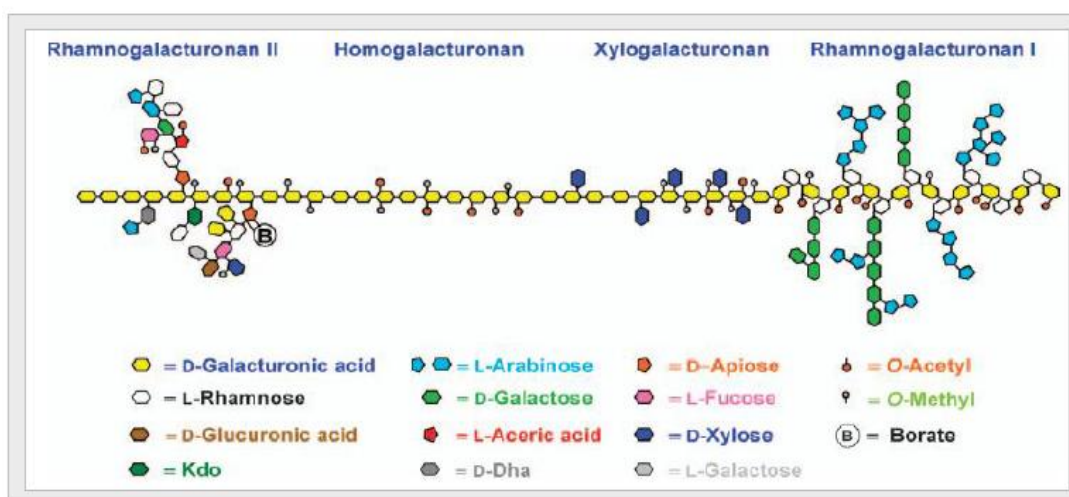


Figure 3: représentation schématique de la structure des pectines (HENRIK *et al.*, 2007).

Leur structure est souvent idéalisée par la succession de zones dites "lisses" constituées d'homogalacturonanes et de zones dites "hérissées" constituées d'un squelette principal "rhamnogalacturonane I" branché par des chaînes latérales d'oses neutres. Ces trois entités "homogalacturonane", "rhamnogalacturonane I", "chaînes latérales d'oses neutres" forment les domaines constitutifs des pectines.

Les oses constitutifs des pectines sont estérifiés par différents substituants non osidiques. Les acides galacturoniques constitutifs des zones homo- et rhamnogalacturoniques peuvent être estérifiées en C-6 par du méthanol et en C-2 et/ou en C-3 par de l'acide acétique.

Chez certains végétaux, les oses constitutifs des chaînes latérales (arabinose et galactose) sont estérifiés par l'acide férulique (RALET *et al.*, 2006).

II.3. Localisation

Les pectines sont surtout présentes dans les tissus parenchymateux des dicotylédones. Elles se trouvent aussi dans la lamelle moyenne. À ce niveau, elles peuvent être faiblement méthylées et fortement pontées par des ions Ca^{++} , surtout au niveau des jonctions et des espaces intercellulaires, ce qui permet de régler les associations de polysaccharides pectiques entre eux (VINCKEN *et al.*, 2003).

II.4. Biosynthèse des pectines

Il est largement admis que les polysaccharides des parois cellulaires proviennent de la polymérisation de monosaccharides (ALBERSHEIM *et al.*, 1997 in YAPO, 2007) et que l'appareil de Golgi est le lieu de synthèse des polysaccharides non celluloses, en l'occurrence les pectines (BACIC, 2006).

Ces composants polysaccharidiques seraient d'abord synthétisés de manière séparée avant que n'intervienne, ultérieurement, leur probable assemblage en complexe pectique (VINCKEN *et al.*, 2003).

II.5. Dégradation des pectines

Les substances pectiques en solution peuvent subir deux grands types de dégradations : désestérification et dépolymérisation.

II.5.1. Réactions de désestérification

C'est un ensemble de réactions classiques qui libèrent le méthanol et forment des pectases.

II.5.2. Réactions de dépolymérisation

Elles s'effectuent soit par hydrolyse des liaisons α (1-4), soit par des réactions de β élimination qui provoquent la rupture des liaisons glycosidiques adjacentes en un groupe estérifié entre les résidus d'acide galacturonique et l'apparition d'une double liaison entre les carbones C-4 et C-5 (MORRIS *et al.*, 2002). Ces réactions sont importantes à prendre en compte lors de l'extraction des pectines (RALET *et al.*, 2001).

II.6. Principales sources de pectines à usages industriels

Les pectines sont très largement répandues dans les tissus végétaux où elles constituent un ciment intercellulaire dans la lamelle moyenne et un liant intermoléculaire dans la paroi primaire. Cependant, le nombre de sources naturelles qui peuvent être utilisées pour des usages industriels est limité. Le tableau I, précise les sources actuelles de pectines commerciales.

Tableau I : Principales sources de pectines d'intérêt industriel (THAKUR *et al.*, 1997).

| Fruits | (%) massiques de pectines |
|----------------------------------|---------------------------|
| Pomme | 0,5 – 1,6 |
| Marc de pomme | 1,5 – 2,5 |
| Pulpe de citron | 2,5 – 4,0 |
| Zeste d'orange | 3,5 – 5,5 |
| Péricarpe de fruit de la passion | 2,1– 3,0 |

II.7. Méthodes d'extraction des pectines

Les pectines peuvent être extraites des parois végétales par trois différentes méthodes à savoir : chimique, enzymatique et physique.

II.7.1. Extraction chimique

L'extraction des pectines de la matière première est habituellement effectuée par le traitement acide (pH 1,5 - 3) à température élevée (70 à 90 °C), en utilisant l'acide chlorhydrique, l'acide nitrique ou, dans certains cas, l'acide sulfurique. Cette étape permet l'extraction et la solubilisation des matériaux de pectine des tissus végétaux.

L'extrait de pectine est alors séparé des résidus de peau ou de pulpe par des procédés de filtration ou de centrifugation. La pectine est alors séparée de l'extrait purifié par précipitation avec de l'alcool (isopropanol, éthanol ou méthanol) ou par la précipitation avec des sels insolubles, par l'addition d'un cation polyvalent, habituellement l'aluminium.

Le précipité obtenu est lavé avec de l'alcool et filtré pour enlever les impuretés solubles, et finalement séché et broyé en poudre (LOPES DA SILVA et ROA, 2006).

II.7.2. Extraction enzymatique

Les enzymes non pectolytiques (cellulases, hémicellulases et les protéases) solubiliseront les pectines par destruction des réseaux cellulosiques, hémicellulosiques et protéiques (PTICHKINA *et al.*, 2008).

En comparaison avec l'extraction acide, l'extraction des pectines par les enzymes non pectolytiques conduit à un rendement plus important (PANOUILLE *et al.*, 2006 in YAPO, 2007). En revanche, les pectines extraites par ces types d'enzymes ont des masses molaires et des viscosités intrinsèques moins élevées que les pectines extraites par la voie acide.

De plus, leur pouvoir gélifiant est quasiment nul. De manière générale, les enzymes isolent des fractions pectiques d'une grande diversité, allant du polymère de haute masse molaire à ceux de faibles masses molaires (PTICHKINA *et al.*, 2008)

II.7.3. Extraction physique

L'extraction des pectines de la paroi exige un milieu aqueux (eau pure, agents chimiques dilués ou enzymes). Cependant, un certain nombre de procédés d'extraction des pectines sont considérés comme physiques (ou mécaniques).

Parmi ces procédés insuffisamment précis, se classent les extractions par cuisson-extrusion, autoclave, microonde, Soxhlet ou pression manuelle. Le rendement et la composition osidique des pectines extraites par cuisson-extrusion varient en fonction des paramètres d'extraction, et ce rendement est, dans certains cas, similaires à celui obtenu par extraction acide.

L'extraction par Soxhlet donne un rendement pectique plus important que celui par extraction par pression manuelle. Cette dernière conduit, dans certaines conditions, à un rendement plus élevé que l'extraction assistée par micro-onde (YAPO, 2007).

II.8. Propriétés des pectines

II.8.1. Propriétés hydrodynamiques

➤ *Poids moléculaire*

Les propriétés physiques des pectines dépendent fortement de leurs masses moléculaires (GUILLOTIN, 2005). Ce paramètre va de quelques dizaines à plusieurs centaines de milliers d'unités (kDa).

La masse moléculaire des pectines dépend non seulement de la méthode utilisée pour la déterminer, mais aussi du type de matière première utilisée et des conditions d'extraction choisies (CONSTENLA et LOZANO, 2003).

➤ *Viscosité*

La viscosité des pectines est inférieure à celle de la plupart des autres gommés, il est donc rare d'utiliser les pectines pour augmenter la viscosité d'un produit. Toutefois, les pectines ont des effets intéressants du fait du comportement newtonien de leurs solutions à faible concentration (LOPES DA SILVA et ROA, 2006).

II.8.2. Propriétés chimiques

➤ *Solubilité*

Les pectines se comportent comme des poly-électrolytes grâce à la présence de groupements carboxyliques dans leur squelette (LOPES DA SILVA et ROA, 2006). En général, les pectines sont solubles en milieux aqueux (eau, solutions tampons à faible force ionique) comme le formamide, le diméthyl-formamide, et le glycérol (VORAGEN et VISSER, 1996).

➤ *Stabilité*

La stabilité maximale des pectines a lieu à pH 4 (VORAGEN et VISSER, 1996). Pour des pH < 3 et à basse température, les groupements acétyles et méthyles sont déstabilisés et les sucres neutres sont hydroxylés. Par contre, les températures élevées accélèrent leur hydrolyse (SRIAMORNSAK, 2003).

En milieu alcalin et à basse température les groupements esters sont saponifiés. En milieu neutre et à température ambiante, la saponification est accompagnée de la réaction de dépolymérisation. Cette dégradation a lieu uniquement dans les liaisons glycosides et dans les résidus méthylés de l'acide galacturonique.

À des températures > 60°C, cette dégradation a lieu qu'à pH légèrement acide (pH proche de 5) (VORAGEN et VISSER, 1996).

➤ *Groupements fonctionnels*

***Degré de méthylation (DM)**

Le DM est défini comme étant le nombre de fonctions acides estérifiées avec du méthanol pour 100 monomères d'acides galacturonique. Ainsi deux familles de pectines sont distinguées:

- Pectines hautement méthylées ou HM (highméthoxy) qui possède un DM > 50 %.
- Pectines faiblement méthylées ou LM (lowméthoxy) qui possède un DM < 50 % (GUILLOTIN, 2005).

*** Degré d'acétylation (DAc)**

Il est défini comme le pourcentage de résidus galacturosyles estérifiés par un groupement acétyle. Ces groupements se localisent généralement au niveau des résidus rhamnogalacturonanes (SHARMA *et al.*, 2006).

II.8.3. Propriétés fonctionnelles

➤ *Propriétés gélifiantes*

En industrie alimentaire les pectines commerciales sont utilisées comme étant un additif alimentaire, dont le code est de : **SIN 440**.

La principale caractéristique physico-chimique recherchée est leur pouvoir de gélification. Les gels de pectines sont des gels physiques formés par association locale entre les chaînes macromoléculaires au niveau des zones de jonction.

Les gels se forment en plusieurs étapes durant le refroidissement. Tout d'abord les molécules de pectines se réunissent en fibrilles puis celles-ci se rassemblent en paquets, ces derniers s'agrègent en réseau. D'autres molécules de pectines viennent s'associer au réseau formé.

***Gélification des pectines hautement méthylées (HM)**

La gélification résulte de la formation de zone de jonction entre les régions homogalacturoniques (HG) des molécules pectiques, sous l'action du sucre qui favorise la diminution de l'activité de l'eau (a_w) et de l'acide qui réduit les répulsions électrostatiques intermoléculaires (SHARMA *et al.*, 2006).

La stabilité de ces zones de jonctions serait assurée par la combinaison de liaisons de type hydrogène et des interactions hydrophobes entre groupement méthyles. Le rhamnose et les chaînes latérales limitent l'extension de ces zones de jonction et assurent ainsi la formation d'un réseau tridimensionnel cohérent.

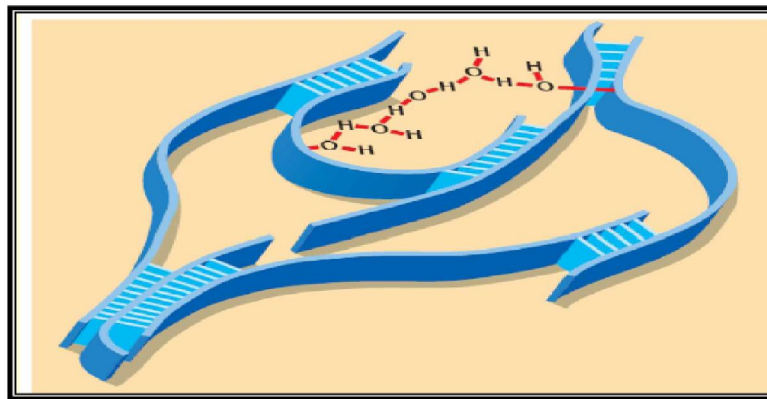


Figure 4: modèle de gélification des pectines HM (HERBSTREITH et FOX, 1998)

*Gélification des pectines faiblement méthylées (LM)

Ces pectines de faible DM forment des gels alimentaires thermoréversibles en présence des ions divalents, en l'occurrence le cation Ca^{++} , le seul utilisé en industrie alimentaire (YAPO, 2007) mais dans une large gamme de pH allant de 2,8 à 7 (GUILLOTIN, 2005).

La gélification est due à la formation des zones de jonction entre les régions HG des deux chaînes pectiques via des ponts Ca^{++} (SHARMA *et al.*, 2006) en formant de cavités qui permettent l'association des chaînes de pectines par la chélation des ions de calcium, formant ainsi un réseau moléculaire sous la forme de "boite à œufs" par analogie aux alginates (SRIAMORNSAK, 2003).

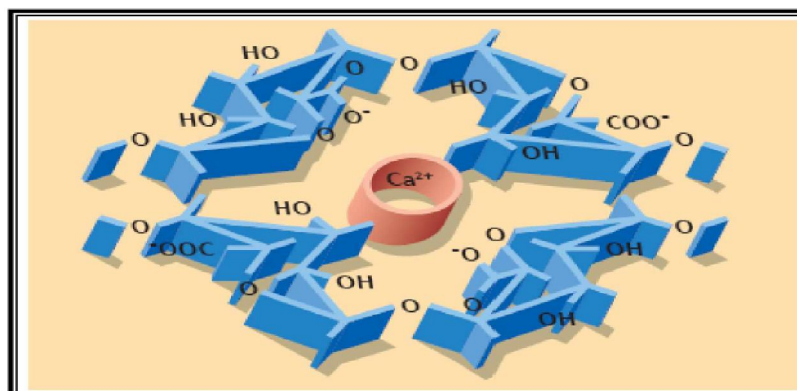


Figure 5: Phénomène de gélification des pectines LM selon le modèle de la boîte à œuf (SHARMA *et al.*, 2006)

➤ **Propriétés émulsifiantes**

La seule substance hypocycloïde commercialement reconnue comme émulsifiante est la gomme arabique (*Acacia Sénégal*) (AKHTAR *et al.*, 2002). Cependant, la cherté de celle-ci amènera les industriels à rechercher d'autres hypocycloïdes pouvant émulsifier des systèmes huile dans eau.

Selon PTICHKINA *et al.*, (2008), ce sont les pectines de betteraves et les pectines dépolymérisées d'agrumes et de pommes qui s'avèrent aptes à émulsifier et stabiliser des systèmes bi-phasiques : huile dans eau.

Le mécanisme d'émulsification des pectines commence par la formation des gouttelettes d'émulsion, par la fraction protéique, par son caractère amphotère, ensuite ces gouttelettes sont stabilisées par les chaînes polysaccharidiques hydrophiles qui fournissent une couche protectrice épaisse le long des molécules. Les études de LEROUX *et al.*, (2003), démontrent qu'une forte stabilité d'émulsification est liée à la présence des groupements acétyles.

➤ **Propriétés épaississantes**

Les pectines sont des matières épaississantes anioniques (PTICHKINA *et al.*, 2008). L'ajout de pectine à un produit alimentaire complexe, comme la confiture, modifie la perception de la saveur. Cette dernière dépend du type de pectine et des composés d'arôme.

L'ajout de pectine (HM) diminue à la fois la concentration en composés majeurs et l'intensité olfactive du composé apolaire.

L'ensemble des études menées dans ce domaine conduit à émettre l'hypothèse que des liaisons chimiques covalentes ou de faibles énergies (hydrophobes) entre la pectine et les composés d'arôme sont à l'origine de la modification de la perception olfactive.

II.8.4. Propriétés thérapeutiques des pectines

De par ses propriétés physicochimiques intrinsèques, la pectine peut jouer un rôle bénéfique en nutrition humaine en piégeant un certain nombre d'éléments présents dans la lumière intestinale. Ceux cités ci-dessous, sont parmi ces effets bénéfiques :

- La régulation du taux de cholestérol hépatique : La pectine assure une activité hypocholestérolémiante, en effet une dose de 6g/jour de pectine réduit à 13 % le taux de cholestérol (SHARMA *et al.*, 2006).
- La fixation des substances toxiques tels que les radio-nucléotides et les métaux lourds (WILLATS *et al.*, 2001).

- L'amélioration de la digestibilité des protéines.
- Elle présente une activité anti-inflammatoire.
- Elle est considérée comme une fibre alimentaire, réglant ainsi le transit intestinal, absorbant les sels biliaires et présentant une action sur la satiété (HERBSTREITH et FOX, 1998).
- les pectines sont considérées comme des ingrédients prébiotique spécifiques, qui favorisent sélectivement la croissance d'organismes bénéfiques dans le colon, tout en freinant le développement et l'activité des organismes pathogènes (MANDERSON *et al.*, 2005 ; SHARMA *et al.*, 2006).

- Au de la d'une certaine dose, les pectines peuvent conduire à des effets néfastes pour la santé, comme : des symptômes cliniques dont les plus courants se produisent au niveau des voies respiratoires (asthme et rhinite) et sur la peau (urticaire ou angiodème), migraine, irritation de l'appareil intestinal... etc (MANDERSON *et al.*, 2005).

CHAPITRE III

Généralités sur les saponines

III.1. Définition

Les saponines (du latin *sapo* = savon) constituent un vaste groupe d'hétérosides appartenant aux triterpènes cycliques. Elles sont caractérisées par leurs propriétés tensioactives, car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes (MALNE *et al.*, 1980 ; CHARROUF *et al.*, 1996). Elles sont principalement produites par les plantes, mais aussi par les organismes marins.

III.2. Constitution chimique

Les saponines sont composées de deux unités : l'aglycone (noyau lipophile) appelé sapogénine ou sapogénol à structure stéroïdique (C₂₇) ou triterpénique (C₃₀) et d'une ou plusieurs chaînes de sucres hydrophiles (glycone) variable selon le type de saponines. La chaîne glucidique est composée de pentoses, d'hexoses ou d'acides uroniques (BRUNETON, 1993).

III.3. Structure des saponines

Structuralement, les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de la génine (squelette aglycone) :

III.3.1. Saponines à génines triterpéniques

De loin les plus nombreux, existant pour l'essentiel chez les Angiospermes Dicotylédones et chez certains animaux marins (QIN, 1998).

Leurs aglycones possèdent généralement une structure de base pentacyclique, plus rarement tetracyclique. Les aglycones (sapogénines) du type triterpènes sont l' α -amyrine, β -amyrine, l'acide ursolique, et l'acide oléanolique, lupéol, etc...(CHANDEL et RASTOGI, 1980).

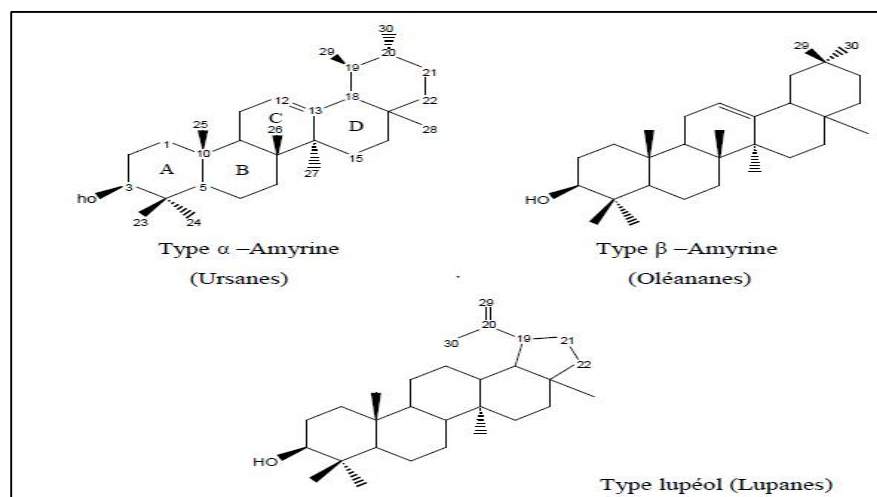


Figure 6: Structure des principaux squelettes des génines triterpéniques (BRUNETON, 1999)

III.3.2. Saponines à génines stéroïdiques

Presque exclusivement présentes chez les Angiospermes Monocotylédones. Les aglycones du type stéroïdiques sont principalement les stéranses (SAHU, 2008).

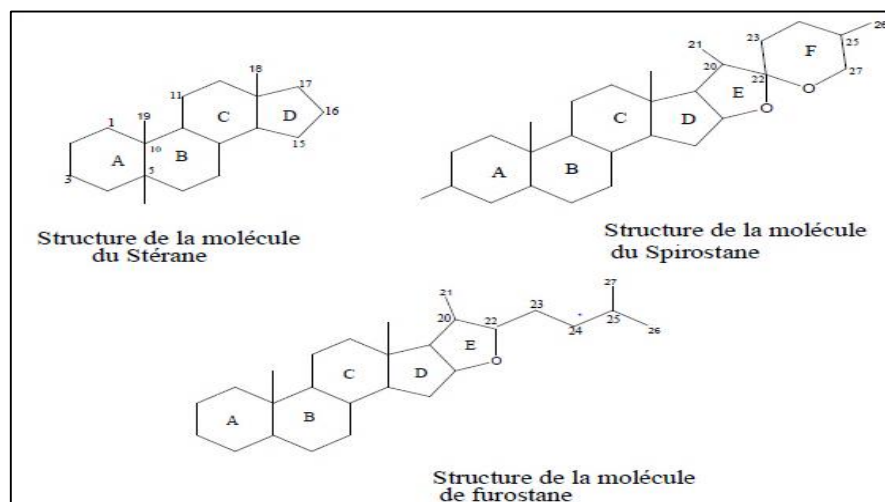


Figure 7: Structure des principaux squelettes des génines stéroïdiques (BRUNETON, 1999)

HOSTETTMANN et MARSTON (1995), distinguent une troisième catégorie de saponines, celle des hétérosides d'amines stéroïdiques (solasolènes et solanidanes) qui, pour d'autres auteurs, sont des alcaloïdes.

Tous les saponosides présentent en commun l'attachement d'une ou plusieurs chaînes osidiques à l'aglycone. Les saponines monodesmosidiques ont une seule chaîne glucidique et celles bidesmosidiques ont deux chaînes (VINCKEN *et al.*, 2007). Les principaux sucres et acides uroniques rencontrés dans les saponines sont présentés dans la figure suivante :

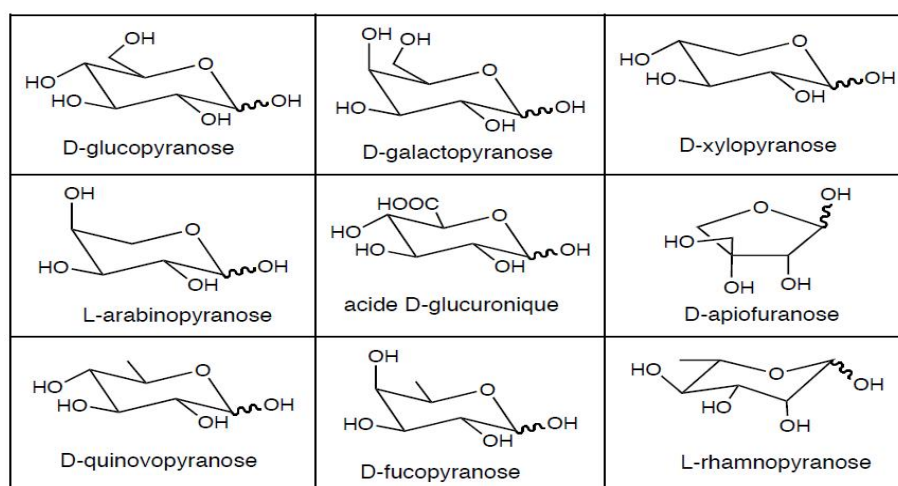


Figure 8 : Principaux saccharides rencontrés dans les saponines (BRUNETON, 1999)

III.4. Biosynthèse des saponines

La grande diversité structurale des saponines peut être expliquée par leurs origines biosynthétiques variées. En effet, à partir d'un composé hydrocarboné insaturé appelé squalène (C₃₀ H₅₀), la biosynthèse des génines triterpéniques et stéroïdiques est effectuée selon diverses voies métaboliques suivies de l'assemblage des différentes sections osidiques par des enzymes telles que les glycosyltransférases et les glycosidases (BRUNETON, 1993).

Par la suite, des modifications subséquentes peuvent avoir lieu sur la saponine dont, entre autres, des oxydations, réarrangements, méthylations et estérifications (VINCKEN *et al.*, 2007) ce qui augmente d'autant plus la possibilité de variations structurales à l'intérieur de cette classe de produits naturels.

III.5. Caractéristiques physico-chimiques

Les saponines sont caractérisées par un poids moléculaire élevé. Elles se présentent comme des poudres blanches non cristallisées, ayant un goût et une odeur désagréable lorsqu'elles sont chauffées. Elles sont solubles dans les solvants polaires, et insolubles dans les solvants apolaires ou peu polaires (BRUNETON, 1993).

III.6. Méthodes d'études des saponines

III.6.1. Extraction

Les saponines ne peuvent être isolées d'une matrice végétale en une seule étape sauf pour de rares exceptions. Étant donné qu'elles se retrouvent sous la forme de mélanges complexes. Chaque protocole d'extraction des saponines est à adapter en fonction de la plante à étudier et de sa composition en saponines (stéroïdes ou triterpènes) (BRUNETON, 1993).

En règle générale, l'extraction commence par la délimitation des saponines par les solvants apolaires. Une extraction ultérieure au méthanol ou éthanol à différentes concentrations dans l'eau permet d'obtenir les saponines ainsi que d'autres substances polaires (MARSTON *et al.*, 2000).

III.6.2. Séparation

Le travail de purification de saponines commence naturellement par l'obtention d'un mélange de saponines brutes. La séparation d'un mélange de saponines en différents composants est une tâche difficile qui nécessite l'application combinée de plusieurs techniques chromatographiques (DAVREUX et DELAUDE, 1971).

Une succession de séparations sur différents supports, tel que telle la chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC)...etc. La purification qui est ensuite réalisée peut impliquer la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) qui est devenue la technique la plus puissante et la plus couramment employée (DELAY *et al.*, 1997)

III.6.3. Caractérisation et dosage

La première indication de la présence de saponines dans les extraits végétaux et/ou fractions brutes de saponines peut être obtenue par la présence ou non de mousse persistante (BRUNETON, 1999).

La deuxième indication de la présence de saponines peut être obtenue à l'aide de la pulvérisation de réactifs. Les saponines de type stéroïdique donnent des taches jaunes sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) avec l'anisaldéhyde, vertes avec le réactif de Komarowsky qui fait apparaître en violet les taches liées aux saponines de type triterpénique (MARSTON *et al.*, 2000).

L'activité hémolytique des saponines est un moyen de leur mise en évidence et leur dosage. Ce dernier peut être calorimétrique ou spectrophotométrique après séparation des constituants par CCM et élution des taches ou faire appel à l'HPLC (BRUNETON, 1999).

III.6.4. Détermination structurale

La détermination structurale des saponines se déroule généralement en deux étapes : premièrement une analyse chimique préliminaire par l'intermédiaire d'hydrolyses acides et alcalines fortes et/ou douces, permettant d'obtenir des informations sur la nature de l'aglycone et des sucres. Puis des méthodes spectroscopiques permettent d'attribuer la structure complète du composé (MASSIOT et LAVAUD, 1995).

III.7. Propriétés

Les saponines retiennent l'attention aussi bien pour leur exploitation industrielle que pour leurs propriétés pharmacologiques.

L'industrie des cosmétiques exploite notamment leurs propriétés détergentes (SPARG *et al.*, 2004). Elles sont employées notamment dans fabrication des shampoings.

Elles ont aussi été recherchées par l'industrie pharmaceutique parce qu'elles forment le point de départ de l'hémisynthèse des médicaments stéroïdiens (ESTRADA *et al.*, 2000).

Des travaux des scientifiques sur les saponines, il ressort que cette classe de molécules possède des propriétés biologiques et pharmacologiques diverses. On peut citer entre autres ;

Des activités anti-inflammatoire, antifongique (BARILE *et al.*, 2007), antimicrobienne, antiparasitaire, antivirale (HOSTETTMANN et MARSTON, 1995) cytotoxique, antitumorale (WANG, 2007) immunostimulante et immunomodulatrice (LACAILLE- DUBOIS, 2005).

Les saponines sont connues par leur propriété de baisser la tension superficielle. Elles facilitent la pénétration des autres substances au niveau de la peau, de l'intestin et de toutes les muqueuses (LACAILLE- DUBOIS et WAGNER, 1996 et 2000).

La plupart des saponines possèdent des propriétés hémolytiques et sont toxiques à l'égard des animaux à sang froid, principalement les poissons (ODA *et al.*, 2000). Ces propriétés ne sont pas communes à toutes les saponines. Ces dernières assurent également la défense du végétal contre les attaques microbiennes et fongiques (MAJESTER *et al.*, 1991).

PARTIE

Expérimentale

CHAPITRE IV

Matériel et méthodes

IV.1. Cadre de l'étude

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein des laboratoires communs (I et II) d'analyses physico-chimiques, ainsi que le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou (UMMTO), ainsi que les laboratoires de Chimie Pharmaceutique et de Rhéologie de l'Université de Boumerdes.

Deux objectifs seront visés par la présente étude à savoir :

1-Extraction des saponines à partir des feuilles de noyer et leur application dans une pommade.

2-Extraction des pectines à partir d'écorces de melon et leurs caractérisations.

IV.2. Matériel biologique

Deux espèces ont été utilisées dans cette étude à savoir : le noyer (*Juglans régia L.*) et le fruit de melon (*Cucumis melo*).

La récolte des feuilles de noyer a été réalisée dans une exploitation agricole privée de la région de Tizi-Ouzou durant la période allant du mois d'avril jusqu'au mois de mai 2015.

Les feuilles fraîchement récoltées au hasard sont lavées, séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité pendant deux semaines, puis conservées dans des récipients hermétiquement fermés, à la température ambiante et à l'abri de lumière jusqu'à leur extraction.

Les écorces de melon ont été prélevées à partir des fruits achetés du marché local de la région de Tizi-Ouzou.



Figure 9: aspect général des feuilles de noyer et les écorces de melon coupées.

a) : feuilles de noyer fraîches; b) : feuilles sèches de noyer; c) : écorces de melon coupées non traitées et d) : écorces de melon coupées et blanchies.

***Les souches utilisées**

Pour l'étude microbiologique, nos tests se sont effectués sur deux bactéries pathogènes de référence et une moisissure. Le choix des souches est fait selon la disponibilité de ces dernières.

Ces souches sont représentées dans le tableau II, et elles nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'Université de Tizi-Ouzou.

Tableau II: Les souches utilisées dans notre étude microbiologique

| Souches | Type | Codes |
|------------------------------|-----------------------|------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Bactérie Gram Positif | ATCC 25923 |
| <i>Escherichia coli</i> | Bactérie Gram Négatif | ATCC 25322 |
| <i>Aspergillus niger</i> | moisissure | / |

IV.3. Appareillages et réactifs

L'ensemble des appareillages, solvants, réactifs chimiques et milieux de culture est cité dans l'annexe 1.

IV.4. Méthodes

Les matières premières fraîches (les feuilles de noyer et les écorces de melon) ont subi les mêmes analyses physico-chimiques (humidité, cendres, pH, acidité titrable) en suivant les mêmes protocoles expérimentaux ainsi que d'autres protocoles ont été adoptés selon les cas étudiés.

➤ **Cas de noyer**

- Analyse phytochimique ;
- extraction et dosage des polyphénols des feuilles fraîches et poudre des feuilles de noyer ;
- extraction des saponines à partir la poudre des feuilles de noyer ;
- application des saponines obtenues dans une pommade cosmétique ;
- contrôles physico-chimiques et microbiologiques des pommades élaborées (pH, viscosité, test sensoriel, test microbiologique)

➤ **Cas de melon**

- Extraction des pectines à partir des écorces;
- analyse des pectines extraites ;
 - * détermination de l'humidité et la teneur en cendres ;
 - * détermination de la microstructure au microscope électronique à balayage (MEB) ;
- analyse des groupements fonctionnels au moyen de la spectrométrie infrarouge (IR).

IV.4.1. Analyses physico-chimiques des matières premières

IV.4.1.1 Teneur en eau (AFNOR, 1986)

Principe

La teneur en eau a été déterminée sur 1 g d'échantillon broyé, étalé dans une capsule en porcelaine puis séché dans une étuve réglée à température de $103\pm 2^\circ\text{C}$, jusqu'à obtention d'un poids constant.

Mode opératoire

1. Sécher des capsules vides à l'étuve durant 15 min à $103\pm 2^\circ\text{C}$;
2. Refroidir les capsules dans un dessiccateur ;
3. Tarer les capsules ;
4. Peser dans chaque capsule 1g d'échantillon, les placer dans l'étuve réglée à $103\pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 heures ;
5. Retirer les capsules de l'étuve, les placées dans le dessiccateur, après refroidissement les peser. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

Expression des résultats

La teneur en eau a été déterminée selon la formule suivante :

$$H (\%) = \frac{M1-M2}{M} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

Soit

H : Humidité (%);

M1 : Masse de la capsule +la matière fraiche avant séchage en g ;

M2 : Masse de l'ensemble après séchage en g ;

M : Masse de la prise d'essai en g.

IV.4.1.2. Teneur en cendres (NF V 05-113, 1972)

Principe

L'échantillon est calciné à 550°C dans un four à moufle jusqu'à l'obtention de cendres blanchâtres de poids constant.

Mode opératoire

1. Dans des capsules en porcelaine, peser 4 g d'échantillon ;
2. Placer les capsules dans un four à moufle réglé à $550 \pm 15^\circ\text{C}$ pendant 5 heures jusqu'à obtention d'une couleur grise claire ou blanchâtre ;
3. Retirer les capsules du four et les mettre à refroidir dans le dessiccateur, puis les peser.

Expression des résultats

La matière organique a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{MO (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{P} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

Soit

MO : Matière organique (g) ;

M₁ : Masse des capsules + prise d'essai (g) ;

M₂ : Masse des capsules + cendres (g) ;

P : Masse de la prise d'essai (g) ;

La teneur en cendres (Cd) a été déterminée comme suit :

$$\text{Cd} = 100 - \text{MO\%} \quad \dots\dots\dots (3)$$

IV.4.1.3. pH (NF V 05-108, 1970)

Il définit l'acidité de produit considéré, mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

Mode opératoire

1. 10 ml d'eau distillée chaude sont ajoutés à 2 g d'échantillon ;
2. Broyer le mélange et laisser refroidir ;
3. Étalonner le pH-mètre, en utilisant des solutions tampons ;
4. Prélever comme prise d'essai un volume V de l'échantillon suffisamment important pour permettre l'immersion de l'électrode, noter ensuite la valeur du pH affichée sur le pH-mètre. Il faut rincer l'électrode avec l'eau distillée avant et après chaque mesure.

IV.4.1.4 Acidité titrable (NF V 05-101, 1974)

L'acidité titrable est la somme des acides minéraux et organiques libres.

Principe

Il consiste en un tirage avec une solution de NaOH en présence de phénophtaléine comme indicateur coloré.

Mode opératoire

1. Peser 25 g de l'échantillon broyé.
2. Placer l'échantillon dans une fiole conique avec 50 ml d'eau distillée chaude récemment bouillie et refroidie, puis mélanger jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène ;
3. Chauffer le contenu au bain-marie pendant 30min ;
4. Refroidir, transvaser quantitativement le contenu de la fiole conique dans une fiole jaugée de 250 ml et compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée récemment bouillie et refroidie, bien mélanger puis filtrer ;
5. Prendre un volume V₀=25 ml auquel on ajoute 0,25 à 0,5 ml de phénophtaléine. Tout en agitant, verser à l'aide d'une burette la solution NaOH (0,1N) jusqu'à l'obtention d'une

coloration rose persistante pendant 30 secondes. Faire la lecture sur la burette graduée pour avoir le volume de NaOH ayant décoloré la solution.

Expression des résultats

L'acidité titrable est exprimée en gramme d'acide citrique pour 100g d'échantillon. Cette première a été déterminée selon la formule suivante :

$$A(\%) = \frac{250 \times V \times 100}{M \times V_0 \times 10} \times 0,07 \dots\dots\dots (4)$$

V_0 : est le volume, en millilitres de la prise d'essai ;

V_1 : est le volume en millilitres de la solution d'hydroxyde de sodium (0,1N) ;

0,07 : Facteur de conversion de l'acidité titrable en équivalent d'acide citrique.

IV.4.2. Analyse phytochimique des feuilles fraîches de noyer

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant la poudre des feuilles de noyer a été faite selon les méthodes standards du screening phytochimique (DOHOU *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2010). Ces tests préliminaires sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité ou la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée.

IV.4.2.1. Préparation de l'infusé

20 g de poudre sont mis à infuser dans 100 ml d'eau distillée. Porté à l'ébullition pendant 15 min; après filtration, le filtrat est ajusté à 100 ml d'eau distillée. L'infusé ainsi obtenu a été utilisé pour la recherche des différents composés chimiques.

IV.4.2.2. Les anthocyanes

Introduire dans un Erlenmeyer 5 ml de l'infusé, ajouter quelques gouttes d'HCl. Une réaction positive donne une coloration rouge en présence des anthocyanes.

IV.4.2.3. Les leuco-anthocyanes

A 2 g de poudre, on ajoute 20 ml (propanol / acide chlorhydrique) (V/V). On porte le mélange au bain-marie bouillant pendant quelques minutes.

Les leuco-anthocyanes sont détectées grâce à une coloration rouge de la solution.

IV.4.2.4. Les tanins

Quelques gouttes de la solution de $FeCl_3$ (5 %) sont ajoutées à 5ml de l'infusé. La présence des tanins est identifiée par une coloration bleue noire de la solution.

IV.4.2.5. Les tanins galliques

On sature le filtrat par l'acétate de sodium (CH_3COONa), puis on lui ajoute quelques gouttes de FeCl_3 . La réaction est dite positive lorsque la coloration bleue foncée apparaît.

IV.4.2.6. Les flavonoïdes

A 5 ml de l'infusé, on ajoute 5ml d'HCl, un copeau de Mg et 1 ml d'alcool iso-butanol. La réaction est positive lorsque la coloration est rouge orangé.

IV.4.2.7. Les quinones libres

On ajoute 2ml d'HCl (1N) à 2 g de poudre végétale, plus 20 ml de chloroforme, puis on laisse le mélange pendant 3h. Après on filtre le mélange. On ajoute au filtrat 5 ml d'ammoniaque (1/2). La réaction est positive lorsque la coloration rouge violette apparaît.

IV.4.2.8. Les quinones combinées

A 2 g de poudre végétale, on ajoute 5 ml d' H_2SO_4 (2N). On porte le mélange à reflux pendant 2 h, puis on filtre. Ajouter au filtrat obtenu 20 ml de chloroforme. Puis évaporer à sec. Reprise par l'ammoniaque. La réaction est dite positive lorsqu'une coloration rouge se manifeste.

IV.4.2.9. Les saponosides

Dans deux tubes à essai fermés, on met dans l'un 5 ml d'HCl à 0,1 N, dans l'autre 5 ml de NaOH 0,1 N. On introduit dans chacun 2 à 3 gouttes d'infusées. Ensuite bien agiter verticalement pendant 30 s et laissé reposer 15 min.

Une réaction positive est déterminée par la présence ou non d'une mousse persistante. Deux cas sont possibles :

1^{er} cas : en présence des saponines stéroïdiennes, on obtient dans les deux tubes le même volume de la mousse ;

2^{em} cas : si la plante contient des saponines triterpéniques, en milieu basique il y'aura formation d'une mousse quelque fois plus grande par stabilité et par volume.

IV.4.2.10. Les alcaloïdes

On ajoute 20 ml d'ammoniaque (1/2) à 5 g de poudre végétale, plus 50 ml d'un mélange éther-chloroforme (3/1). Le filtrat est épuisé par HCl (2N). L'identification des alcaloïdes a été réalisée grâce au réactif de Dragendorff qui donne un précipité rouge.

IV.4.2.11. Les sennosides

On introduit 2,5 g de poudre dans une fiole conique plus 50 ml d'eau distillée plus 2 ml d'HCl concentré. Chauffage au bain-marie pendant 15 min. refroidir. Ajouter 40 ml d'éther. Séparation de la phase organique étherée de la phase aqueuse. On sèche la phase étherée sur sulfate de sodium anhydre ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \text{H}_2\text{O}$). Ensuite on évapore. Lorsque le résidu est refroidi, on lui ajoute 5 ml d'ammoniaque (1/2).

La présence des sennosides est identifiée par une coloration jaune ou orange de la solution. Le chauffage de cette solution au bain- marie pendant 2 min donne une coloration violette rouge.

IV.4.2.12. Les glucosides

On ajoute quelques gouttes d'H₂SO₄ à 2 g de poudre végétale. Une coloration rouge brique ensuite violette se manifeste en présence des glucosides.

IV.4.2.13. Les coumarines

- ***Préparation de l'extrait***

2 g de poudre plus 20 ml de la solution (alcool éthylique - eau distillée). Bouillir pendant 15 min à reflux. On filtre, puis refroidir.

- ***Identification***

On ajoute 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH (10%) à 3 ou 5 ml de filtrat, et quelques gouttes d'HCl à 10 % jusqu'à l'obtention d'un milieu faiblement acide.

L'apparition d'un trouble indique la présence des coumarines.

IV.4.3. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (PPT)

IV.4.3.1. Extraction des polyphénols

Principe

Il s'agit d'une extraction solide-liquide. Le principe consiste à ce que le solvant doit franchir la barrière de l'interface solide-liquide, dissoudre le principe actif à l'intérieur du solide et l'entraîner à l'extérieur.

La plupart des auteurs suggèrent que l'entrée du solvant se fait par un mécanisme osmotique et la sortie du soluté par dialyse ou par diffusion. Les solvants utilisés dans la présente étude sont (l'eau distillée et l'éthanol pur 96%).

Ces derniers possèdent l'avantage d'être plus facilement éliminés sous vide. Ils donnent en plus un meilleur rendement d'extraction (OWEN et JOHNS, 1999 ; DIALLO *et al.*, 2004).

Le procédé d'extraction adopté est illustré dans la figure ci-dessous.

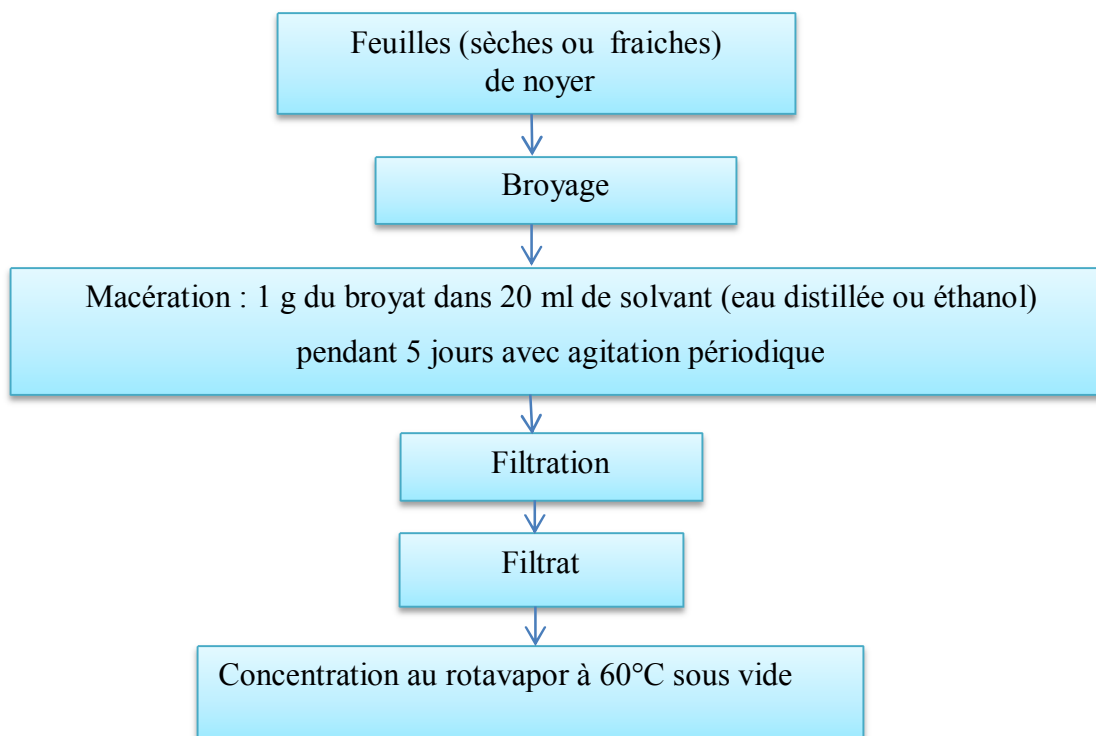


Figure 10 : Protocole d'extraction des PPT (modifié)

IV.4.3.2. Dosage des polyphénols totaux

Principe

Les polyphénols ont été déterminés par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (SINGLETON *et al.*, 1999): ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$).

Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (BOIZOT et CHARPENTIER, 2006).

Mode opératoire

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode décrite par JUNTACHOTE *et al.*, (2006). Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits de feuilles de noyer est représenté par l'organigramme suivant :

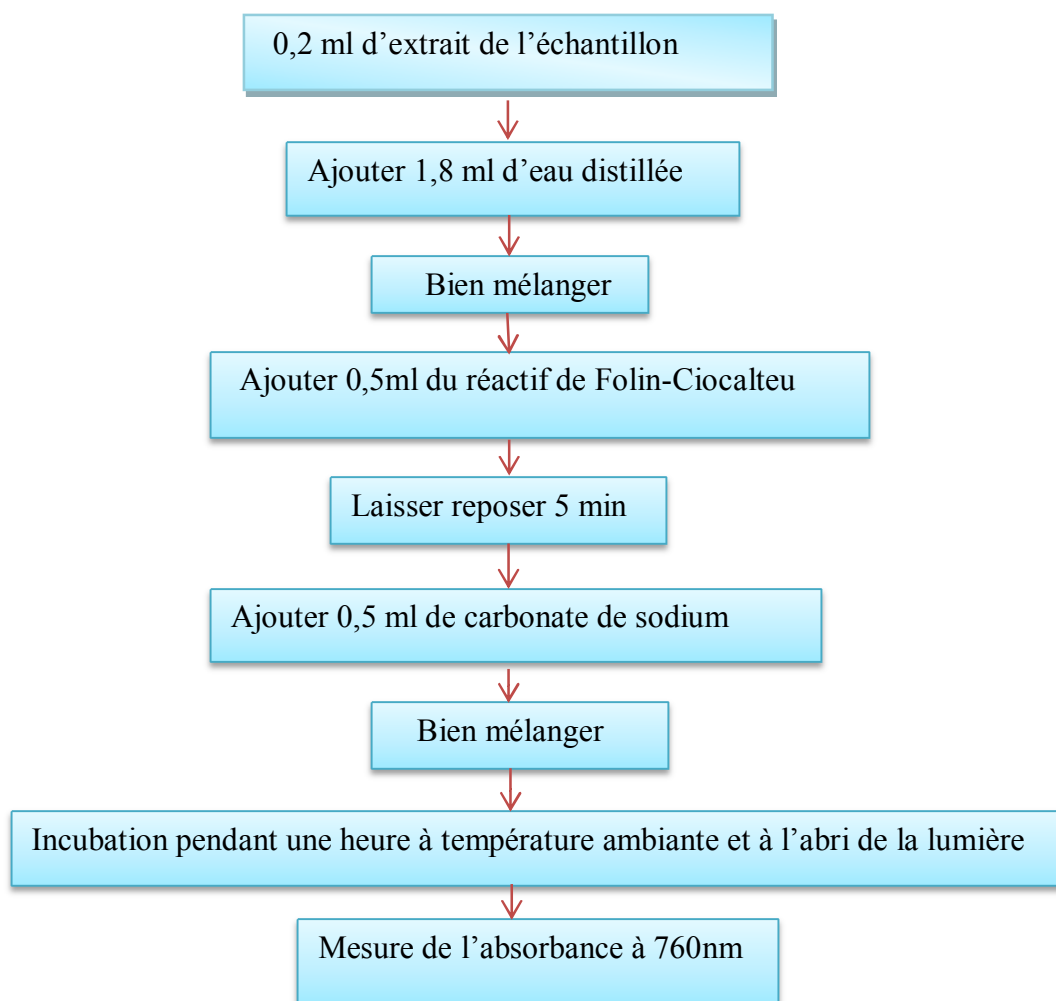


Figure 11: Diagramme de dosage des PPT (modifié)

Courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant l'acide gallique comme standard (annexe 2).

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec de la plante (mg EAG/g).

IV.4.5. Extraction des saponines

Le matériel végétal est tout d'abord réduit en poudre par une série de broyages à l'aide d'un mixeur électrique le jour même de l'extraction. Afin d'augmenter le rendement d'extraction. La méthode d'extraction employée est la macération à froid dans les solvants organiques. Les saponines sont extraites simultanément avec deux solvants qui sont dans l'ordre croissant de polarité l'éther de pétrole et l'éthanol (75%).

L'extraction des saponines à partir des feuilles de noyer est illustrée par la figure suivante :

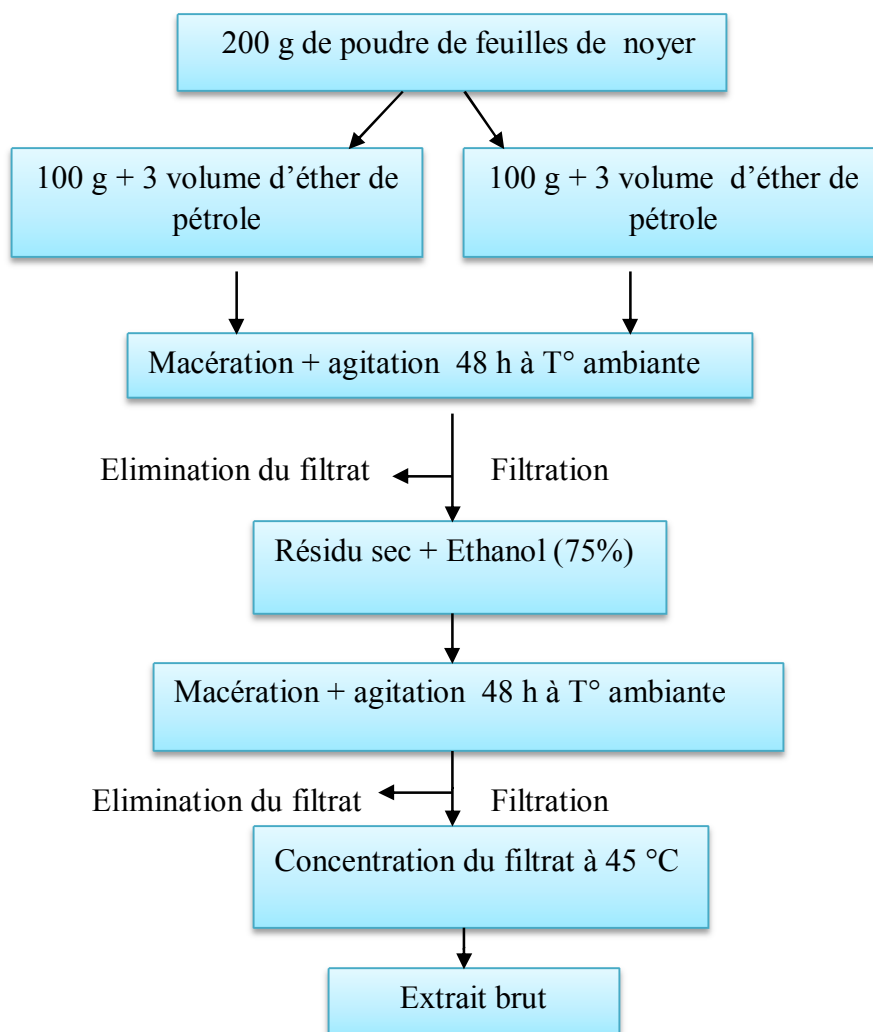


Figure 12 : Protocole d'extraction des saponines par des solvants de polarité croissante (modifié)

IV.4.5.1. Calcul de rendement

Après l'étape d'évaporation à sec, le résidu obtenu a été pesé. Le rendement, exprimé en pourcentage par rapport au poids du matériel de départ, a été déterminé par la relation suivante :

$$R(\%) = \frac{M}{M_0} \times 100 \dots \dots \dots (5)$$

R : rendement en (%)

M: masse de l'extrait brut sec (en g)

M0: masse initiale de la poudre du végétale (en g)

IV.4.5.2. Application des saponines dans une pommade

Les saponines extraites des feuilles de noyer ont été appliquées dans la fabrication d'une pommade cosmétique. Les excipients constituant cette pommade sont : Vaseline, lanoline, l'huile d'amande et l'extrait des saponines utilisé comme un principe actif.

IV.4.5.2.1. Contrôle de la qualité des excipients

Avant de préparer les différentes formulations, le contrôle de la pureté et la qualité des différents excipients sont indispensables.

Ces contrôles ont été appliqués selon la British pharmacopée (Vol I, II, III, IV 2009) (Annexe 3).

IV.4.5.2.2. Elaboration des pommades

Dans cette partie nous avons formulé quelques pommades en utilisant les saponines des feuilles de noyer comme un agent émulsifiant.

Nous avons opté pour l'utilisation de la vaseline en grande proportion comme excipient de cette pommade qui a comme rôle la fixation des principes actifs. On a aussi utilisé lanoline qui a une importance, elle aide à l'absorption des principes actifs en les véhiculant jusqu'au sang (circulation sanguine).

L'huile d'amande est connue par ses propriétés antioxydantes, elle favorise aussi l'hydratation de la peau.

Cinq formulations ont été préparées (Tableau III) tout en variant les quantités de saponines et l'huile d'amande. Dans un mortier, faire liquéfier les quantités de vaseline et de lanoline dans l'étuve à 45 °C. Puis laisser refroidir.

On ajoute au mélange préparé les quantités d'huile d'amande et de saponines. A l'aide du pilon on triture le tout, on arrive à avoir un mélange homogène. Mettre les pommades dans des récipients hermétiques et les conserver dans un endroit frais.

Tableau III : Composition des formulations élaborées.

| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 |
|--|------|------|------|------|------|
| Vaseline (g) | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Lanoline (g) | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 | 1,25 |
| Saponines issues des feuilles de noyer (ml) | 0,5 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,9 |
| Huile d'amande (ml) | 0,2 | 0,4 | 0,6 | 0,8 | 1 |

IV.4.5.2.3. Analyses physico-chimiques des pommades élaborées

Les formulations de pommades préparées subissent quelques analyses physico-chimiques afin de déterminer les meilleures formulations.

**Mesure du pH*

Déterminer le pH d'une solution de la pommade diluée au 10^{ème} (1g de pommade dans 10 ml d'eau distillée chaude).

**Mesure de la viscosité* (Pharmacopée Européenne, 2000)

La méthode utilisée dans notre étude est basée sur la mesure des forces de cisaillement et permet de mesurer la viscosité dynamique exprimée en Pascal. Seconde.

L'appareil utilisé est un viscosimètre de marque (VT 550). Cette analyse a été réalisée au niveau du laboratoire de rhéologie de l'Université de Boumerdes.

IV.4.5.2.4. Analyse sensorielle des pommades élaborées

C'est une méthode caractérisant les propriétés organoleptiques d'un produit. Ces propriétés ne sont pas toujours mesurables à l'aide des instruments. Son développement est apporté aux rôles des aspects, des odeurs et des saveurs dans le choix des produits et l'évaluation de leur qualité.

Principe

Le test que nous avons effectué est basé sur un certain nombre de remarques notées sur une fiche proposée aux jurys (Annexe 4). Il s'agit de présenter aux jurys la même pommade. Chaque échantillon des différentes formulations est présenté dans des petits flacons en verre numérotés; puis on demande à chaque sujet d'effectuer une appréciation organoleptique. Le choix de la formule était basé sur l'évaluation sensorielle (SAUVAGEOT, 1982).

Démarche de l'évaluation sensorielle

❖ *Conditions de réalisation*

La salle doit avoir un accès facile, éloignée du bruit, un éclairage suffisant et une température convenable.

❖ *Quantité offerte*

Servir au sujet une quantité suffisante qui leur permette d'appliquer le produit autant de fois qu'ils désirent avec la possibilité de se rincer les mains à chaque utilisation.

❖ *Jury*

L'évaluation repose sur un jury auquel on demande de se prononcer sur les caractéristiques organoleptiques suivantes : la couleur, l'odeur, la texture et l'homogénéité du produit.

Le jury était composé de 10 personnes. Les membres du jury ne doivent pas avoir appliqué un autre produit cosmétique.

IV.4.5.2.5. Test microbiologique

Pour évaluer l'activité antimicrobienne, nous avons adopté la méthode de diffusion sur un milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose selon la méthode décrite par BENJELALI *et al.*, (1986).

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

Préparation des extraits à tester

La détermination de l'activité microbienne n'est faite que pour deux formulations (F2 et F3) ayant montrées des caractéristiques organoleptiques meilleures.

0,5 g de chaque pommade (F2 et F3) a été prélevé et dissout dans 2 tubes stériles contenant chacun 5 ml de DMSO.

Protocole expérimental

Couler aseptiquement les milieux de culture gélosés préliquifiés (Mueller Hinton, OGA) dans des boîtes de Pétri. On laisse refroidir et solidifier sur la pailleasse.

Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne. Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées.

Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. Recharger l'écouvillon à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

A l'aide d'une pince stérile, prélever un disque wattman stérile et l'imbiber avec (10µl) d'extraits F2 et F3 à tester en mettant seulement en contact le bout du disque puis déposer sur la gélose.

Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à T° ambiante et mises à l'étuve à 37°C pendant 24 h (pour les bactéries) et à 27°C pendant 5 jours pour la moisissure.

Les disques de référence sont trempés dans du DMSO. L'expérience est répétée trois fois pour chaque microorganisme.

Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisée par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait (PONCE *et al.*, 2003).

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

IV.4.6. Extraction des pectines

IV.4.6.1 Prétraitement des écorces

3,5 kg d'écorces fraîches de melon ont subis les opérations suivantes:

****Blanchiment***

Cette opération sert à l'inactivation des enzymes présents dans les écorces, et dont le but est d'assurer la stabilité des matières premières durant le transport et le stockage jusqu'à l'utilisation (LOPES DA SILVA et ROA, 2006).

L'opération consiste à faire passer l'échantillon dans l'eau chaude à 90°C pendant 10 à 15 min (CHEFTEL et CHEFTEL, 1978).

****Lavage***

Après le blanchiment, les échantillons sont immédiatement été refroidis par des lavages successifs avec de l'eau jusqu'à obtention d'un Brix proche de zéro, mesuré au moyen d'un réfractomètre portatif, après chaque lavage.

Rappelons que ces lavages permettent d'éviter la dégradation des pectines qui peuvent avoir lieu à des températures supérieures ou égal à 60 °C, et d'éliminer les sucres, les principes amers, les matières colorantes et les composés solubles dans l'eau.

****Séchage***

Après le lavage, les matières premières ont été pressées manuellement au travers d'un tissu en mousseline pour faciliter le séchage. On a ainsi obtenu à partir de 3,5 kg d'écorces fraîches du melon 116 g d'écorces sèches. Cette matière première séchée a été emballée dans des sachets en plastiques propres.

IV.4.6.2 Extraction des pectines

L'extraction des pectines a été faite en milieu acide à chaud, selon le protocole inspiré de KRATCHANOVA *et al.*, (2004).

***Solubilisation**

Les paramètres de solubilisation retenus sont ceux préconisés par KRATCHANOVA *et al.*, (2004).

- Rapport : échantillon sec/eau = 1 kg/50 l d'eau
- Température variable entre : 80 – 82 °C
- Temps : 01 heure
- pH = 1.5

A 250 grammes de l'échantillon on ajoute 12,5 litres d'eau distillée, le pH est ramené à 1,5 par de l'acide chlorhydrique 0,5 N. Le mélange est chauffé pendant 01 heure à 80 – 82 °C sous agitation continue au moyen d'un agitateur électrique.

***Filtration**

A la fin de la solubilisation, le jus pectique est immédiatement filtré et refroidi pour éviter l'éventuelle augmentation de la viscosité et la dégradation de la pectine.

La filtration se fait à travers un tissu de mousseline; le dispositif de filtration baigne dans de la glace afin de permettre l'abaissement de la température.

Après la première filtration, les échantillons sont pressés manuellement et repris dans une quantité d'eau équivalente au 1/5 de celle ayant servie à la solubilisation, puis sont soumis à une seconde filtration, le jus pectique obtenu est conservé à 4°C pendant 24 heures.

***Purification de l'extrait**

Après les séjours de 24 heures au réfrigérateur, le jus pectique est filtré pour permettre l'élimination des particules en suspension, encore présentes, malgré les séries de filtrations précédentes et assurer une meilleure clarification.

***Précipitation**

Les deux agents de précipitation retenus dans notre étude sont le chlorure d'aluminium et le sulfate d'aluminium.

***Précipitation par le sulfate d'aluminium**

Les conditions de précipitation des pectines par le sulfate d'aluminium sont données par ZHONGDANG *et al.*, (2005).

À un litre de jus pectique, on ajoute 50 ml de sulfate d'aluminium goutte à goutte, suivi d'un ajustement du pH à la valeur de 4 par NH₄OH (5N), sous une agitation continue pendant 15 min.

On laisse le mélange se stabiliser pendant 30 min à la température ambiante puis 01 heure à 4°C, ce qui permet la formation du gel pectine- hydroxyde d'aluminium, le gel obtenu est récupéré par filtration.

****Précipitation par le chlorure d'aluminium***

Les conditions de précipitation des pectines par le chlorure d'aluminium sont données par DENNAPA *et al.*, (2006). À 1 litre de jus pectique, on ajoute 60 ml de chlorure d'aluminium.

Les pectines sont précipitées après l'ajustement du pH dans un intervalle de 3,5 à 4 par l'addition d'ammoniac sous agitation continue.

Le trouble est laissé se stabiliser pendant 30 min au réfrigérateur, puis le gel pectine-hydroxyde d'aluminium est récupéré par filtration.

****Purification des pectines***

Les gels pectine-hydroxyde d'aluminium obtenus subissent plusieurs lavages ayant pour but d'éliminer les impuretés précipitées avec les pectines et l'excès d'aluminium.

Une succession de lavage a été appliquée sur les pectines obtenues en respectant les mêmes étapes décrites par KRATCHANOVA *et al.*, (2004). En effet, les pectines subissent plusieurs lavages :

- Le premier lavage à l'éthanol 96 % ;
- Le deuxième lavage à l'alcool acidulé (éthanol 70 % à 0,5 % HCL) ;
- Le troisième lavage à l'alcool 70 % au pH neutre ;
- Le quatrième lavage à l'acétone permet d'éliminer les traces d'acide (HCL) et d'alcool absorbées par les pectines et d'émietter celles-ci et de faciliter leur séchage (MC CREADY, 1970; CONSTENLA et LAZANO, 2003).

****Séchage et stockage des pectines***

Les pectines obtenues (figure 12) sont séchées dans l'étuve à la température de 60°C pendant deux heures. Après séchage, les pectines mises préalablement à refroidir dans un dessiccateur sont alors broyées au moyen d'un moulin à café électrique et conditionnées dans des flacons en verre hermétiquement fermés.



Figure 13 : Pectines fraîches précipitées.

a) *Précipitation par sulfate d'aluminium* ; b) *Précipitation par chlorure d'aluminium.*

IV.4.6.3. Calcul de rendement

Après l'extraction, les pectines humides sont séchées à 60°C jusqu'à ce que leur poids devienne constant, refroidies au dessiccateur, puis pesées au moyen d'une balance de précision de type (KERN 770). Le rendement est exprimé en poids de pectines sèches extraites à partir de 100g de matière première sèche (melon), selon la méthode de FERTONANI *et al.*, (2006); PTICHKINA *et al.*, (2008), où il est donné par l'expression suivante :

$$R (\%) = \frac{P}{P'} \times 100 \dots \dots \dots (6)$$

Où:

R : rendement en (%)

P : Poids de pectine sèche(g) ;

P' : Poids de la matière première sèche (g).

IV.4.6.4. Détermination de la teneur en eau et en cendres des pectines

La teneur en eau et en cendres des pectines fraîches ont été déterminés suivant les mêmes protocoles expérimentaux appliqués pour les matières premières.

IV.4.6.5. Détermination de la microstructure des pectines au MEB

Principe

La microscopie électronique à balayage consiste à balayer la surface d'un échantillon par un faisceau focalisé d'électrons accélérés à des tensions de 5 à 30 kv. Ces électrons vont interagir avec la surface de l'échantillon.

Le signal émis en chaque point de la surface de l'objet est synchronisé avec celui d'un écran vidéo, permet la formation d'une image composite modulée par l'intensité du signal détecté (FONTANILLE et GNANOU, 1994).

La structure microscopique des différentes pectines précipitées par les deux types de sels (sulfate d'aluminium et chlorure d'aluminium) et celle utilisée en industrie agroalimentaire) a été analysée avec un microscope électronique à balayage de type (PHILIPS ESEM XL 30). Cette analyse a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie de l'UMMTO.

IV.4.6.6. Analyse des groupements fonctionnels des pectines par IR

Principe

La spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse physique rapide, simple à mettre en œuvre et ne nécessitant que peu de quantité de matière à analyser. Basée sur les transitions entre les états vibrationnels et rotationnels d'une molécule, elle est employée tout aussi facilement sur des échantillons bruts ou purifiés.

Certains groupements ou liaisons, considérés comme marqueurs peuvent révéler la présence de molécules associées (acides féruliques, lignines, protéines) ou de certaines catégories de polysaccharides et notamment les fonctions acides carboxyliques des acides galacturoniques, qui peuvent révéler la présence des pectines (KACURAKOVA *et al.*, 2000).

Les spectres infrarouges des trois pectines (celles commerciales et celles extraite par le sulfate et le chlorure d'aluminium) sont obtenus par un spectromètre (BRUCKER). Cette analyse a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie pharmaceutique à l'Université de Boumerdès.

CHAPITRE V

Résultats et discussions

V.1. Résultats des paramètres physico-chimiques des matières premières

Les résultats de quelques paramètres physico-chimiques des matières premières sont résumés dans le tableau ci-dessous. Ils sont présentés sous forme de la moyenne de trois essais \pm l'écart-type (ET).

Tableau IV : Résultats des paramètres physico-chimiques des écorces de melon fraîches.

| Paramètres | Teneurs moyennes \pm ET |
|----------------------------|---------------------------|
| | Ecorces de melon |
| pH | 5,713 \pm 0,526 |
| Humidité (%) | 91,08 \pm 0,278 |
| Taux de cendres (%) | 0,666 \pm 0,038 |
| Acidité (g/ 100g) | 1,260 \pm 0,955 |

A partir du tableau (IV), on constate que les écorces de melon sont très riches en eau. Elles présentent un pH acide et un taux très faible en cendres. Ces valeurs sont proches à celle de la pulpe (MESBAH et BOUHALOUFA, 2012).

Tableau V : Résultats des paramètres physico-chimiques des feuilles de noyer fraîches.

| Paramètres | Teneurs moyennes \pm ET |
|----------------------------|---------------------------|
| | Feuilles de noyer |
| pH | 5,5 \pm 0,346 |
| Humidité (%) | 66,82 \pm 0,244 |
| Taux de cendres (%) | 3,207 \pm 0,104 |
| Acidité (g/ 100g) | 0,293 \pm 0,036 |

D'après les résultats de tableau (V), on constate que les feuilles de noyer, elles sont riches en eau. Elles sont caractérisées par un pH acide (acidité titrable faible). Par contre, elles sont riches en cendres.

Ces résultats montrent que ces matières premières sont rapidement dégradables d'où la nécessité de prendre certaines précautions (blanchiment, réfrigération...etc.), avant utilisation pour une meilleure conservation.

V.2. Résultats d'analyse phytochimique des feuilles fraîches de noyer

L'analyse phytochimique des extraits de plantes est une étape préliminaire et d'une grande importance, puisqu'elle révèle la présence des constituants bioactives responsables des vertus thérapeutiques.

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant la poudre des feuilles de noyer a été faite selon les méthodes standards du screening phytochimique.

Ces tests préliminaires sont en relation avec l'intensité du précipité et de turbidité où la coloration est proportionnelle à la quantité de la substance recherchée.

Les résultats de cette analyse sont portés dans le tableau suivant et l'annexe (5) :

Tableau VI: Résultats des tests phytochimiques effectués sur la poudre des feuilles de noyer.

| Métabolites secondaires | Quantité |
|----------------------------------|----------|
| Alcaloïdes | +++ |
| Anthocyanes et leuco-anthocyanes | + |
| Coumarines | +++ |
| Flavonoïdes | +++ |
| Glucosides | +++ |
| Quinones libres et combinées | ++ |
| Saponines triterpéniques | +++ |
| Saponines stéroïdiques | + |
| Senosides | ++ |
| Tanins | +++ |

(+++): Abondance ; (++) : moyen ; (+) : faible ; (-) : absence

Les résultats de cette analyse montrent que toutes les substances organiques testées étaient présentes dans la poudre des feuilles de noyer, mais à des proportions différentes.

En effet, l'extrait aqueux de la poudre des feuilles de noyer est très riche en tanins, flavonoïdes, glucosides, coumarines, alcaloïdes et en saponines. Les quinones, sont présentes mais en quantité moyenne.

Cependant les anthocyanes et leuco-anthocyanes ont une teneur faible. La richesse des feuilles du noyer en métabolites secondaires lui confère des propriétés pharmacologiques importantes d'où leur utilisation en médecine traditionnelle.

Des études faites par SHAH *et al.*, (2013) sur divers extraits (methanoliques, cétoniques, benzéniques et aqueux) de feuilles de noyer (*Juglans régia L.*) ont révélés la présence de nombreux métabolites secondaires.

La présence ou l'absence de ces derniers dépend en grande partie de la nature du solvant d'extraction. Les résultats trouvés sur les extraits aqueux sont conformes avec les notre et aussi avec la composition des feuilles de noyer.

La richesse des feuilles de noyer (*Juglans régia L.*) en divers métabolites secondaires, permettent d'avoir une bonne idée sur ses propriétés pharmacologiques à condition d'extraire ses principes actifs (PEREIRA *et al.*, 2008).

V.3. Résultats de dosage des polyphénols totaux des extraits (feuilles fraîches et poudre des feuilles) de noyer

La quantité des polyphénols totaux a été rapportée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec de l'extrait (mg EAG/g). Les valeurs sont données sous la forme de moyenne de 2 essais \pm ET.

Tableau VII : Résultats du dosage des PPT des extraits de (feuilles fraîches et poudre) de noyer

| | Extraits | Teneur en polyphénols (mg EAG/g) |
|----------------------------|----------|----------------------------------|
| Extraits organiques | EEFN | 510,63 \pm 23,988 |
| | EEPN | 584 \pm 20,180 |
| Extraits aqueux | EAFN | 127,92 \pm 14,571 |
| | EAPN | 189,05 \pm 9,027 |

EEFN : extrait ethanolic des feuilles fraîches de noyer

EEPN : extrait ethanolic de poudre des feuilles de noyer

EAFN : extrait aqueux de feuilles fraîches de noyer

EAPN : extrait aqueux de poudre des feuilles de noyer

A partir du tableau (VII) on constate que les teneurs élevées en PPT ont été obtenues dans les extraits organiques par rapport aux extraits aqueux. En effet, un taux plus élevé a été constaté dans le cas d'utilisation de la poudre des feuilles de noyer (584 \pm 20,180 mg EAG/g) en comparaison avec l'utilisation des feuilles fraîches (510,63 \pm 23,988mg EAG/g). Cependant, des faibles teneurs ont été enregistrées pour les deux extrais aqueux en utilisant les feuilles fraîches et la poudre des feuilles de noyer (127,92 \pm 14,571 et 189,05 \pm 9,027) respectivement.

Le noyer (*Juglans regia L.*) a fait l'objet de nombreuses études montrant sa richesse en composés phénoliques (VERARDO *et al.*, 2009). Dans les feuilles, les teneurs élevées en composés phénoliques sont trouvés durant les mois de mai et juillet (AMARAL *et al.*, 2008).

SHARAFATI-CHALESHTORI et RAFIEIN (2011) ont trouvé que la teneur en PPT d'extrait de feuilles *Juglans regia* à l'éthanol 80 % était de $(410 \pm 14.43 \text{ mg EAG/g})$.

D'autres études menées par QURECHI *et al.*, (2014), ont trouvé une teneur en composés phénoliques variant de (344,6 à 548,7 mg EAG/g) dans l'extrait méthanolique (50 %) de la poudre de feuilles *Juglans regia L.* et une teneur faible (94 mg EAG/g) dans l'extrait aqueux de la même poudre, ceci est en accord avec nos résultats.

Ces variations dans les teneurs en PPT sont dues à divers facteurs. Selon JAKOPIC *et al.*, (2009) l'efficacité de l'extraction des composés phénoliques dépend du type de solvant et les hautes récupérations des polyphénols qui sont obtenues par le méthanol, l'éthanol et leurs mélanges appropriés avec l'eau. De plus, cette variation en composés phénoliques dans les feuilles de *Juglans regia L.* dépend des saisons et l'origine géographique (COSMULESCU, 2011), des conditions climatiques et pratiques agricoles (AMARAL *et al.*, 2008), du choix de l'espèce et la période de récolte (JAKOPIC *et al.*, 2007).

Il est à signaler que, le réactif de Folin-Ciocalteu n'est pas spécifique aux polyphénols. Cependant, beaucoup de composés peuvent réagir avec ce réactif, donnant un taux phénoliques apparent élevé (TAWAHA *et al.*, 2007).

En outre, certaines substances, telles que la vitamine C, les caroténoïdes, les sucres réducteurs et les acides aminés phénoliques, peuvent en réduisant le complexe phosphotungstique-phosmolybdénique interférer et conduire à une surestimation de la teneur en composés phénoliques (OBIED *et al.*, 2005).

Ce dosage est basé sur une réaction d'oxydo-réduction peut être également considérée comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante (PRIOR *et al.*, 2005). De ce fait, les extraits les plus riches en composés phénoliques peuvent également être considérés comme les plus antioxydants.

V.4. Résultats de rendement d'extraction des saponines

Le rendement en saponines a été calculé en fonction de la matière végétale initiale mise à l'extraction et le résidu obtenu à chaque fois après concentration.

Le rendement d'extraction des saponines à partir de la poudre des feuilles de noyer est présenté le tableau suivant :

Tableau VIII : Rendement d'extraction des saponines à partir de la poudre des feuilles de noyer

| Extraits | Rendements (%) | | |
|----------|----------------|---------|--------------|
| | EHEFN 1 | EHEFN 2 | Moyenne ± ET |
| | 23,5 | 22,1 | 22,8 ± 0,989 |

EHEFN : Extrait hydro-ethanolique de poudre des feuilles de noyer

Le rendement en saponines obtenu dans notre étude, est nettement supérieur à ceux trouvés dans d'autres études faites sur l'extraction des saponines à partir de plantes diverses (AMZAL, 2009 ; KOUGAN KNOWP, 2010).

En effet, ces derniers rapportent que, les rendements en saponines pures (poudre) obtenus après purification et lyophilisation de l'extrait brut sont généralement faibles et varient de 2 à 4%.

Etant donné qu'on n'a pas purifié et lyophiliser nos extraits bruts de saponines, cette augmentation dans le rendement d'extraction pourrait être expliquée par les conditions d'extraction (la méthode d'extraction adoptée et la nature du solvant utilisé) ainsi que divers facteurs ; l'espèce végétale, la partie étudiée de la plante (HOSTETTMANN *et al.*, 1991).

V.5. Résultats de contrôle de la qualité des excipients

Les résultats obtenus du contrôle de la pureté et la qualité des différents excipients utilisés dans l'élaboration de nos pommades (vaseline, lanoline et huile d'amande) se sont révélés conformes. Ils sont cités dans l'annexe (3).

V.6. Résultats de contrôle des pommades élaborées

V.6.1. Résultats des analyses physico-chimiques des pommades

V.6.1.1. Résultats de pH

Les valeurs de pH des pommades sont enregistrées dans le tableau ci-dessous.

Tableau IX : Résultats de pH des formulations de pommades

| | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 |
|----|---------------|---------------|-------------|--------------|--------------|
| pH | 5,253 ± 0,056 | 6,986 ± 0,015 | 6,35 ± 0,02 | 5,143 ± 0,02 | 4,95 ± 1,149 |

On constate que les formulations F1, F4 et F5 sont acides. Quant aux formulations F2 et F3 sont plus ou moins neutres. Ceci est dû aux quantités différentes de saponines et d'huile d'amande ajoutées à chaque formulation.

V.6.1.2. Résultats de la viscosité

Les résultats de la viscosité des 5 formulations élaborées sont représentés dans les figures 14 et 15.

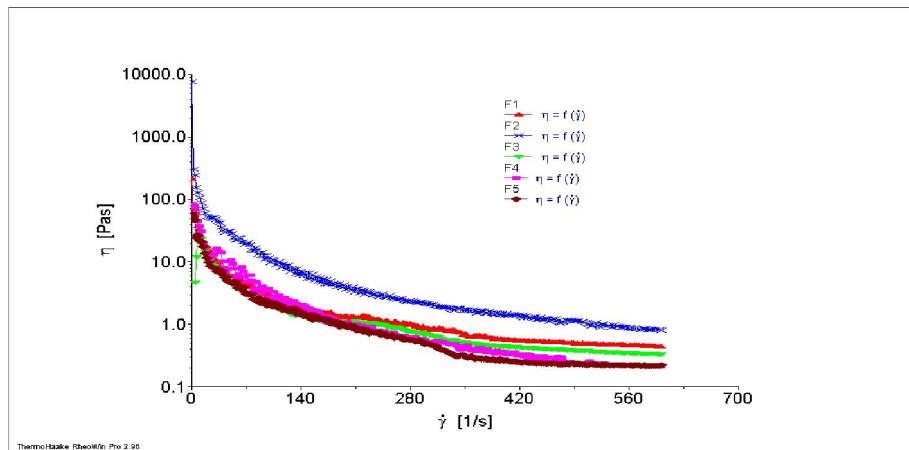


Figure 14 : Variation des viscosités (η) des pommades en fonction du taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$)

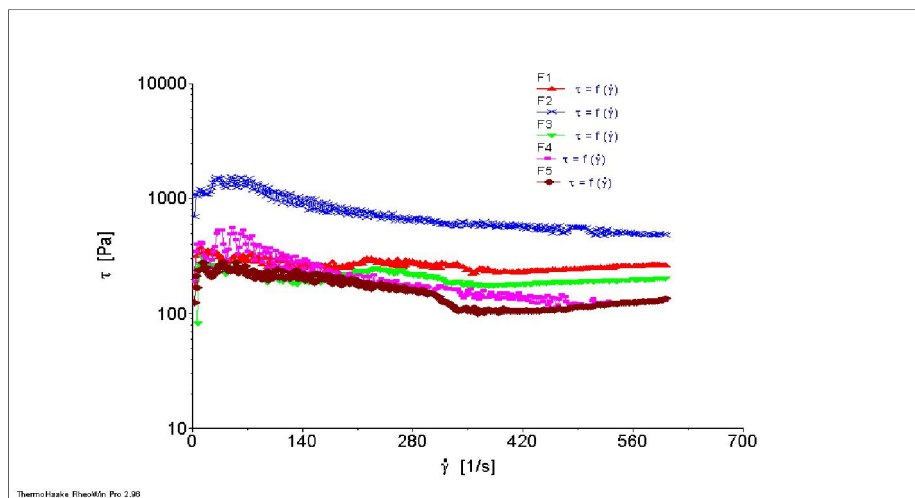


Figure 15 : Rhéogramme représentant la contrainte de cisaillement (τ) des pommades en fonction de leur taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$).

Ces graphes indiquent que, les pommades étudiées sont du type dit « rhéo-fluidifiant » car leur viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente (figure 14). Ce qui veut dire qu'elles possèdent les propriétés visqueuses d'un liquide et les propriétés élastiques d'un solide. C'est le cas des bonnes pommades qui sont fluides à l'étalement mais plus visqueuses au toucher, évitant ainsi les coulures.

Cependant, ces fluides sont dits à seuil, car il faut dépasser un seuil en contrainte (τ_0) avant qu'ils ne puissent s'écouler (figure 15). Par définition, un seuil d'écoulement décrit la contrainte requise pour produire l'écoulement d'une substance plastique (DRIDI, 2005).

Nous pouvons conclure que les pommades élaborées peuvent être considérées comme des fluides plastiques, ce qui signifie qu'elles s'écoulent à partir d'une certaine valeur de contrainte (τ). Les résultats obtenus sont conformes à certaines pommades cosmétiques et la nature des pommades est du type « fluide non Newtonien pseudo plastique ».

V.6.2. Résultats de l'analyse sensorielle

La figure ci-dessous montre l'aspect des différentes pommades élaborées.

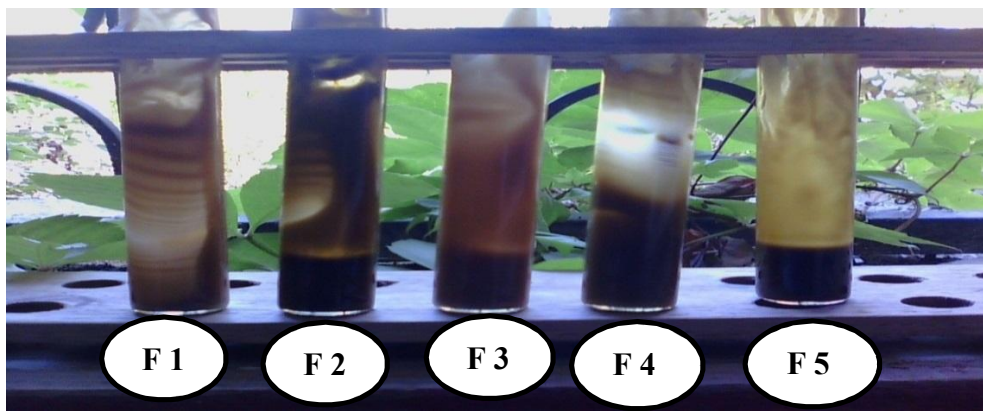


Figure 16 : aspects des pommades élaborées.

V.6.2.1. La couleur

Les résultats de l'analyse sensorielle concernant la qualité de la couleur des pommades élaborées sont mentionnés dans la figure suivante :

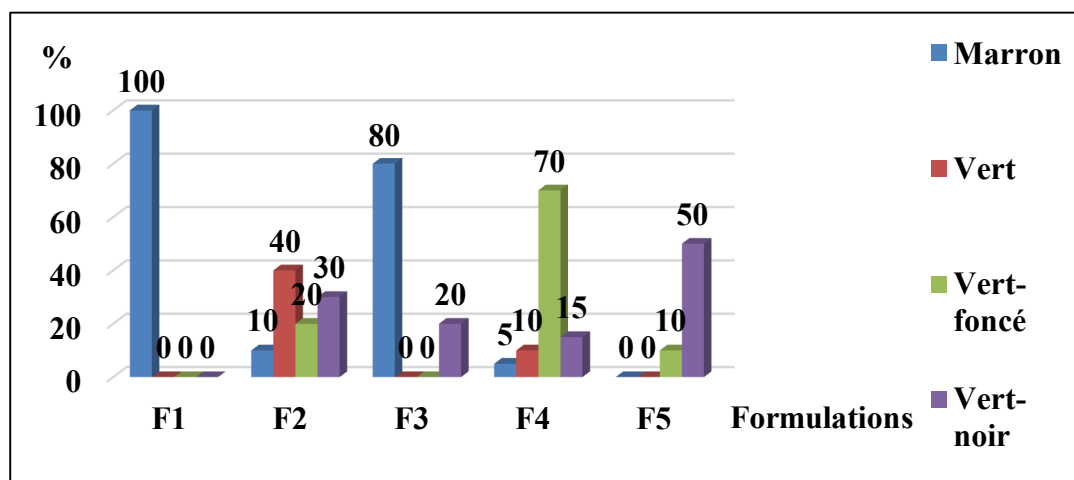


Figure 17 : Résultats relatifs à la qualité de la couleur des formulations de pommades.

D'après la figure (17), 100% des membres du panel de l'analyse sensorielle jugent que, la formulation F1 est de couleur marron. La même couleur a été observée pour la formulation F3 (80%). Selon les membres du panel (40%), ont confié la couleur vert à la 2^{ème} formulation F2. Concernant, la formulation F4 (70%) des membres ont opté pour la couleur vert-forcé. Alors que, la formulation F5 est de couleur vert-noir observée par la moitié des membres du panel.

V.6.2.2. L'odeur

L'intensité d'odeur des cinq formulations dépend des caractères aromatiques des constituants utilisés. Les résultats du test sensoriel concernant la qualité de l'odeur sont mentionnés dans la figure suivante :

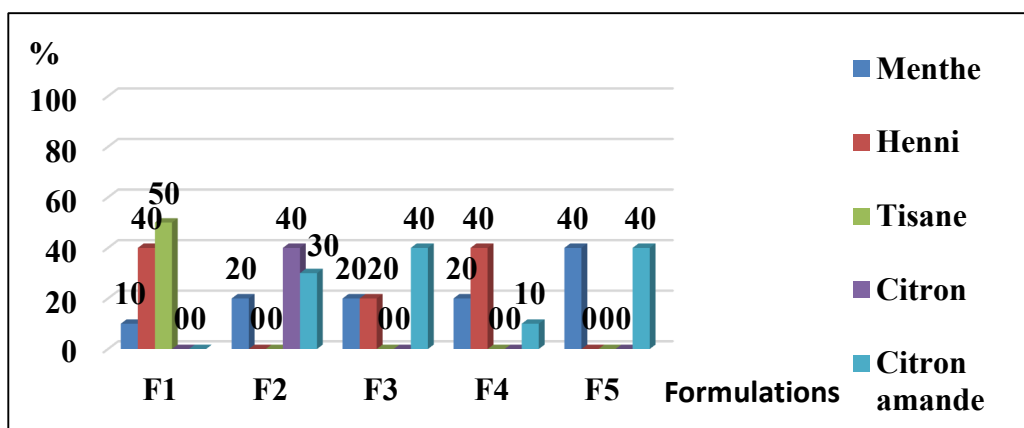
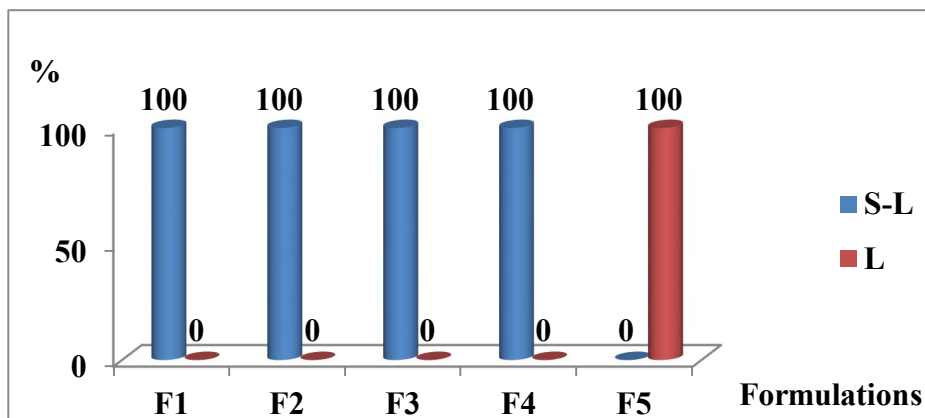


Figure 18 : Résultats relatifs à la qualité d'odeur des formulations de pommades

50% des membres jugent que la formulation F1 à une odeur de la tisane, la formulation F2 présente une odeur de citron jugée par 40% des membres du panel de l'analyse sensorielle. Concernant la formulation F3, 40% des membres ont jugé qu'elle a l'odeur de citron-amande. Pour F4 et F5, 40% des membres ont jugé qu'elles ont respectivement l'odeur du Henni, citron-amande et/ou menthe. Il est à signaler que pour l'ensemble des pommades étudiées, on trouve parfois un mélange des odeurs étudiées et à des taux d'appréciation différents.

V.6.2.3. La texture

Les résultats de l'analyse sensorielle concernant la qualité de la texture des pommades élaborées sont mentionnés dans la figure suivante :



S-L : Semi-liquide ; L : Liquide

Figure 19: Résultats relatifs à la qualité de la texture des formulations de pommades.

D'après la figure ci-dessus, 100% du panel consultés trouvent la texture des quatre formulations (F1, F2, F3, F4) très bonne (semi-liquide), concernant la cinquième formulation ils jugent sa texture mauvaise (liquide).

V.6.2.4. L'homogénéité

Les résultats de l'analyse de l'homogénéité des pommades élaborées sont illustrés dans la figure suivante :

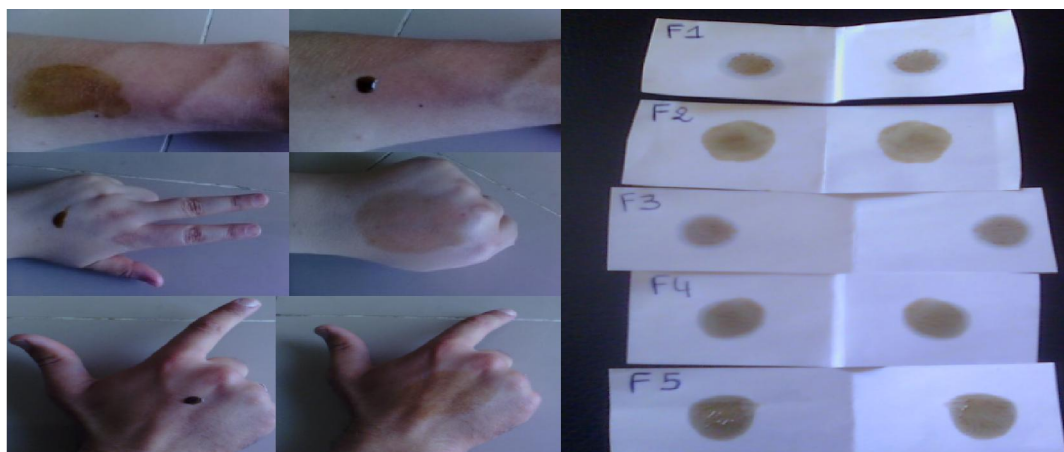


Figure 20 : Résultats relatifs à la qualité de l'homogénéité des formulations de pommades.

Les pommades testées sont très homogènes selon les résultats du test de l'étalement des pommades sur les feuilles en papier et sur les mains du panel d'analyse sensorielle.

D'après les résultats des analyses physico-chimique et sensorielle, les deux meilleures formulations sont F2 et F3. Ces dernières ont subi un test microbiologique.

V.6.3. Résultats de test microbiologique

Les diamètres d'inhibitions provoqués par les pommades choisies (F2 et F3) et l'extrait des saponines sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau X : Diamètres des zones (mm) d'inhibitions (moyenne \pm ET) exprimés pour l'extrait des saponines et les pommades F2 et F3 et la sensibilité des souches testées.

| Microorganismes testés | Valeurs des diamètres d'inhibition (mm) \pm ET | | |
|------------------------|--|-------------------|-------------------|
| | F2 | F3 | E S |
| <i>S. aureus</i> | 20,66 \pm 1,154 | 22 \pm 2,645 | 14,66 \pm 1,527 |
| | +++ | +++ | + |
| <i>E. coli</i> | 13,33 \pm 0,52 | 14,84 \pm 0,230 | 13,5 \pm 0,115 |
| | + | + | + |
| <i>A. niger</i> | 8 \pm 1,618 | 8 \pm 1,205 | 9 \pm 2,357 |
| | - | - | - |

F2 : Formulation F2 ; **F3 :** Formulation F3 ; **E S :** Extrait de saponines de la poudre des feuilles de noyer.

Remarque : le diamètre des disques = 6 mm sont inclus dans les mesures.

Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibitions répertoriées dans le tableau (IX) que les formulations F2, F3 et ES exercent un large spectre d'activité car ils agissent sur les bactéries Gram positif et négatif, mais le degré de sensibilité diffère d'une souche à une autre. Cependant, ils ne présentent pas d'activité antifongique.

En effet, les formulations F3 et F2 sont très efficaces vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres supérieurs à 20 mm. Les formulations F3 et F2 et l'extrait des saponines montrent des zones d'inhibitions intermédiaires variant de (13,33 à 14,84 mm) contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Quant à la moisissure *Aspergillus niger*, elle s'avère résistante aux trois substrats testés avec des zones d'inhibitions inférieurs à 9 mm de diamètre.

Les résultats obtenus pour les formulations F2 et F3 peuvent être expliqués par l'effet combiné des saponines avec les autres constituants, notamment l'huile d'amande, qu'est connue par ses propriétés antimicrobienne, antioxydante d'où le diamètre élevée des zones d'inhibition surtout pour *S.aureus*.

Divers études, ont montré que les saponines possèdent une activité antimicrobienne contre un grand nombre de microorganismes (HOSTETTMANN et MARSTON, 1995 ; LACAILLE- DUBOIS et WAGNER, 2000). Elles sont particulièrement efficaces à de faibles concentrations contre les bactéries Gram positif, dont *S.aureus*, *S. epidermidis* et *Bacillus subtilis*, ainsi que contre certaines bactéries Gram négatif, dont *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia.coli*, *Klebsiella pneumoniae* (ROA et GURFMKEL, 2000). Certains auteurs leur confèrent aussi une certaine activité antifongique (ODA *et al.*, 2000 ; SPARG *et al.*, 2004).

HASSAN *et al.*, (2010), suggèrent que la différence d'activité biologique des saponines de sources diverses est due essentiellement à la différence de leur structure chimique. Cette dernière est influencée par la méthode et les solvants utilisés pour l'extraction.

L'absence des zones d'inhibition de la croissance d'*A.niger* en présence des deux pommades F2 et F3 et l'extrait des saponines est lié soit à la résistance de celles-ci soit à l'insuffisance du volume et de la concentration utilisés.

V.6.4. Résultats des rendements en pectines

La particularité de notre étude est d'avoir choisi de travailler sur l'extraction des pectines à partir d'écorces de melon au sujets desquels peu de recherches ont été effectuées, alors que beaucoup de travaux ont étudié l'extraction des pectines de différentes sources végétales, en particulier de pomme, de citron et de betterave (KALAPATHY et PRACTON, 2001 ; LEVIGNE *et al.*, 2002 ; CENTERI *et al.*, 2005 ; SINGTHONG *et al.*, 2005 cités FARAVASH et ASHTIANI, 2008).

Nos rendements en pectines (exprimés en % de matière sèche), obtenus à partir d'écorces de melon sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau XI : Rendements en pectines extraites à partir d'écorces de melon selon deux méthodes de précipitation.

| Nature des pectines | Rendements (%) | | | |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| | Extraction n°1 | Extraction n°2 | Extraction n°3 | Moyenne ± ET |
| PP Su d'Al | 8 % | 7,75% | 5 % | 6,916±1,661 |
| PP Ch d'Al | 10 % | 12,5 % | 8 % | 9,166±2,818 |

PP Su d'Al : pectines précipitées par le sulfate d'aluminium.

PP Ch d'Al : pectines précipitées par le chlorure d'aluminium.

La première constatation à retenir de ces résultats, est que la teneur en pectines diffère, même si c'est la même matière et malgré les mêmes conditions opératoires retenues.

La deuxième constatation, c'est que les agents de précipitation réagissent différemment sur la même source végétale. Notant que, le type d'agent de précipitation influence la teneur des pectines obtenues.

Ainsi, c'est le chlorure d'aluminium qui permet d'obtenir un meilleur rendement de $9,166 \pm 3,818$ %, alors que le sulfate ne permet d'obtenir que $6,916 \pm 0,661$ %, d'où la différence de $2,25 \pm 3,157\%$ (Figure 20).

Ces variations de rendement sont influencés par divers facteurs à savoir;

1. les méthodes de traitements préliminaires ;
2. le processus et conditions d'extraction (telles que la température, le temps d'extraction, le pH, les types de solvants d'extraction) ;
3. type de matières premières, la variété et le stade de maturité.

Ces paramètres peuvent affecter la quantité et la qualité des pectines extraites (KAR *et al.*, 1999 ; YEOH *et al.*, 2008).

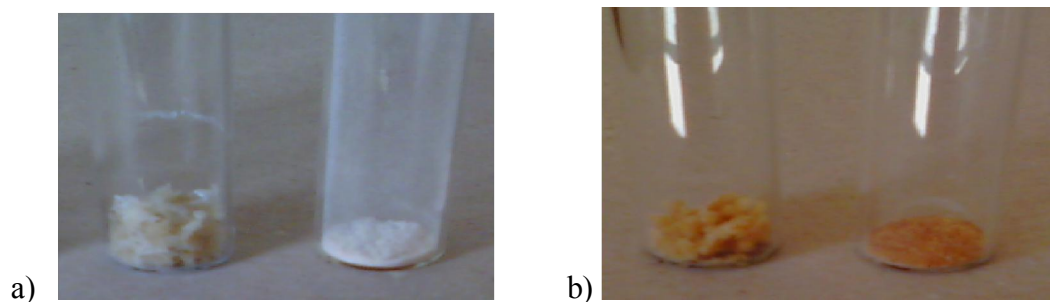


Figure 21: Aspects des pectines obtenues

- a) pectines précipitées par sulfates d'aluminium ; b) : pectines précipitées par chlorure d'aluminium

1. Méthodes de traitements préliminaires

• Blanchiment

Les traitements de préparation de la matière première peuvent provoquer une dégradation plus ou moins intense des polysaccharides pectiques. LO *et al.*, (2002), ont rapporté une dépolymérisation intense au cour du blanchiment. Les enzymes polygalacturonases sont stables à $50-70$ ° C, mais réactivées au-delà de ces températures et seront très actives à des températures de 100 ° C pendant 10 min (ARCHER et FIELDING, 1975 ; HARRIS et DENNIS, 1982; MC FEETERS, 1985 cités par LO *et al.*, 2002).

2. Processus et conditions d'extraction de pectines

MARCON *et al.*, (2005); YAPO *et al.*, (2006) ; FARAVASH et ASHTIANI (2008); ont rapporté l'influence de la température, du pH initial et le temps de solubilisation sur les rendements en pectines.

- **pH**

Le PH de 1,5 utilisé lors de la solubilisation est un paramètre important d'extraction de la pectine. Le changement de ce paramètre pendant tout le processus d'extraction à un effet significatif sur la libération des constituants pariétaux et donc sur le rendement. Ce changement peut avoir lieu à 3 niveaux :

1. Lors du mélange (matière première + eau) lequel est acidifié à 1,5 par Hcl 0,5 N.
2. Pendant la libération des constituants de la matière végétale sous l'action du chauffage à 80-82 ° C, il y a augmentation du pH (CHEFTEL et CHEFTEL, 1978).
3. Enfin, au cours de l'ajustement du pH à la précipitation entre 3,5 et 4, celui-ci étant le pH de précipitation.

Dans le même sens FARAVASH et ASHTIANI (2008), ont constaté que le volume de l'acide utilisé pour la solubilisation et le pH de précipitation influence considérablement le rendement en pectine ; ainsi un volume de 6.5 ml d'aluminium/g de matière première augmente le rendement de 0,5 à 1,5 %.

La précipitation peut avoir lieu à une gamme de pH entre 3.5 et 4. Elle est minimale à 3.5 et absente à pH 2.8. De même, chaque agent réagit à une valeur ou gamme de pH différente : 3.5 à 4 pour le chlorure d'aluminium et 4 pour le sulfate, s'ajoute à cela la réaction de chaque agent vis-à-vis du comportement des matières premières.

- **Temps et température**

Ces deux paramètres influencent également le rendement en pectine, mais d'une manière moindre par rapport au pH. Ainsi RENARD *et al.*, (1990) et ARLON (1995) cités par KOUBALA *et al.*, (2007), ont obtenu une forte extraction de pectine à partir de pulpe de pomme avec du cyclohexane-trans-1, 2- diamine tétra-acétate (CDTA) à pH 4.8 et à une température située entre 20 et 25° C.

De même, MARCON *et al.*, (2005), ont constaté que le rendement en pectine s'élève à une température de 100° C pendant 80 min, par rapport à ceux obtenus aux températures de 50 et 75 ° C et aux temps de 30 et 50 min. Tous ces paramètres présentent des interactions les uns sur les autres et doivent être choisis de telle manière à avoir un équilibre entre eux.

- **Type d'acide utilisé pour la solubilisation**

Ce paramètre est aussi un facteur influençant le rendement, en augmentant ou en diminuant la solubilisation de la protopectine. La valeur de pH 1.5 obtenu avec du HCL constitue selon SARODE *et al.*, (1964); AGARWAL et PRUTHI (1968); CRANDALL (1978) cités par ATTRI et MAINI (1995) ; KRATCHANOVA *et al.*, (1995) cités par KOUBALA *et al.*, (2008), le meilleur agent pour un bon rendement .

Cependant d'autres études ont montré l'efficacité de l'oxalate d'ammonium et du NaOH par rapport à l'HCL dilué, expliquant que l'HCL provoque une hydrolyse partielle de la protopectine, alors que l'oxalate d'ammonium et le NaOH peuvent donner une hydrolyse plus complète (LEGENTIEL *et al.*, 1995; KOUBALA *et al.*, 2007). Nos paramètres sont choisis sur la base des opérations optimales rapportées en bibliographie.

- **Type du solvant de précipitation**

Beaucoup d'études rapportées en littérature ont montré l'efficacité de solvant à base d'aluminium par rapport à l'alcool du point de vue rendement (ATTRI et MAINI, 1995 ; DENNAPA *et al.*, 2006). En effet, DENNAPA *et al.*, (2006) ont obtenu à partir de pulpe de papaya (*Carica papaya*), des rendements en pectine de 2.5 % et 5.84 % précipitées respectivement à l'éthanol et au chlorure d'aluminium.

3. Type ou espèce botanique

SHERFELT (1965) cité par LUZA *et al.*, (1992); ESKIN (1990) ; KUNZCK, *et al.*, (1999) cités par KURZ *et al.*, (2008); ont trouvé que la quantité et les changements du contenu total de pectines ont lieu pendant la maturation et qu'elles dépendent du type de fruit et de la variété mises en œuvre.

4. Facteurs divers

D'autres facteurs peuvent influencer la libération de pectines à partir de la protopectine, notamment le diamètre des particules de la matière première ; Certaines études rapportent que le diamètre des particules de la matière première présente un effet significatif sur le rendement en pectine.

V.6.5. Résultats de la teneur en eau et en cendres

Nos pectines présentent des humidités relatives (HR %) qui varient entre 12 et 15 % et des teneurs en cendres qui varient entre 13 à 16 %. Ces valeurs sont élevées par rapport à celles rapportées par les normes (tableau et figure ci-dessous).

Tableau XII : Teneurs en humidité, et en cendres des pectines d'écorces de melon précipitées par le chlorure et le sulfate d'aluminium.

| Nature des pectines | Humidité en % | Cendres en % |
|---------------------------|----------------|----------------|
| PP Ch d'Al | 15,196 ± 2,031 | 16,142 ± 2,901 |
| PP Su d'Al | 12,545 ± 1,643 | 13,331 ± 1,93 |
| Normes autorisées par FAO | 10 | 1 |

Selon CHEFTEL et CHEFTEL (1978), les cendres des pectines précipitées par les sels minéraux, notamment le sulfate d'aluminium et le chlorure d'aluminium varient dans une gamme de 8 à 25 %. Ces teneurs augmentent avec le pH de précipitation et avec la concentration du sulfate d'aluminium, par contre les solvants organiques tel que l'alcool, permettent sa réduction par augmentation de la lessivage des impuretés présentes au cours de précipitation des pectines.

DENNAPA *et al.*, (2006), ont obtenu des teneurs en cendres de 22,19 % pour les pectines extraites à partir de pulpe de papaya (*Carica papaya*) précipitées par du chlorure d'aluminium, alors que les cendres des pectines précipitées à l'alcool ne sont que de 5,22 %. Par ailleurs, MAY (2000), a rapporté que les pectines précipitées par les sels d'aluminium, notamment le sulfate et le chlorure d'aluminium, sont trop chargées par les impuretés, d'où la teneur élevée en cendres.

Les conditions d'extraction peuvent aussi exercer un effet sur la précipitation des impuretés avec les pectines, YAPO *et al.*, (2006), Le temps de lavage influe également sur la teneur en cendres (SAHARI *et al.*, 2003).

La teneur en cendres est liée à la teneur initiale en sels minéraux et en métaux lourds dans la matière première et retrouvée dans les sous-produits, s'ajoute à cela le matériel ayant servi à l'extraction des pectines et les impuretés du solvant de solubilisation (HCL) et des agents de précipitation (chlorure et sulfate d'aluminium).

V.6.6. Résultats de MEB

Les structures microscopiques des trois pectines étudiées sont illustrées dans la figure ci-dessous :

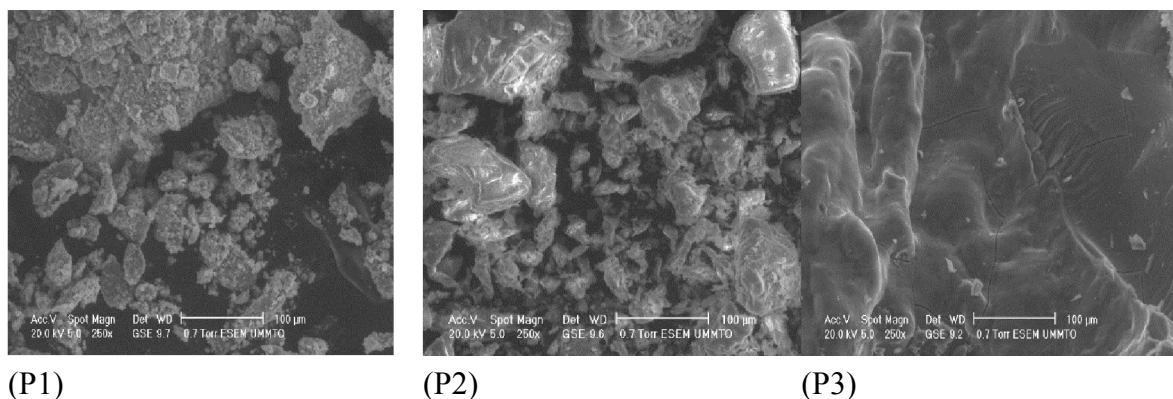


Figure 22 : Structures microscopiques des pectines.

P1 : pectines issues de melon précipitées par le sulfate d'aluminium ; *P2* : pectine commerciale et *P3* : pectines issues de melon précipitées par le chlorure d'aluminium

D'après la figure (22), les pectines précipitées par le sulfate d'aluminium (P1) ont une structure qui ressemble à celle des pectines commercialisées (P2). En effet ces deux pectines ont une structure fine presque identique de feuilles superposées possédante des pores.

Par contre la structure des pectines précipitées par le chlorure d'aluminium (P3) est très rugueuse et non poreuse, qui ressemble à la structure des polymères.

Cette différence est due à l'origine botanique variée des pectines étudiées. En ce qui concerne nos pectines obtenus à partir d'écorces du melon, la différence est due vraisemblablement à l'agent de précipitation. Peut-être que notre pectine n'est pas soluble ou difficilement solubilisable dans le chlorure d'aluminium. Ou bien, du fait qu'elle est mal broyée.

V.6.7. Résultats de l'IR

La figure (23) représentent l'empreinte de la spectroscopie (IR) des trois pectines analysées : pectines commerciales, pectines extraites au sulfate d'aluminium et celles extraites au chlorure d'aluminium.

Le tableau (XII) dans l'annexe (8), représente l'attribution de principales bandes observées sur les spectres IR pour les polysaccharides.

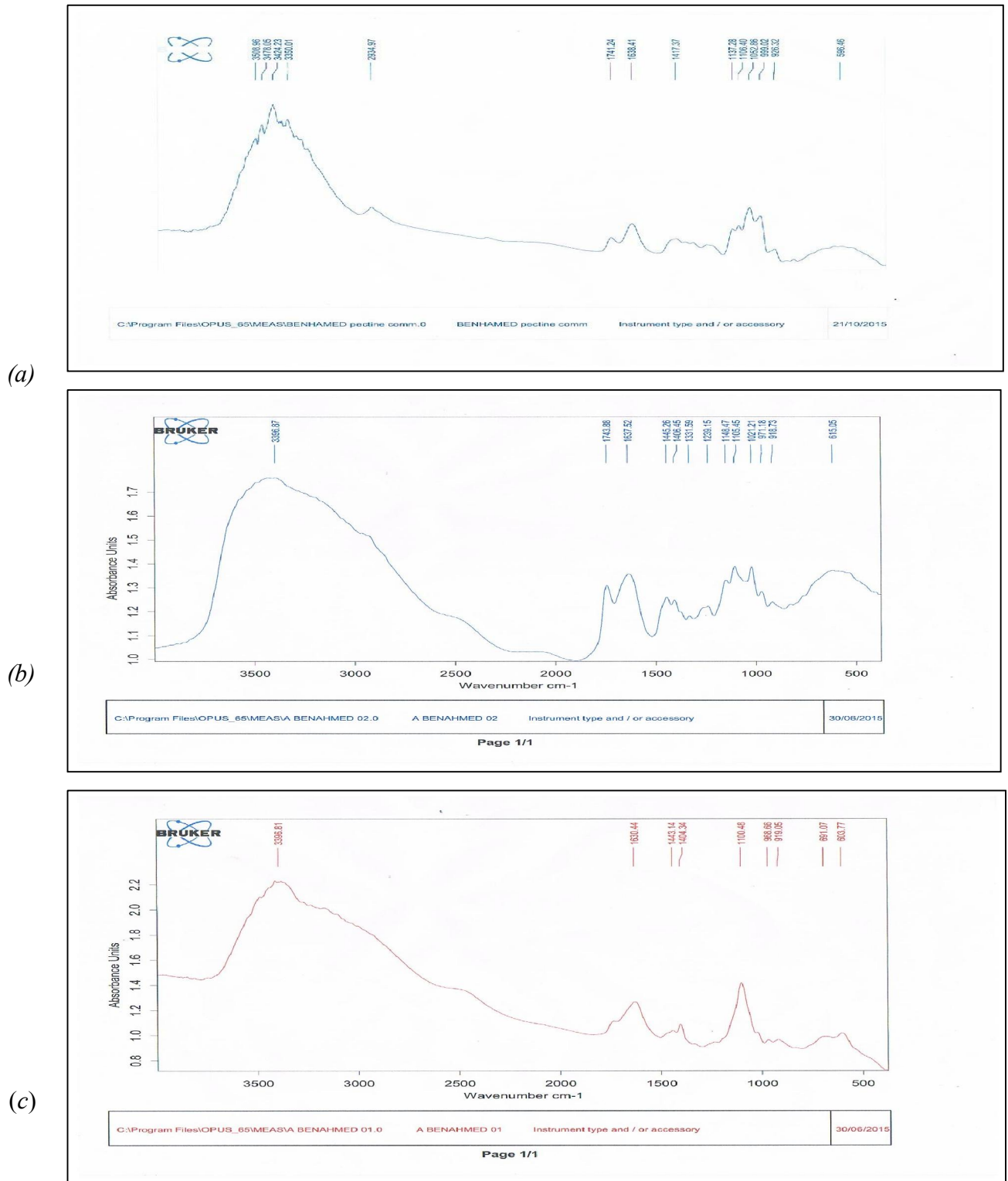


Figure 23 : Spectres Infra-Rouge des pectines.

(a) pectines commerciales ;(b) pectines précipitées par le sulfate d'aluminium et (c) pectines précipitées le chlorure d'aluminium.

D'après les résultats des analyses spectroscopique IR des trois pectines (commerciales, celles issue de l'extraction par le Sulfate et Chlorure d'aluminium) on remarque que :

Les trois spectres IR des échantillons pectiques sont presque similaires et présentent plusieurs pics d'absorption de 500 à 4000 cm^{-1} .

En effet, les spectres obtenus laissent apparaître dans les trois types de pectines trois bandes d'absorption larges à 3478 cm^{-1} , 3396 cm^{-1} et 3400 cm^{-1} qui correspondent à la vibration de type élongation du groupement hydroxyle ν (O-H) et eau d'hydratation. (WU *et al.*, 2007).

La présence de pics à 1741 cm^{-1} dans le graphe (23 (a)) et 1743 cm^{-1} dans le graphe (23 (b)) peuvent être attribuées aux oses acides estérifiés ou non que l'on retrouve surtout dans les pectines. Ces pics correspondent aux liaisons C=O des acides uroniques et des esters selon WU *et al.*, (2007).

Cependant, on observe une absence de ces pics dans le graphe (23 (c)), ce qui traduit soit une très faible teneur ou une absence de ces liaisons dans ces pectines. Ou bien que ces pectines ne sont pas solubles dans le chlorure d'aluminium, ou peut être elles sont dégradés.

On note la présence d'un pic à 2934,97 cm^{-1} dans le graphe des pectines commerciales et qui est absents chez les deux autres pectines. Ce pic correspond aux liaisons ν (C-H) (WU *et al.*, 2007).

Dans les trois graphes (23 (a), 23 (b) et 23 (c)), on observe des bandes d'absorptions à 1638 cm^{-1} , 1637,52 et 1630,44 indiquant la présence d'acides uroniques, sous forme de sels d'acides (WU *et al.*, 2007).

Selon WU *et al.*, (2007), la présence de pics aux environ de 1416 cm^{-1} peuvent correspondre aux groupes des anions carboxyliques ($-\text{COO}-$).

les bandes observés dans les graphes : (23 (a) ; 1417,37 cm^{-1}), (23 (b) ; 1406,45 ; 1445,26 ; 1637,52 cm^{-1}) et (22 (c) ; 1404,34 ; 1443,14 ; 1630,44 cm^{-1}) peuvent être attribuées aux anions carboxyliques ($-\text{COO}-$) selon les études de WU *et al.*, (2007).

Chaque extrait de polysaccharides a des bandes spécifiques dans la région 1200–800 cm^{-1} . Cette région est caractérisée par le chevauchement des pics de vibration et de rotation du groupement (C–OH) des oses et de vibration de la liaison osidique (C–O–C) (WU *et al.*, 2007).

Conclusion

L'étude que nous avons menée a porté sur la valorisation de quelques ressources agricoles (écorces du melon et feuilles de noyer). Notre recherche a été axée sur les points suivants:

- Procéder à l'extraction des saponines à partir de la poudre des feuilles de noyer et leur application dans une pommade cosmétique.
- Procéder à l'extraction des pectines à partir d'écorces de melon et leurs caractérisations.

D'après les résultats obtenus, on peut tirer les conclusions suivantes :

- **Cas des feuilles de noyer**

L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur l'extrait aqueux de la poudre des feuilles de noyer a montré la présence d'alcaloïdes, des flavonoïdes, des tanins, des glucosides et des saponines en quantités importantes.

L'analyse quantitative des polyphénols des extraits ethanologique et aqueux des feuilles fraîches et sèches de noyer a été réalisée. Les résultats obtenus montrent que les extraits ethanologique présentent des teneurs élevées en polyphénols totaux (510,63 à 584 mg EAG/g de matière sèche) dans les feuilles fraîches et sèches respectivement en comparaison avec les extraits aqueux (127,92 à 189,05 mg EAG/g de matière sèche).

L'extraction des saponines à partir des feuilles de la poudre de noyer a été réalisée par la méthode de macération dans les solvants de polarités croissantes, avec un rendement d'extraction moyen de 22,8 %.

Les saponines extraites de la poudre des feuilles de noyer ont été appliquées dans la fabrication d'une pommade cosmétique. L'étude rhéologique des pommades préparées à base de saponines nous a permis de déterminer leur nature rhéologique qui consiste en un liquide non Newtonien.

La soumission de pommades élaborées à différents tests de qualité (homogénéité, pH, viscosité) a conduit à la sélection de deux meilleures pommades, présentant les meilleures caractéristiques organoleptiques et physicochimiques. Ces dernières ont subi avec l'extrait de saponines un test microbiologique, révélant qu'elles sont efficaces contre les bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et négatif (*Escherichia coli*) et non efficaces contre la moisissure *A.niger*.

- **Cas des écorces de melon**

Les rendements moyens en pectines obtenus à partir d'écorces de melon sont de 6,916% pour celles précipitées par le sulfate d'aluminium et de 9,166 pour celles précipitées par le chlorure d'aluminium.

L'analyse de la structure microscopique des pectines extraites d'écorces de melon révèle que les pectines précipitées par le sulfate d'aluminium présentent une microstructure proche à celle de la pectine commerciale, alors que les pectines précipitées par le chlorure d'aluminium sont caractérisées par une microstructure différente des deux citées avant.

Les résultats des groupements fonctionnels par l'analyse (IR) ont montré que, les trois spectres IR des échantillons pectiques étudiés sont presque similaires et présentent plusieurs pics d'absorption de 500 à 4000 cm^{-1} . Cependant, c'est les spectres des pectines extraites à partir d'écorces de melon par le sulfate d'aluminium et ceux des pectines commerciales qui se ressemblent le plus.

A l'issue de notre expérimentation, nous pouvons conclure que, les pectines et les saponines extraites à partir d'écorces de melon et les feuilles de noyer offrent effectivement de grandes possibilités de valorisation dans divers secteurs (industrie agroalimentaire, pharmaceutique...etc.). Les résultats obtenus dans notre étude sont globalement comparables à ceux obtenus dans la littérature. En effet, les pommades obtenues sont conformes aux normes pharmaceutiques et les pectines précipitées par le sulfate d'aluminium présentent des caractéristiques similaires aux pectines commerciales.

Cependant, l'ensemble de ces résultats obtenus dans le cadre de cette étude ne constitue qu'une première étape dans la voie de valorisation des sous-produits étudiés. Des études complémentaires, précises et approfondies restent nécessaires pour pouvoir confirmer ou infirmer les résultats mis en évidence.

Ainsi il serait très intéressant :

- D'identifier et de purifier les saponines de noyer et de tester leurs activités ;
- Concernant les pommades, il est indispensable d'évaluer leurs effets in vivo (test d'irritation) et d'étudier leur stabilité durant la conservation pour autoriser leur commercialisation.
- D'identifier et de purifier les pectines extraites (détermination du degré d'estérification, pouvoir gélifiant...) et d'évaluer leurs activités.

Références

Bibliographiques

- **AFNOR (1986)** : Association Française de Normalisation. Recueil de normes françaises des fruits et produits dérivés – *AFNOR*, 3 Ed., Paris.
- **AKHTAR M., DICKINSON E., MAZOYER J. & LANGENDORFF V. (2002)**. Emulsion stabilizing properties of depolymerized pectin. *Food Hydrocolloids*, 16, 249-256.
- **AMARAL J.S., SEABRA R.M., ANDRADE P.B., VALENTAO P., PEREIRA J.A. & FERRERES F. (2008)**. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia L.*) leaves. *Bio.Mol.*, 13, 1321-1332.
- **AMZAL H. (2009)**. Etude de l'activité antioxydante des saponines du torteau de l'arganier. Thèse de doctorat. Université Mohammed V AGDAL. Rabat.
- **ATTRI B.L. & MAINI S.B. (1995)**. Pectin from G algal (*Citrus Pseudolimon Tan*) peel. *Bioresource Technology*, 55, 89-91.
- **BACIC A. (2006)**. Breaking an impasse in pectin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(15), 5639-5647.
- **BANNEROT A. & GALLAIS H. (1992)**. Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection. Paris.
- **BARILE E., BONANOMI G., ANTIGNANI V., ZOLFAGHARI B., SAJADI S.E., SCALA F. & LANZOTTI V. (2007)**. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry*, 68(5), 596-603.
- **BENJELALI B., TANTAOUI E.A. & ESMAILI- ALAOUI M. (1986)**. Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et Phytothérapie*, 20,155-167.
- **BOIZOT N. & CHARPENTIER J-P. (2006)**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cah. Tech. INRA*, 79-82.
- **BONEV I. (1973)**. Note technique sur la noyer, production des plants greffés et création des noyeraies. Bibliothèque forestière, Alger.
- **British Pharmacopée (2009)**. Vol I, II, III, IV.
- **BRUNETON J. (1993)**. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, 2^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.
- **BRUNETON J. (1999)**. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, 3^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.

- **BRUNETON J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, 4^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.
- **CHANDEL R.S. & RASTOGI R.P. (1980).** Triterpenoid saponins and sapogenins. *Phytochemistry*, 19(2), 1889-1908.
- **CHARROUF Z., NAIT -M'BAREK A., GUILLAUME D., LEROY Y. & KOL O. (1996).** Saponins used in Food and Agriculture. Plenum Press, 241–245.
- **CHAUX C. & FOURY L. (1994).** Productions légumières. Lavoisier, Paris.
- **CHEFTEL J.C. & CHEFTEL H. (1978).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Tec & Doc, 1^{ère} Ed., Entreprise Moderne, Paris.
- **CONSTENLA D. & LOZANO J.E. (2003).** Kinetic model of pectin demethylation. *Latin American Applied Research*, 33, 91-96.
- **COSMULESCU S. (2011).** Variation of phenols content in walnut (*Juglans régia L.*). *South Western journal of horticulture, Biology and Environment*, 1 (2), 25-33.
- **DAVREUX M. & DELAUDE C. (1971).** Contribution à l'étude des saponines contenues dans les Polygalacées. Identification de la saponine extraite du *Securidaca welwitschii* OLIV. *Bull. Soc. Roy. Sc. Liège*, 40(9-10), 498–501.
- **DELAY C., GAVIN J. A., AUMELAS A., BONNET P. A. & ROUMESTAND C. (1997).** Isolation and structure elucidation of a highly haemolytic saponin from the Merck saponin extract using high-field gradient-enhanced NMR techniques. *Carbohydr Res*, 302(1-2), 67–78.
- **DENNAPA B., KAMONRAD R. & HATAICHANOKE N. (2006).** Extraction and physicochemical characteristics of acid-soluble pectin from raw Papaya (*Carica Papaya*) peel. *Chiang Mai J.Sci.*, 33 (1), 129-135.
- **DIALLO D, SANOGO R, YASAMBOU H, TRAOREA, COULIBALY K. & MAIGA A, (2004).** Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana lam.* (Rhamnaceae), utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali ; in «Préparation et incorporation dans la margarine d'un extrait de date des variétés sèches ». Thèse de Magister, Université de Boumerdes.
- **DOHOU N., YAMNI K., TAHROUCH S., IDRISSE L.M., BADOUC A. & GMIRA N. (2003).** Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine. *Thymelaea lythroides*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142, 61-78.

- **DONATO L. (2004).** Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques. Thèse de doctorat, France.
- **DRIDI F. (2005).** Extraction et analyse de l'huile essentielle de cumin. Formulation d'une pommade decongestionnante. Mémoire de fin d'étude, Université M'hamed Bougherra, Boumerdes.
- **DSAT (2015).** Direction du Service Agricole de la Wilaya de Tizi-ouzou (Statistiques 2015).
- **ESKIN M. (1990).** Biochemistry of foods: biochemical changes in raw Foods: fruits and vegetables. Second Edition, Academic press, INC., New York.
- **ESPIARD E. (2002).** Introduction à la transformation industrielle des fruits. Tec & Doc. Lavoisier. Paris.
- **ESTRADA A. S., KATSELIS B., LAARVELD G. & BARL B. (2000).** Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 23, 27-43.
- **FARAVASH R.S. & ASHTIANI F.Z. (2008).** The influence of acid volume, ethanol to extract ratio and acid-washing time on the yield of pectic substances extraction from peach pomace. *Food Hydrocolloids*, 22, 196-202.
- **FERTONANI H.C.R., SCABIO A., SCHEMIN M.H.C., CARNEIRO E.B.B., NOGUEIRA A. & WOSIACKI G. (2006).** Influence of acid concentration on extraction and quality of apple pomace pectin. *Ciências Agrarias*, 27(4), 599-612.
- **FONTANILLE M. & GNANOU Y. (1994).** Technique de l'ingénieur « structure moléculaire et morphologique des polymères », 1-27.
- **GUIGNARD J.L. & DUPONT F. (2004).** Botanique : systématique moléculaire. Masson, 13^{ème} Ed., Paris.
- **GUILLOTIN S. (2005).** Studies on the intra-and intermolecular distribution of substituents in commercial pectins. PhD. thesis Wageningen University, ISBN 90-8504-265-8.
- **HAMILTON-MILLER J.M.T & SHAH S. (2004).** Activity of tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 46, 279-285.

- **HASSAN S.M., HAQ A.U., BYRD J.A., BERHOWD M.A., CARTWRIGHT B.A.L. & BAILEY C.A. (2010).** Haemolytic and Antimicrobial Activities of Saponin-Rich Extracts from Guar Meal. *Food Chemistry*, 119, 600-605.
- **HENRIK V.S., JAKOB K.J., SUSANNE O.S., JESPER H. & NAOMI G. (2007).** Biosynthesis of pectin. *Physiologia Plantaru*, 129, 283-295.
- **HERBSTRIETH & FOX (1998).** Chances and limits for the use of pectin as emulsifier. *Corporate Group Turns*, 37(5), 1-14.
- **HOSTETTMANN K., HOSTETTMANN M. & MARSTON A. (1991).** Saponins: Methods in plants. *Biochemistry*, 7, 435-471.
- **HOSTETTMANN K. & MARSTON A. (1995).** Saponins. *Chemistry and Pharmacology of Natural products*, Cambridge University Press, 232-233.
- **JAKOPIC J., COLARIC M., VEBERIC R., HUDINA M., SOLAR A. & STAMPAR F. (2007).** How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur. *Food Chemistry*, 104(1), 100-105.
- **JAKOPIC J., VEBRIC R. & STAMPAR F. (2009).** Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta. Agri. Slov.*, 93(1), 11-15.
- **JETT L.W. (2005).** High Tunnel Melon and Water melon production. Backhys Publishers, Pays-bas.
- **JUNTACHOTE T., BERGHOFER E., SIEBENHDL S. & BAUER F. (2006).** The antioxidative properties of Holy basil and Glangal in cooked ground pork; in «Préparation et incorporation dans la margarine d'un extrait de date des variétés sèches ». Thèse de Magister, Université de Boumerdes.
- **KACURAKOVA M., CAPEK P., SASINKOVA V., WELLNER N., & EBRINGEROVA A. (2000).** FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.*, 43(2), 195-203.
- **KAR F. & ARSLAN N. (1999).** Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers*, 40 (4), 277–284.
- **KOUBALA B.B., KANSCI G., MBOME L.I., CREPEAU M.-J., THIBAUT J.-F. & RALET M.-C. (2007).** Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from mango peels. *Food Hydrocolloids*, 12, 253-260.

- **KOUBALA B.B., MBOME L.I., KANSCI G., MBIAPO F.T., CREPEAU M.-J., THIBAUT J.-F. & RALET M.-C. (2008).** Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions. *Food Chem.*, 106, 1202-1207.
- **KOUGAN KNOWP G.P. (2010).** Isolement et caractérisation des saponines de trois plantes de la famille des Araliaceae et Dracaenaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales. Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne.
- **KRATCHANOVA M., PALVLOVA E. & PANCHEV I. (2004).** The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydr. Polym.*, 56 (2), 181-185.
- **KUMAR U., KUMAR B., BHANDARI A. & KUMAR Y. (2010).** Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1, 138-147.
- **KURZ C., CARLE R. & SCHIBER A. (2008).** Characterisation of cell wall polysaccharide profiles of apricots (*Prunus armeniaca* L.), Peaches (*Prunus persica* L.), and pumpkins (*Cucurbita* sp) for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chem.*, 106, 421- 430.
- **LACAILLE- DUBOIS M.A. & WAGNER H. (1996).** A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomédecine*, (2), 371-384.
- **LACAILLE-DUBOIS M-A. & WAGNER H. (2000).** Bioactive saponins from plants: an update in studies in Natural Product Chemistry. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 21, 633-687.
- **LACAILLE-DUBOIS M-A. (2005).** Bioactive saponins with Cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 32, 209-246.
- **LADOGRAVE D. (2008).** *Médecine des plantes*. 3^{ème} Ed., Dunod, Paris.
- **LEGENTIEL A., GUICHARD I., PIFFAUT B. & HALUK J. P. (1995).** Characterization of Strawberry Pectin Extracted by Chemical Means. *Lebensm.-Wiss.-Technol.*, 28, 56-576.
- **LEROUX J., LANGENDORFF V., SCHIK G., VAISHNAV V. & MAZYER J. (2003).** Emulsion stabilising properties of pectin. *Food Hydrocolloids*, 17, 455-462.
- **LOPES DA SILVA J. A. & RAO M.A. (2006).** Pectins: structure, functionality, and uses. In *food polysaccharides and their applications*. Taylor & Francis Group, 2nd Ed., 353-411.

- **LO C.M., GRUN I.U., TAYLOR T.A., KRAMER H. & Fernando L.N. (2002).** Blanching Effects on the Chemical Composition and the Cellular Distribution of Pectins in Carrots. *Journal of food Science (JFS): Food Chemistry and Toxicology*, 67 (9), 3321-3328.
- **LUZA J.G., GORSEL R.V., POLITO V. S. & KADER A.A. (1992).** Chilling injury in peaches: a cytochemical and ultrastructural cell wall study. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117(1), 114-118.
- **MAJESTER S.P., ELIAS R., DIAZ L.A.M., BALANZARD G., GASQUET M. & DELMAS F. (1991).** Saponins of the irry plant *hedera helix* and their leishmanicidic activity. *Planta med*, 57, 260-262.
- **MALNE J.F., PARVE M., KARM A., MCKEVY A., AHMAD I. & BHATTY M. (1980).** Drag discovery from medicinal plants. *Journal of the chemical society*, 2, 1683.
- **MANDERSON K., PINART M., TUOHY K.M., GRACE W.E., HOTCHKISS A.T., WIDMER W., YADHAV M.P., GIBSON G.R. & Rastall R.A. (2005).** In vitro determination of perbiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by product stream. *J.Appl Environ Microbiol*, 71(12), 8383-8389.
- **MARCON M.V., VRIESMANN L.C., WOSIACKI G., BELESKI-CARNEIRO E. & PETKOWICZ C.L.O. (2005).** Pectins from apple pomace. *Polimeras: Ciência e Tecnologia*, 15 (2), 127-129.
- **MARSTON A., WOLFENDER J. L. & HOSTETTMANN K. (2000).** Analysis and isolation of saponins from plant material. In *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*. Annual Proceedings of the Phytochemical Society, Clarendon Press, 1-12.
- **MASSIOT G. & LAVAUD C. (1995).** Structural elucidation of saponin. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 15, 187-224.
- **MAY C. D. (2000).** Pectins. In Phillips G.O. and Williams P.A. (Eds). *Handbook of Hydrocolloids*. Wood head publishing, 169-188.
- **MC CREADY R.M. (1970).** Pectin, methods in food analysis. Joslyn M.A, 2^{ème} Ed., Academic Press, New-York and London.
- **MESBAH S. & BOUHALOUFA S. (2012).** Caractérisation physicochimiques de deux variétés de melon- essais de fabrication de confitures. Mémoire de fin d'étude. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

- **MORRIS G.A., FOSTER T.J. & HARDING S.E. (2002).** A hydrodynamic study of the depolymerisation of high methoxy pectin at elevated temperatures. *Carbohydr. Polym.* 48, 361-367.
- **NF V 05-113, (1972).** Détermination des cendres totaux. Vol 49, n° 4, 289-298.
- **NF V 05-108, (1970).** Produits de l'agriculture. Produits dérivés des fruits et légumes. Détermination conventionnelle du potentiel hydrogène.
- **NF V 05-101, (1974).** Produits dérivés des fruits et légumes. Détermination de l'acidité titrable.
- **ODA K., MATSUDA H., MURAKAMI T., KATAYAMA S., OHGITANI T. & YOSHIKAWA M. (2000).** Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.*, 381, 67-74.
- **OBIED H.K., ALLEN M.S., BEDGOOD D.R., PRENZLER P.D., ROBARDS K. & STOCKMANN R. (2005).** Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 823-837.
- **ODET J. (1991).** Le melon. Appria. 2^{ème} Ed, Paris.
- **OUNIS M., ZITOUNI A. (1996).** Le noyer commun (*Juglans regia* L). Le connaître ...pour mieux le développer. *Rev la forêt algérienne, INRF(2)*, Algérie.
- **OWEN P.L. & JOHNS T. (1999).** xanthipe oxidase inhibitory activity of north American plant remedies used for gont ; in «Préparation et incorporation dans la margarine d'un extrait de date des variétés sèches ». Thèse de Magister, Université de Boumerdes.
- **PEREIRA J.A., OLIVEIRA I., SOUSA A., FERREIRA I., BENTO A. & ESTEVINHO L. (2008).** Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2103-2111.
- **Pharmacopée Européenne (2000).**
- **PONCE A.G., FRITZ R., DELVALLE C. & ROURA S.I. (2003).** Antimicrobiol activity of essential oils on the native microflora of organic swiss chard. *Lebensmittel-wissenschaft und technologic*, 36,679-684.
- **PRIOR R.L., WU X. & SCHAICH K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 10 (53), 4290-4302.

- **PTICHKINA N.M., MARKINA O.A. & RUMYANTSEVA G.N. (2008).** Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food Hydrocolloids*, 22, 192-195.
- **QIN G.W. (1998).** Some progress on chemical studies of triterpenoid saponins from Chinese medicinal plants. *Curr. Org. Chem.*, 2, 613-620.
- **QURECHI M.N., STECHER G. & BONN G.K. (2014).** Determination of total polyphénolic compounds and flavonoids in *Juglans regia* leaves. *J. Phar. Sci.*, 4 (27), 865-869.
- **RALET M.C., BONNIN E., & Thibault, J.-F. (2001).** Chromatographic study of highly methoxylated lime pectins deesterified by different pectin methyl-esterases. *Journal of Chromatography B*, 753, 157–166.
- **RALET M.-C., CABRERA J.-C., QUEMENER B., BONNIN E. & THIBAUT J.-F. (2006).** Mapping sugar beet pectin acetylation pattern. *Phytochemi.*, 66, 1832-1843.
- **RAO A. V. & GURFMKEL D. M. (2000).** The bioactivity of saponins: Triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metab. Drug Interac.*, 17, 211-235.
- **RIDLEY B.L., ONEILL M.A. & MOHNEN D. (2001).** Pectin: structure, biosynthesis and oligalacturonides -related signalling. *Phytochemistry*, 57, 929 – 967.
- **SAHARI M.A., AKBARIAN A.M. & HAMED M. (2003).** Effect of variety and acid washing method on extraction yield and quality of sunflower head pectin. *Food Chemi.*, 83, 43-47.
- **SAHU N. P., BANERJEE S., MONDAL N. B. & MANDAL D. (2008).** Steroidal saponins. *Fortschr. Chem. Org. Naturst*, 89, 45–141.
- **SAUVAGEOT F. (1982).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaire : Principe des techniques d'analyse. Tec & Doc, 2^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.
- **SCHOLS H.A. & VORAGEN A.G.J. (2002).** The chemical structure of pectins. In: *Pectins and their Manipulation*. Blackwell Publishing Ltd, 1-29.
- **SHAH T.I., AKHTAR S. & GANESH N. (2013).** Preliminary phytochemical evaluation and anti-bacterial potential of different leaf extracts of *J. regia*: A ubiquitous dry fruit from Kashmir-India. *Pharm. Sci. Rev. Res.*, 19(2), 93-96.
- **SHARAFATI-CHALECHTORI R. & RAFIEIN M. (2011).** Biological characterization of Iranian walnut (*Juglans regia L.*) leaves. *Turk. J. Biol.*, 35, 635- 639.

- **SHARMA B.R., NARESH L., DHULDHOYA N.C., MERCHANT S.U. & MERCHANT U.C. (2006).** An overview on pectin. *Times Food Processing Journal*, 44-51.
- **SINGLETON V.L., ORTHOFER R. & LAMUELA-RAVENTOS R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Method. Enzymol.*, 299, 152-178.
- **SPARG S.G., LIGHT M.E. & STADEN J.V. (2004).** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219-243.
- **SPICHIGER R.E., SAVOLAINEN V., FIGEAT M. & JEANMONOD D. (2004).** *Botanique : systématique des plantes à fleurs*. Presses polytechniques et universitaires romandes, 3^{ème} Ed., Lausanne.
- **SRIAMONRNSAK P. (2003).** Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: a review, 206-228.
- **THAKUR B.R., SINGH R.K. & HAND A.K. (1997).** Chemistry and uses of pectin-a review. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.*, 37(1), 47-73.
- **TAWAHA K., ALALI F.Q., GHARAIBEH M., MOHAMMAD M. & EL-ELIMAT T. (2007).** Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.*, 24(1), 19-25.
- **VANIER P. (1999).** *Plantes médicinales*. Masson, 2^{ème} Ed, Paris.
- **VAROQUAUX F. (2006).** *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*. Edition Quae, Paris.
- **VERARDO V., BENDINI A., CERRETANI L., MALAGUTI D., COZZOLINO E. & CABONI M.F. (2009).** Capillary gas chromatography analysis of lipid composition and evaluation of phenolic compounds by micellar electrokinetic chromatography in Italian walnut (*Juglans regia L.*): irrigation and fertilization influence. *Journal of Food Quality* 32(2), 262-281.
- **VINCKEN J.P., SCHOLS H.A., OOMEN R.J.F.J., MC CANN M., ULUSKOV P., VORAGEN A.G.J. & VISSER R.G.F. (2003).** If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I .implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.*, 132 (4), 1781-1789.
- **VINCKEN J.P., HENG L., Groot A. & GRAPPEN H. (2007).** Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68, 275-297.

- **VORAGEN A.G. & VISSER J. (1996).** Pectins and pectinas .In Progress in Biotechnology. Elsevier Science B.V., 14, 715- 725.
- **WANG Y., ZHANG Y., ZHU Z., LI Y., LI M. & YU B. (2007).** Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 2528-2532.
- **WEIR T.L., PARK S.W. & VIVANCO J.M. (2004).** Biochemical and Physiological Mechanisms Mediated by Allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 472-479.
- **WILLATS W.G.T., MC CARTENY L., MACKIE W. & KNOX J.P. (2001).** Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47(1-2), 9-27.
- **WU Y., CUI S. W., TANG J., Wang Q. & GU X. (2007).** -Preparation, partial characterization and bioactivity of water-soluble polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds. *Carbohydrate polymers*, 70, 437-443.
- **YAPO B.M., ROBERT C., ETIENNE I., WATHELET B. & PAQUOT M. (2006).** Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chem.*, 35, 514-520.
- **YAPO B. (2007).** Etude de la variabilité structurale des pectines. Thèse de doctorat .France.
- **YEOH S., SHI J. & LANGRISH T.A.G. (2008).** Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, 218 (1-3), 229-237.
- **ZHONGDONG L., GUOHUA W., YUNCHANG G. & KENNEDY J.F. (2005).** Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave. *Carbohydr. Polym.*, 64(4), 548-552.

Annexes

Annexe 1

- Appareillages, solvants, réactifs chimiques et milieux de culture

| Appareillages | Solvants et réactifs |
|--|---|
| <p>Balance de précision 0.001g (KERN 770)</p> <p>Bain-marie, Étuve (MEMMERT)</p> <p>Four à moufle (NABERTHERM)</p> <p>Microscope électronique à balayage (PHILIPS ESEM XL 30)</p> <p>pH- mètre (INOLAB)</p> <p>Plaque chauffante (RYPA)</p> <p>Réfractomètre (HANNA)</p> <p>Rotavapor (STUART)</p> <p>Spectrophotomètre visible (EV 9200)</p> <p>Viscosimètre (VT 500)</p> <p>Réfrigérateur</p> <p>Petits matériels</p> <p>Verrerie de laboratoire (béchers, burettes, cristallisoirs, éprouvettes, fioles, tubes à essai ...etc).</p> <p>Agitateurs variés (à barreau magnétique chauffant et non).</p> <p>Mortier, pilon, verre de montre, papiers-filtres, spatule, passoire, cuves.</p> | <p>Acide chlorhydrique</p> <p>Ammoniaque</p> <p>Acétone, Acétate de sodium</p> <p>Acide gallique</p> <p>Chloroforme</p> <p>Chlorure ferrique</p> <p>Carbonate de calcium</p> <p>Chlorure d'aluminium</p> <p>Carbonate de sodium</p> <p>Eau distillée</p> <p>Éthanol</p> <p>Éther diéthylique</p> <p>Éther de pétrole, Hydroxyde de sodium,</p> <p>Isobutanol</p> <p>Méthanol, Propanol</p> <p>Potasse</p> <p>Sulfate d'aluminium</p> <p>Sulfate de sodium anhydre</p> <p>Réactif de Dragendroff</p> <p>Réactif du Folin-Ciocalteu</p> |

- **Matériel d'étude biologique**

| | |
|------------------------------|--|
| Appareillages | <p>Autoclave de paillasse (WEBECO)</p> <p>Balance de précision 0.001g (KERN 770)</p> <p>Bain-marie (MEMMERT)</p> <p>Étuve bactériologique (MEMMERT)</p> <p>Spectrophotomètre visible (MEDLINE)</p> <p>Vortex, réfrigérateur.</p> <p>Petits matériels</p> <p>Anse de platine, bec bunsen, boîtes de Pétri, cuves, disques stériles (papier Wattmann), écouvillons, embouts en plastiques stériles, micropipettes, pince, pipettes Pasteur, portoir pour tubes.</p> |
| Milieux de culture | <p>Gélose nutritive (GN)</p> <p>Gélose Mueller Hinton (MH)</p> <p>Gélose glucosée à l'oxytétracycline (OGA)</p> |
| Réactifs et solutions | <p>Eau distillée</p> <p>Eau physiologique stérile (9 g/l)</p> <p>Diméthylsulfoxyde (DMSO)</p> <p>Eau de javel</p> |

Annexe 2

- **Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols totaux**

Une courbe d'étalonnage est préparée dans une gamme de (0 à 10 mg /l), en utilisant l'acide gallique comme standard.

1. Préparation de la solution d'acide gallique

Dissoudre 0,5 g d'acide gallique dans 100 ml d'eau distillée. Il faut diluer la solution obtenue. Prendre 1 ml de la SM et la mettre dans 9 ml d'eau distillée pour avoir (10^{-1}). À partir de la 10^{-1} refaire la même chose pour obtenir 10^{-2} . C'est cette solution qu'on va utiliser dans notre gamme.

| Tubes | Blanc | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|----------------------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Concentration | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| Acide gallique (µl) | 0 | 400 | 800 | 1200 | 1600 | 2000 |
| Eau distillée (µl) | 2000 | 1600 | 1200 | 800 | 400 | 0 |

Listes des Annexes

1. Remplir les tubes avec (l'eau distillée + acide gallique) selon les quantités mentionnées dans le tableau au-dessus.
2. Ajouter à tous les tubes 50 µl du réactif Folin-Ciocalteu, et ce à l'abri de la lumière.
3. Homogénéiser au Vortex.
4. Laisser agir 5 min.
5. Ajouter 500 µl de carbonate de sodium Na₂CO₃ (20%).
6. Incuber à l'ombre et à la température ambiante pendant 1 heure. L'absorbance est mesurée à 760 nm contre un blanc (sans acide gallique).

Résultats

| Tubes | Blanc | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Concentration | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| DO | 0 | 0,224 | 0,287 | 0,455 | 0,579 | 0,781 |

La figure ci-dessous représente la courbe étalon obtenue :

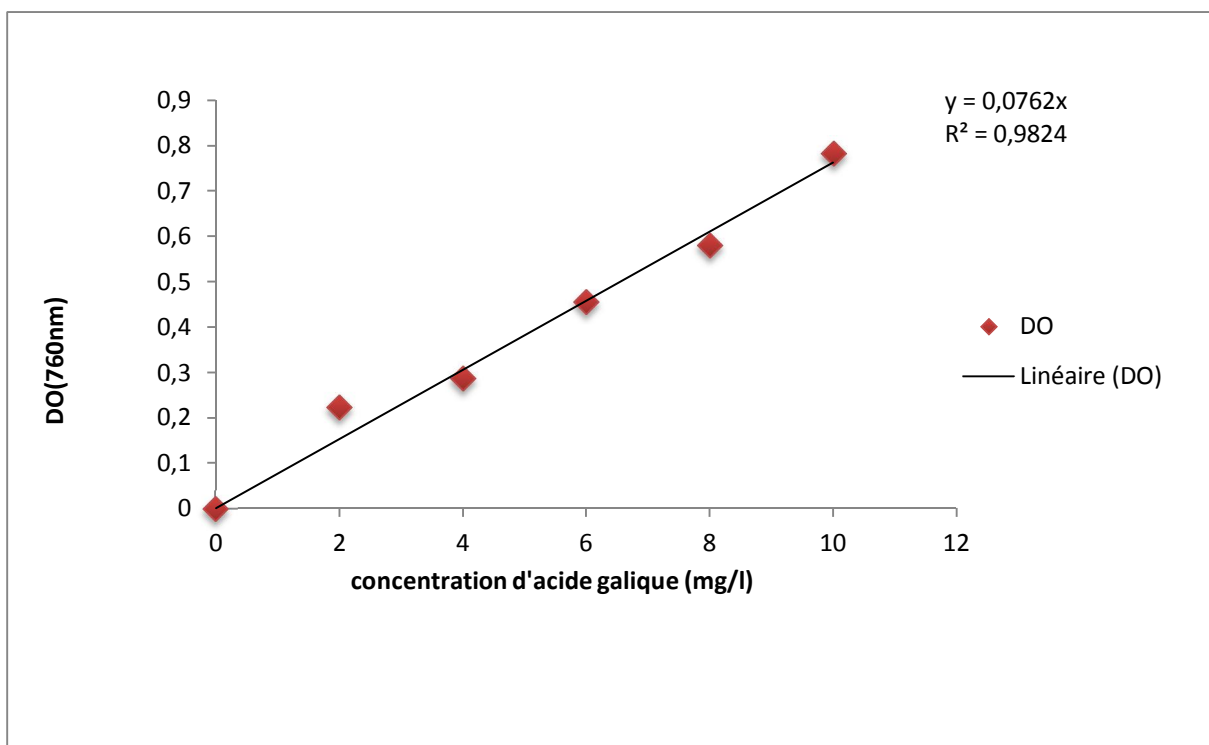


Figure 1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des PPT en équivalent d'acide gallique.

Listes des Annexes

Annexe 3 : Contrôle de la qualité des excipients

Avant de préparer (formuler) les pommades, le contrôle de la pureté et la qualité des matières premières utilisés dans la fabrication des pommades s'impose (British Pharmacopée vol I, II, III, IV) 2009.

❖ La vaseline

Dénomination commune internationale : *Vaseline officinale*

Composition : c'est un mélange d'hydrocarbures qu'on obtient par raffinage de diverses fractions lourdes du pétrole. Pour augmenter sa consistance, on peut y ajouter des petites quantités de paraffine.

Aspect : substance blanchâtre d'une consistance analogue à celle de l'axonge, translucide en couches minces et légèrement fluorescente quand elle est fondue, insipide (qui n'a aucune saveur), incolore et dégage une faible odeur lors du chauffage.

| Densité D° ₂₀ | Point de fusion | Solubilité | | | | L'acidité |
|-----------------------------|--------------------|-------------|-----------|----------|-----------------------------|-----------|
| Norme | | Chloroforme | Eau | Acétone | 0,5 partie de benzène | + |
| 0,830 à 0,9 | 38 à 50 | Soluble | Insoluble | Soluble | Soluble | |
| Valeur | | | | | | |
| 0,830 | 43 | conforme | conforme | conforme | conforme | |
| conforme | conforme | | | | | |

❖ Lanoline

Composition

Listes des Annexes

C'est une substance cireuse purifiée et anhydre obtenue à partir de la laine du mouton .elle peut contenir au maximum 200 parties par million de butylhydroxytoluène.

Aspect : substance jaune pâle de consistance onctueuse et d'odeur caractéristique fondue.

| Densité D^o₂₀ à 15°C | Solubilité | | | L'acidité | Point de fusion | Indice de réfraction |
|--|-------------------|-----------|-----------------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 0,932 à 0,945 | Chloroforme | Eau | 0,5 partie de benzène | + | 238°C | 1,478- 1,482 |
| 0,940 | Soluble | Insoluble | Soluble | | 240°C | 1,468 |
| Conforme | Conforme | Conforme | Conforme | Conforme | Conforme | Conforme |

❖ Huile d'amande

| Densité D^o₂₀ | Solubilité | | | Indice de réfraction |
|---|-------------------|-----------|----------|---------------------------------|
| 0,910 à 0,920 | Chloroforme | Eau | Éthanol | 1,461 à 1,473 |
| 0,912 | Soluble | Insoluble | Soluble | 1,462 |
| Conforme | Conforme | Conforme | Conforme | Conforme |

Annexe 4 : Analyse sensorielle des pommades élaborées

Date :

Lieu :

Analysé par :

Questionnaire

Cinq formulations de pommade ont été élaborées à base des saponines extraites à partir des feuilles de noyer et présentées à un panel d'analyse sensorielle de 10 personnes.

Dans le cadre d'une enquête pour le choix des meilleures formulations présentant de bonnes propriétés organoleptiques, merci de répondre à ce questionnaire.

- 1- Couleur : préciser la couleur.
- 2- Odeur : préciser l'arôme s'il y a une odeur caractéristique de la plante ou pas.
- 3- Texture : préciser la consistance des pommades.
- 4- Homogénéité : indiquer s'il y a présence des grumeaux à l'étalement. Si la quantité étalée reste épaisse sur la surface ou se propage sur la totalité de la surface.

Préparation des solutions



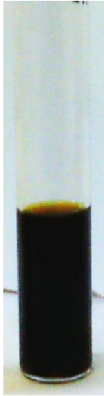



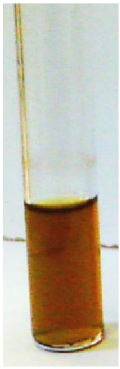



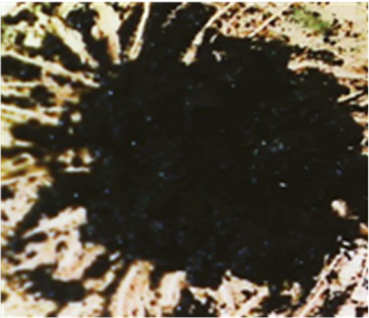
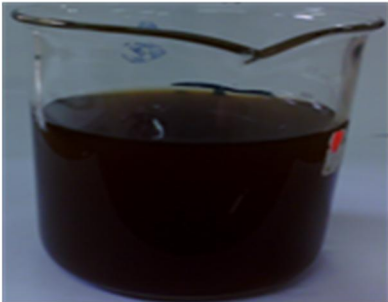
▪ De sulfate d'aluminium

La solution de sulfate d'aluminium est obtenue en dissolvant l'équivalent d'une mole Al^{+3} , d' $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18 H_2O$, soit une masse de 333,2 grammes par litre d'eau distillée.

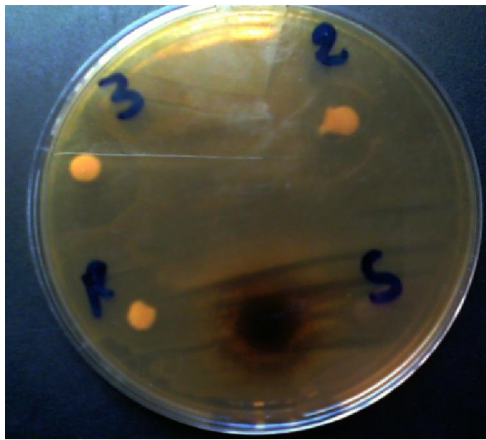
▪ De chlorure d'aluminium

La solution de chlorure d'aluminium est obtenue en dissolvant l'équivalent d'une mole Al^{+++} , d' $AlCl_3$, soit une masse de 333,48 grammes par litre d'eau distillée.

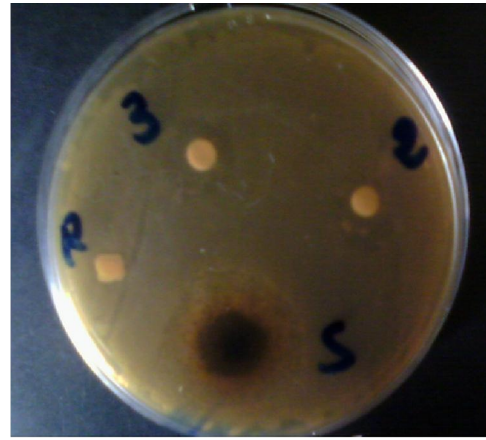
Annexe 5: Résultats du screening phytochimique

| | | | | |
|---|--|---|--|---|
| Sapon (S + T) | Tannins G Tannins | Alcaloïdes | flavonoïdes | Quinones libres |
|  |  |  |  |  |
| Anthocyanes | leuco-anthocyanes | Coumarines | sennosides | Quinones Combinés |
|  |  |  |  |  |
|  |  | | | |
| Glucosides | Infusé de poudre de noyer | | | |

Annexe 6 : les zones d'inhibition des différentes souches testées



S.aureus



E.coli

Figure 2 : zones d'inhibition des (F 2, F 3 et E S) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.



A.niger

Figure 3 : zones d'inhibitions des (F 2, F 3 et E S) vis-à-vis d'*Aspergillus niger*

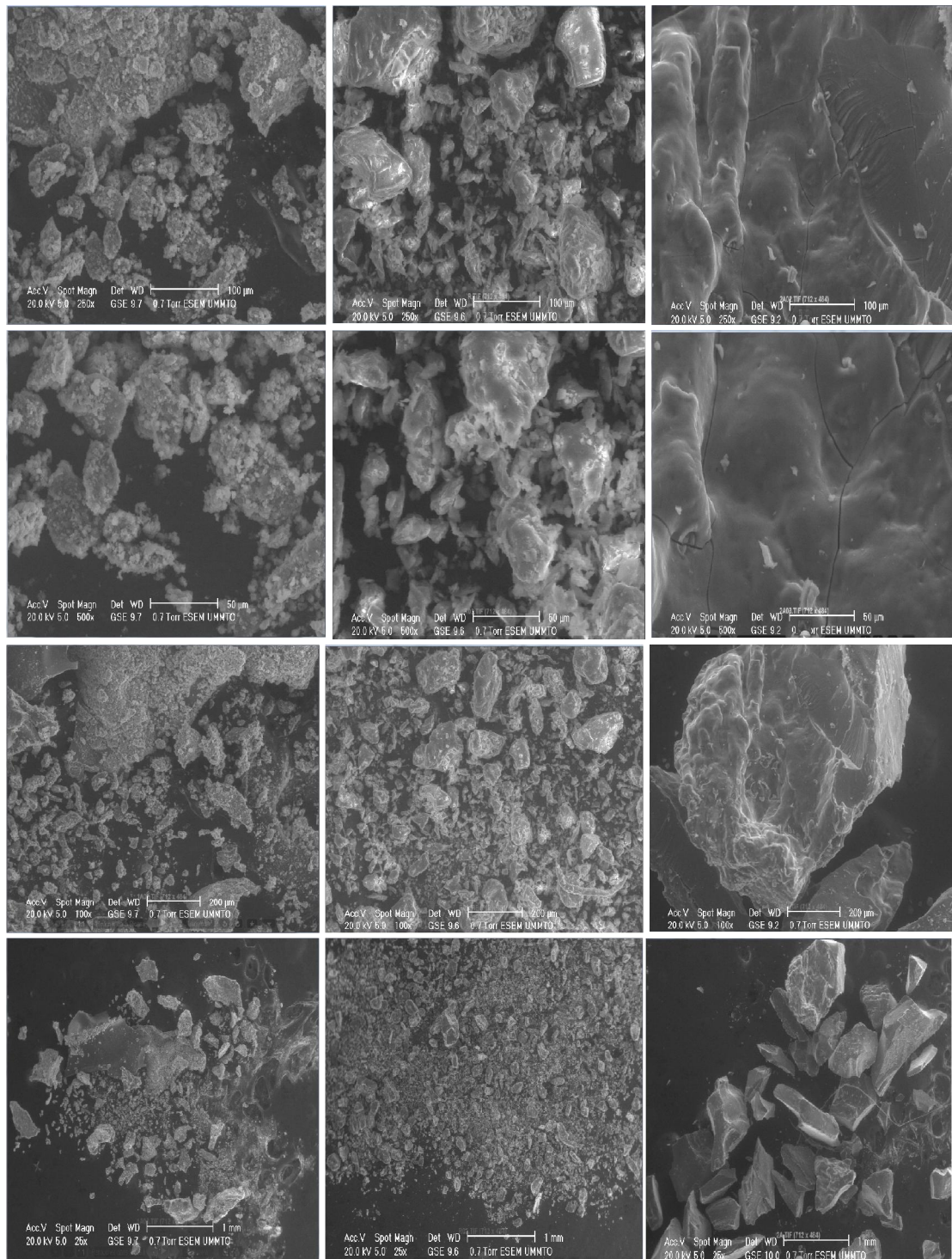
2: pommade F2.

3: pommade F3.

S: extrait de saponines.

R: disque de référence à DMSO.

Annexe 7 : Résultats du MEB



(P1)

(P2)

(P3)

Figure 4 : Structure des pectines sous le microscope électronique à balayage

P1 : pectines précipitées par le sulfate d'aluminium ; P2 : pectines commerciales

P3 : pectines précipitées par le chlorure d'aluminium

Listes des Annexes

Annexe 8

Tableau 1: Attribution des principales bandes observés sur les spectres IR pour les polysaccharides (WU *et al.*, 2007).

| Absorptions (cm ⁻¹) | Type de vibration | Attribution |
|------------------------------------|---|---------------------------------------|
| 3400 | v (O-H) | Polysaccharides et eau d'hydratation |
| 2850- 2920 | v(C-H) | Polysaccharides |
| 1735 | v(C=O) | Esters et acides uroniques |
| 1605- 1630 | v(C=O) | sel d'acide, vibration antisymétrique |
| 1400-1465 | d (CH ₂), v(COO) | polysaccharides |
| 1169-1149 | v(C-O-C), v(C-C) | polysaccharides |
| 1131-1121 | v(C-O-C), v(C-C) | |
| 1096 | v(C-O), cycle, v(C-C) | |
| 1044 | v(C-O), v(C-C) | |
| 985 | v(C-O), d(OH), vibrations du cycle | |
| 897 | d(CH) glycosidique (b), vibrations du cycle | |