

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

UNIVERSITE DE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :



MEMOIRE

Présenté pour obtenir le Grade de

MASTER

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par :

M^{me} HANIS Leila

M^{me} HEDIR Imane

Thème

**Extraction et caractérisation d'un tensioactif naturel : les
Saponines végétales**

Jury

M ^{me} Ayati. F	Maître de conférences B à l'UMMTO	Présidente
M ^{me} Kichou. N	Maître de conférences B à l'UMMTO	Examinatrice
M ^f Benchoulak. M	Maître assistant A à l'UMMTO	Examineur
M ^{lle} Touzouirt. S	Maître assistante A à l'UMMTO	Promotrice

Le 28 Septembre 2014

Dédicace

Nous dédions ce modeste travail en témoignage de notre gratitude et de notre profonde affection:

À nos chers parents,

Pour leur amour inconditionnel,

Pour nous avoir donné la vie, Pour avoir cru en nous quand nous-mêmes on y croyait plus, Pour nous avoir encouragées et soutenues à chaque fois que nous avons failli baisser les bras.

À nos très chères mères symbole grandiose de patience, de sacrifice et d'amour.

À nos papa ; Si aujourd'hui nous avons réussi c'est pour eux et grâce à eux, merci de nous avoir donné tant de forces et d'avoir été toujours là pour nous.

À nos frères et sœurs : Chacun en son nom

Pour leur amour et leur soutien

Pour avoir été à l'écoute à chaque fois que nous avons eu besoin,

Pour les rires et les larmes que nous avons partagés.

À toi très chère Ilyana

Remerciements

Nous tenons tout particulièrement à remercier notre promotrice mademoiselle TOUZOUIRT, maître assistante à l'université MOULOUD MAMMARI, pour son aide, son Soutien moral et ses précieux conseils tout au long de notre travail,

Nous remercions Mme AYATI, maître de conférence B. à l'université MOULOUD MAMMARI, qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider le jury,

Nous remercions les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de participer à ce jury,

On tient également à remercier très chaleureusement le personnel du laboratoire de chimie pharmaceutique et environnement et celui de chimie analytique de Mr. Kadi, professeur à l'université MOULOUD MAMMARI que nous tenons tout particulièrement à remercier pour nous avoir donné refuge au sein de son laboratoire de recherche, et Mr. MAMOÛ maître de conférence pour nous avoir permis de réaliser tous les tests analytiques et surtout de nous avoir donné de son précieux temps,

Pour finir nous exprimons nos vifs remerciements à tous nos professeurs qui nous ont orienté et transmis un savoir et également et surtout des valeurs dont Mme AYATI et Mme BELMAHDI, Melle CHIKH, et tous ceux ou celles qui ont participé de près ou de loin à ce modeste travail,

Résumé

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de composés hétérosidiques. L'extraction et la caractérisation d'un tensioactif issu du végétal dont la saponine a été l'objectif de notre étude. La mise en évidence de ces saponines a été menée sur trois plantes qui a démontré une importante concentration pour les fleurs de *Verbascum thapsus*, un rendement remarquable a été marqué par rapport aux autres espèces (indice de mousse important : I=500). L'extraction des saponines de *V.thapsus* par différentes méthodes a été réalisée dans le but d'améliorer le rendement d'extraction et de faciliter leur identification. Deux protocoles d'extraction ont été optimisés et deux extraits ont été obtenus : un extrait aqueux et un butanolique. Des tests chimiques ont été effectués par la suite sur ces extraits afin de prouver la présence et le type des saponines. L'utilisation des techniques chromatographiques (CCM et HPLC) ainsi que des techniques spectroscopiques (IR et UV-visible) nous a permis de connaître la composition qualitative des extraits aqueux et alcoolique. Deux composés saponosidiques ont été identifiés dont un correspond à l'escine et l'autre à la saponine commerciale "Saponin wei Brein erg B6 MERCK" qui a été utilisée comme témoin. L'effet hémolytique de l'EQ a été prouvé. Par ailleurs, aucune activité microbiologique n'a été signalée sur les trois souches testées.

Mots clefs : Saponine, *V.thapsus*, Tensioactif naturel, Extrait butanolique, Extrait aqueux.

Abstract

The natural extracts of plants contain a variety of heteroside compounds. The extraction and characterization of a surfactant from the plant including saponin was the aim of our study. The identification of these saponins was conducted on three plants that showed significant concentration for *Verbascum thapsus* flowers, outstanding performance was marked compared with other species (large foam index: I = 500). The extraction of *V.thapsus* saponins by various methods has been conducted to improve the extraction efficiency and ease of identification. Two extraction procedures were developed and two extracts were obtained: an aqueous extract and butanol extract. Chemical tests were carried out subsequently on these extracts to prove the presence and type of saponins. The use of chromatographic techniques (TLC and HPLC) and spectroscopic techniques (IR and UV-visible) allowed us to know the qualitative composition of the aqueous and alcoholic extracts. Two Saponins compounds were identified which corresponds to "escin" and commercial saponin "Saponin

wei Brein erg MERCK B6" which was used as a witness. The hemolytic effect of EQ has been proven. Furthermore, no microbiological activity was shown on the three tested strains.

Keywords: Saponin. *V.thapsus*, natural surfactant, butanol extract, aqueous extract.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les Saponines	1
I.1. GENERALITES SUR LES SAPONINES	1
I.1.1. Définition.....	1
I.1.2. Historique.....	1
I.1.3. Composition des saponosides.....	2
I.1.4. Classification des saponosides.....	4
I.1.5. Détection des saponosides.....	4
I.1.6. Propriétés des saponines.....	5
I.1.7. Emploi des saponines.....	6
II. VERBASCUM THAPSUS	6
II.1. PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE	7
II.1.1. Présentation du genre Verbascum.....	7
II.1.2. Présentation de l'espèce 'Verbascum thapsus L.....	8
II.1.2.1. Noms vernaculaires.....	8
II.1.2.2. Habitat et culture.....	8
II.1.2.3. Description botanique.....	8
II.1.2.4. Composition chimique.....	9
II.1.2.5. Utilisation traditionnelle.....	9
II.1.2.6. Activités biologique.....	9
II.1.2.7. Activité pharmacologique.....	10
II.2. Extraction et caractérisation des saponines de V. Thapsus	11

III. Les tensioactifs	13
III.1. Généralités sur les tensioactifs.....	13
III.1.1. Structure.....	13
III.1.2. Historique.....	14
III.1.3. Classification des tensioactifs.....	14
III.1.4. Propriétés des tensioactifs.....	17
III.1.4.1. Propriétés fondamentales.....	17
III.1.4.2. Propriétés pratiques et fonctions des tensioactifs.....	18
III.2. Tensioactifs synthétiques et naturels.....	19
III.2.1. Tensioactifs synthétiques.....	19
III.2.2. Tensioactifs naturels.....	20
III.2.2.1. Origines des tensioactifs naturels.....	20
III.2.2.2. Les avantages des tensioactifs naturels.....	22
III.2.2.3. Intérêt biologique de l'utilisation des tensioactifs naturels.....	23

PARTIE PRATIQUE

I. Matériels et méthodes	25
I.1. Matériel végétal.....	25
a) Origine géographique et période de récolte.....	25
b) Identification botanique.....	26
c) Traitement et préparation des échantillons.....	26
I.2. Matériels biologiques.....	27
I.3. Matériels du laboratoire.....	28
II. Méthodes d'identification et d'extraction	29
II.1. Mise en évidence des saponines.....	29
II.1.1. Détermination de l'indice de mousse.....	29
II.1.2. Choix de la plante.....	30
II.2. Extraction des saponines des fleurs de <i>V. Thapsus</i>	30
II.2.1. Protocole d'extraction n°1.....	30
II.2.1.1. Evaluation du rendement en saponines.....	32
II.2.1.2. Conservation.....	32
II.2.2. Protocole d'extraction n°2.....	32

III. Caractérisation des extraits obtenus.....	35
III.1. Tests d'identification chimique.....	35
III.1.1. Tests sur l'extrait aqueux.....	35
III.1.2. Tests sur les extraits alcooliques.....	35
III.2. Techniques d'analyses.....	36
III.2.1. Techniques spectrophotométriques.....	36
III.2.2. Techniques chromatographiques.....	37
III.3. Etude de l'activité biologique.....	40
III.3.1. Test hémolytique.....	40
III.3.2. Tests antibactériens et antifongiques.....	41

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Résultats de la mise en évidence des saponines.....	43
I.1 Détermination des indices de mousse.....	43
I.2. Choix de la plante.....	45
II. Résultats de l'extraction des saponines.....	45
II.1. Protocole d'extraction n°1.....	45
II.2. Protocole d'extraction n°2.....	49
III. Résultats de caractérisation des saponines.....	50
III.1. Résultats des tests d'identification chimiques.....	50
III.1.2. Tests sur l'extrait butanolique.....	51
III.1.3. Tests sur l'extrait chloroformique.....	51
III.2. Résultats des techniques d'analyse.....	52
III.2.1. Résultats des techniques spectroscopique.....	52
III.2.2. Résultat des techniques chromatographiques.....	61
III.3. Résultats de l'activité biologique.....	70
III.3.1. test hémolytique.....	70
III.3.2. Test microbiologique.....	71
Conclusion générale.....	73
Références Bibliographiques	
Glossaire	
Annex	

Liste des figures

Figure (1) : Schéma de composition des saponines.....	2
Figure (2) : Représentation de la spirostane (C) et de la furostane (D).....	3
Figure (3) : Images correspondants à <i>Verbascum Thapsus</i> L.....	7
Figure (4) : Représentation schématique d'un tensioactif.....	14
Figure (5) : Comportement des tensioactifs en milieu aqueux – Phénomène.....	17
Figure (6) : Voie de synthèse des tensioactifs synthétiques.....	19
Figure (7) : <i>Pistacia lentiscus</i> (a), <i>Rosmarinus officinallis</i> (b), <i>Verbascum Thapsus</i> L (c)...	26
Figures (8) : Séchage des fleurs de <i>Verbascum Thapsus</i> à l'aire libre.....	27
Figure (9) : L'évaporateur rotatif.....	31
Figure (10) : Schéma général d'extraction des saponosides (protocole N°2).....	33
Figure (11) : Solution concentrée au Rotavapor.....	34
Figure (12) : Décantation de la solution après ajout du chloroforme.....	34
Figure (13) : Gradient d'analyse des saponines de <i>V. Thapsus</i>	39
Figure (14) : Schéma du test hémolytique.	40
Figure (15) : Agitation magnétique du mélange.....	41
Figure (16) : Incubation des boîtes de pétrie à 37°C.....	42
Figure (17) : Résultat du test d'indice de mousse des fleurs de <i>V. Thapsus</i>	43
Figure (18) : Etape de la simple filtration.....	46
Figure (19) : Etape de la filtration sous vide.....	47
Figure (20) : Résultat de l'évaporation au Rotavapor.....	48
Figure (21) : Résultat du 1 ^{er} procédé du protocole d'extraction n°2.....	49
Figure (22) : Résultat du test d'identification sur l'extrait aqueux du second protocole.....	50
Figure (23) : Résultat du test d'identification de l'extrait BuOH.	51
Figure (24) : Résultats des tests d'identification sur les extraits chloroformiques.....	51
Figure (25) : Résultat de la caractérisation des flavonoïdes.....	52
Figure (26) : spectre d'absorption en UV-visible de la saponine témoin.....	53
Figure (27) : spectre d'absorption en UV-visible de l'extrait aqueux.	53
Figure (28) : Spectre UV-Visible de l'extrait butanolique.....	54

Figure (29) : Spectre infrarouge de la poudre de saponine obtenue.....	55
Figure (30) : Spectre infrarouge de l'extrait butanolique des saponines.....	57
Figure (31) : Spectre infrarouge de l'extrait aqueux des saponines.....	58
Figure (32) : Spectre infrarouge des EQ, EB, et la poudre des saponines.....	60
Figure (33) : Structure chimique générale des saponines triterpéniques et stéroïdiennes.....	61
Figure (34) : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des EB de <i>V. Thapsus</i>	62
Figure (35) : Plaque CCM des saponines prises comme références.....	63
Figure (36): Chromatogrammes des extraits aqueux à 203nm et 210nm.....	65
Figure (37) : Chromatogrammes des extraits butanoliques à 203 nm et 210nm	66
Figure (38) : Chromatogrammes de la saponine témoin à 203 nm et 210nm.....	67
Figure (39) : Comparaison entre les échantillons et le témoin à 203nm.....	68
Figure (40) : Comparaison entre les échantillons et le témoin à 210 nm.....	69
Figure (41) : Résultat sur l'activité hémolytique des saponines dans l'extrait aqueux.....	70
Figure (42) : Images correspondants aux boîtes de pétris de l'activité antimicrobienne de l'EQ sur les bactéries utilisées.....	71

Liste des tableaux

Tableau (1) : Récapitulatif des différents types de tensioactifs et leurs applications.....	16
Tableau (2) : Exemple de tensioactif issu de ressources végétales.....	21
Tableau (3) : Tensioactifs naturels rapportés dans la littérature.....	22
Tableau(4) : Récapitulatif du matériel utilisé lors de la pratique.....	28
Tableau (5) : Valeurs des hauteurs de mousse des feuilles et des fleurs de <i>V. Thapsus</i>	43
Tableau (6) : Valeurs des hauteurs de mousse des feuilles de <i>P. Lentiscus</i>	44
Tableau(7) : Valeurs des hauteurs de mousse des feuilles et des fleurs de <i>R. Officinallis</i>	44
Tableau (8) : Indice de mousse des feuilles et des fleurs de <i>V. Thapsus</i> et de <i>R. Officinallis</i> , et des feuilles de <i>P. Lentiscus</i>	45
Tableau (9) : Résultats des tests chimiques sur l'extrait aqueux des fleurs de <i>V.thapsus</i>	50
Tableau (10) : Bandes IR observées dans le spectre de la poudre de la saponine.....	55
Tableau (11) : Bandes IR observées dans le spectre de l'extrait butanolique de la saponine.....	57
Tableau (12) : Bandes IR observées dans le spectre de l'extrait aqueux de la saponine.....	59
Tableau (13) : Résultat de la CCM des extraits butanolique (Eluant : DCM/CH ₃ COOH glacial/MeOH/ H ₂ O (64:32:12:8)).....	62

Liste d'abréviations

ml : millilitre

cm : centimètre

min : minute

h : heure

I : indice de mousse

nm : nanomètre

TA : tensioactif

BTA : biotensioactif

IR : infrarouge.

UV : ultra-violet

Rf : facteur de rétention ou rapport frontal

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

CCM : chromatographie sur couche mince

Tr : temps de rétention

EQ : extrait aqueux

EB : extrait butanolique

HCl : acide chlorhydrique

BuOH : butanol

MeOH : méthanol.

EtOH : éthanol.

H₂O : eau distillée.

CCl₄: tétrachlorure de carbone.

NaOH : hydroxyde de sodium.

NaCl : Chlorure de sodium.

H₂SO₄ : acide sulfurique.

DCM : dichlorométhane.

CH₃COOH : acide acétique.

Introduction

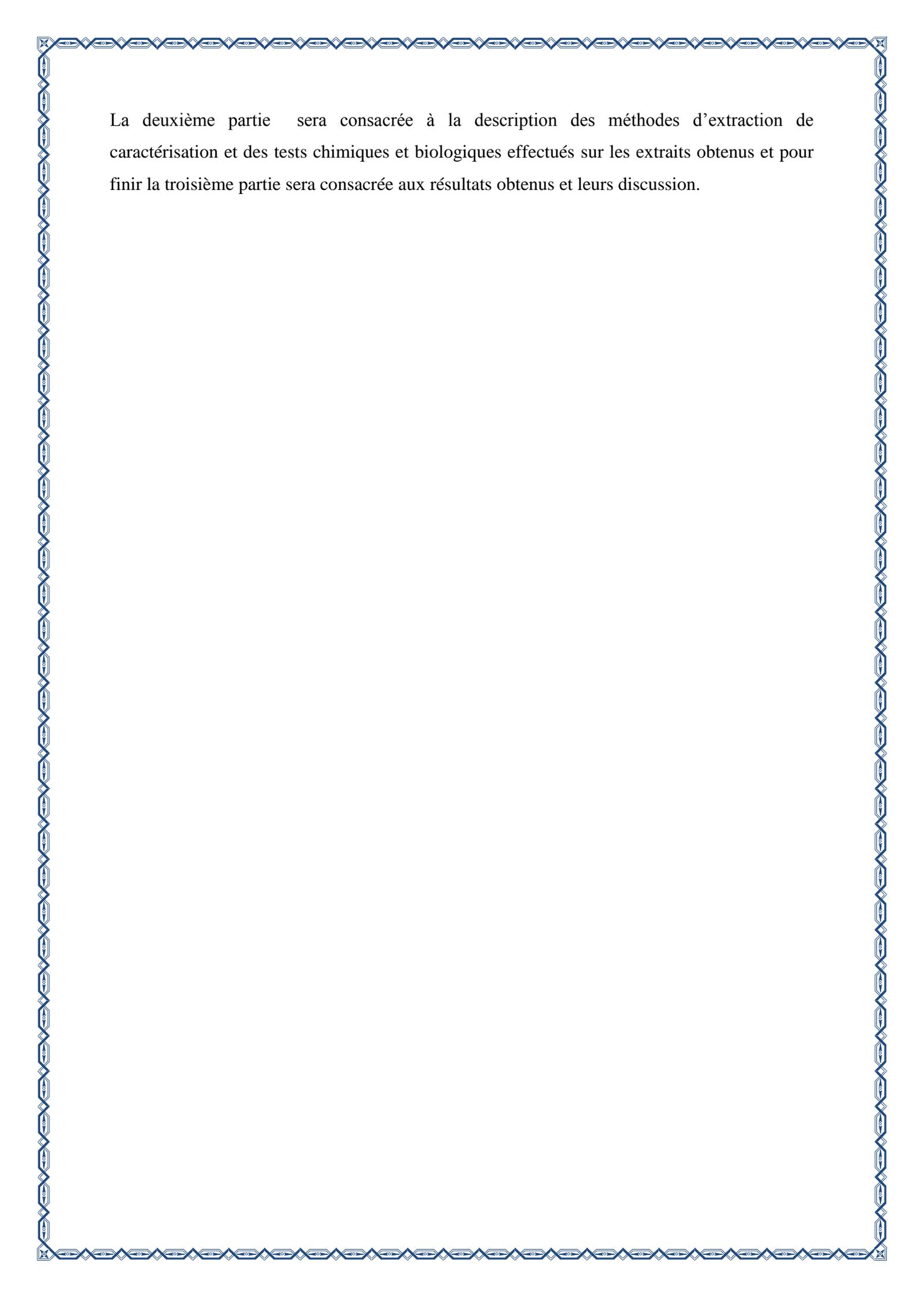
L'Algérie, de part sa position géographique, présente une importante gamme d'étages bioclimatiques, induisant une large biodiversité de plantes, celles-ci représente une véritable usine chimique qui ne cesse de nous épater encore et encore par la richesse des constituants qu'elles synthétisent.

La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires cosmétiques et pharmaceutiques sont toujours prêts à l'élaboration de nouveaux composés actifs, à l'identification ainsi qu'à la caractérisation des molécules naturelles et à la mise au point de médicament ou autre substance thérapeutique qui ont pour origine des substances naturelles. Ces molécules que constitue le principe actif des plantes médicinales appartiennent majoritairement aux métabolites secondaires tels que les polyphénols, les huiles essentiels et les saponines.

Malgré cela, l'industrie chimique est aujourd'hui toujours fortement dépendante des ressources fossiles, dont elle tire la plupart de ses produits dont les tensioactifs qui sont à 75-80% issus à de la pétrochimie. Ces molécules sont très utilisées pour stabiliser les émulsions ainsi que pour solubiliser les principes actifs hydrophobes pour lesquels la dissolution est l'étape limitante. Cependant La raréfaction de ses ressources, la variabilité de leurs couts et les enjeux environnementaux associés à la toxicité de ces molécules après dégradation imposent de trouver des matières premières de substitution renouvelables parmi lesquelles figurent prioritairement les plantes.

Tout ceci afin d'expliquer nos motivation quant à l'extraction d'un tensioactif issu du végétal dont la saponine de l'espèce V, Thapsus qui en plus d'être un tensioactif naturel, présente des propriétés anti-inflammatoires, antalgiques, antibactériens et antitumorales qui peuvent être exploitées.

Dans la première partie de notre travaille, nous aborderons des généralités sur les saponines ainsi que leur utilisation dans différents domaines. Puis nous étudierons l'aspect botanique de la plante étudiée, avec notamment, sa description et sa répartition géographique, son utilisation en médecine traditionnelle, et son activité biologique. Par la suite on présentera les tensioactifs, leur classification, leurs propriétés et leur utilisation.



La deuxième partie sera consacrée à la description des méthodes d'extraction de caractérisation et des tests chimiques et biologiques effectués sur les extraits obtenus et pour finir la troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus et leurs discussion.

A decorative border in blue ink, consisting of a repeating geometric pattern of diamonds and lines, framing the entire page.

Synthèse bibliographique

I. Les Saponines

I.1. GENERALITES SUR LES SAPONINES

I.1.1. Définition

Le nom saponine ou saponoside dérive du mot latin *sapo* qui veut dire « savon ». Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques, fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés également par certains animaux marins tels que les étoiles de mer [1].

Ces composés ont la particularité de former, par agitation avec de l'eau, des mousses stables tout comme les savons qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile et hydrophile [2].

Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques [1].

Doués de propriétés mouillantes, détergentes, solubilisantes, dispersantes, émulsionnantes et généralement moussantes, ces « tensioactifs naturels » représentent les constituants principaux de plusieurs produits pharmaceutiques et cosmétiques, c'est le cas par exemple de la glycyrrhizine et de l'escine [3].

I.1.2. Historique

De part leurs propriétés médicinales et cosmétiques, les saponines devinrent plus connues à partir de 1927 après la publication du livre « Die saponin » de KOFLER. Celui-ci décrit les plantes produisant des saponines employées dans la médecine populaire chinoise. Ces molécules furent d'abord définies par leurs propriétés tensioactives. La plupart d'entre elles présente une amertume et un fort pouvoir hémolytique. Ce n'est qu'en 1944, grâce à ses

quelques propriétés (bien que pas toujours communes à toutes les saponines), qu'elles ont pu être isolées et décrites [4].

I.1.3. Composition des saponosides

Les saponosides sont des glycosides à poids moléculaire élevé (600 à 2000 Daltons), elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe communément appelée génine liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile (figure 1) [3]. Les différents hydroxyles de ces molécules, que ce soit au niveau de la génine ou de la partie osidique peuvent aussi être estérifiés par les acides organiques [5].

Le grand nombre de structures décrites dérive d'un nombre réduit de génines. La variabilité des structures est essentiellement due aux nombreuses combinaisons possibles des unités osidiques, acylées ou non.

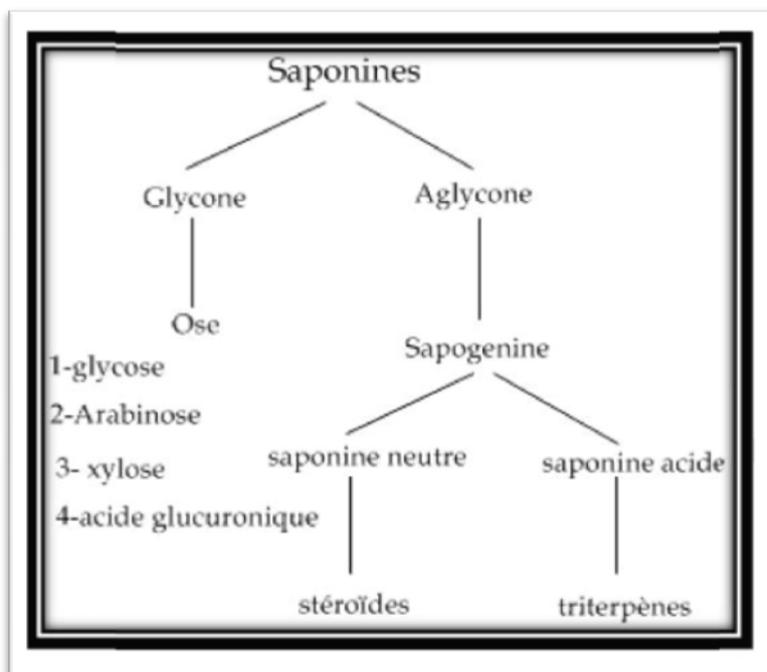


Figure (1) :Schéma de la composition des saponines.

a) Partie aglycone

Les génines (ou sapogénines) forment la partie aglycone des saponines, molécules amphiphiles bien connues pour leurs propriétés détergentes, cette partie peut être un triterpène ou un stérol. Certains auteurs distinguent une troisième catégorie, les génines aminées stéroïdiques qui sont traitées par d'autres comme des alcaloïdes stéroïdiques[6].

➤ Les génines triterpéniques

Les triterpènes, 4000 composés construits sur plus de 40 squelettes différents, sont une classe de métabolites secondaires, des composés en C30 issus de la cyclisation du dihydrosqualène ou, plus rarement du squalène lui-même. Presque toujours hydroxylés en 3, les triterpènes présentent une très forte unité structurale.

Les sapogénines triterpéniques sont de loin les plus nombreuses des molécules pentacycliques, les oléananes et les ursanes étant les deux squelettes les plus communs [7].

➤ Les génines stéroïdiques

Les génines stéroïdiques sont des composés neutres[3] et possèdent toutes un squelette à 27 atomes de carbone qui comportent habituellement six cycles. Compte tenu de la nature spiro du carbone C-22, on désigne couramment ce squelette hexacyclique par le terme de spirostane (figure C). Dans les plantes fraîches, il n'est pas rare que l'hydroxyle en C-26 soit engagé dans une liaison avec un ose, la structure restant alors pentacyclique : on parle dans ce cas de furostane (figure 2) [7].

Leur structure chimique est similaire à celle de nombreuses hormones humaines et dérive exclusivement de la structure du stérane[8]. Ces sapogénines possèdent toujours une fonction alcool secondaire en 3, susceptible de former une liaison hémiacétalique avec un ose ou un oside[7].

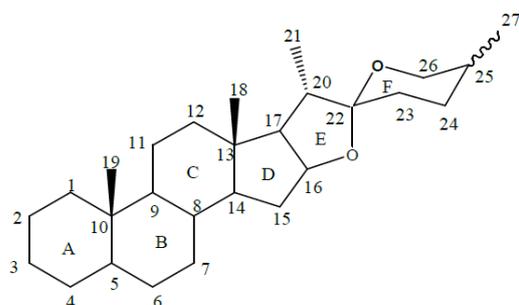


Figure C: Spirostane

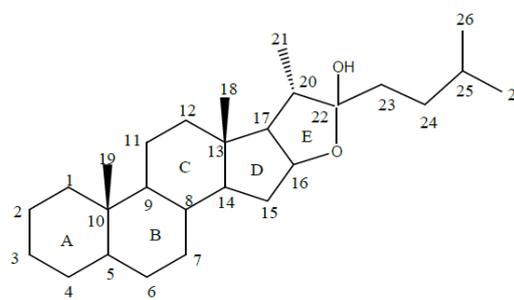


Figure D: Furostane

Figure (2) : Représentation de la spirostane (C) et de la furostane (D).

b) Partie osidique

Les unités saccharides qui constituent les saponines sont communes, parmi elles on distingue ; leD-glucose, D-galactose, Larabinose, L-rhamnose, D-xylose, D-fucose et acide D-glucuronique chez les saponines triterpéniques. Les chaînes oligosiques, linéaires ou ramifiées, comportent jusqu'à une dizaine d'oses qui constituent la partie sucrée de

l'hétéroside. Elles peuvent être liées à la génine par une liaison de type O-hétéroside ou par une liaison de type ester [9].

I.1.4. Classification des saponosides

Les saponosides sont classés en deux groupes selon la nature de leur génine qui peut être soit triterpéniques, soit stéroïdiques.

1° Les saponines stéroïdiques

Ce sont des saponines à génines stéroïdiques, ils sont connus presque sans exception. Ces saponines sont surtout présentes chez les Monocotylédones dont les Liliaceae et Dioscoraceae et dérivent du noyau spirostane utilisés pour l'hémisynthèse des corticoïdes[8].

2° Saponines triterpéniques

Ce sont des saponines à génines triterpènes, la grande majorité des saponines végétales appartiennent à ce groupe ; elles sont principalement présentes chez les angiospermesdicotylédones et quelques organismes marins [8]. Les saponosides triterpéniques sont également des composants majoritaires des plantes Scrophulariaceae en général et le genre Verbascum en particulier, qui fait l'objet de notre étude.

I.1.5. Détection des saponosides

La première indication de la présence de saponines dans les extraits végétaux et/ou fractions brutes de saponines peut être obtenue à l'aide de différents tests :

➤ Détermination de l'indice de mousse

La mise en évidence des saponosides est basée sur leurs propriétés tensio-actives dues à leur caractère amphotère. Leur présence est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées [9].

➤ Les réactions générales de détection des saponosides

Les saponosides donnent un certain nombre de réactions colorées, non spécifiques, mais fort utilisées pour leur mise en évidence, signalons la réaction de Libermann Burchardt. Ces réaction sont données comme suite ;

- l'acide sulfurique concentré dissout les saponosides et se colore successivement en jaune, rouge, bleu vert ou bleu violet.
- Observation sous UV à 254 et 366 nm, donne des taches de diverses couleurs (bleu, bleu-violet, rouge) avec la vanilline sulfurique comme réactif.

Dans l'industrie, plusieurs méthodes de dosages sont utilisées, notamment, une gravimétrie réalisée par précipitation des sapogénines après hydrolyse et pesée du résidu [10].

I.1.6. Propriétés des saponines

❖ Les propriétés physico-chimiques

Les saponosides possèdent un ensemble de propriétés physico-chimiques qui facilitent leur caractérisation, éventuellement, le pouvoir aphrogène, l'action hémolytique et la saveur âcre. Ils se trouvent généralement sous forme de poudre blanche non cristallisée et sont solubles dans l'eau et les solvants organiques polaires comme les alcools dilués [11]. Ils sont pratiquement insolubles dans les solvants organiques apolaires comme l'acétone, l'éther et l'hexane. Ces composés existent dans la plante sous forme d'un mélange complexe de molécules de structures très proches et de propriétés physicochimiques similaires. De ce fait, les étapes de purification sont délicates et longues, nécessitant plusieurs techniques chromatographiques. Leur point de fusion est compris entre 200°C et 300°C [12].

Agités dans leur solution aqueuse, ils fournissent une mousse persistante et abondante. Les saponosides donnent des solutions aqueuses à allure colloïdale qui dialysent très mal et ont un fort pouvoir émulsionnant.

Ces substances présentent soit une réaction acide soit une réaction neutre. Elles sont précipitées de leur solution aqueuse par de nombreux sels tels que: $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, acétate de plomb, hydroxyde de baryum, etc.

❖ Les propriétés biologiques

Reconnues pour avoir un fort potentiel pharmacologique, les saponines ont été intensivement étudiées au cours des dernières années. La communauté scientifique a démontré un intérêt marqué envers cette classe de métabolites secondaires afin d'accélérer le processus lié à leur développement biopharmaceutique. En effet, les saponines exercent des activités biologiques très variées telles que: activité expectorante, anti-inflammatoire, anti-

tumorale, chimio-préventive, antidiabétique, analgésique ainsi que des effets hépato-protecteurs, neuro-protecteurs, antituberculeux ou encore anti-thrombiques [1,13].

Les saponines triterpéniques sont considérées par certains chercheurs comme étant responsables de la plupart des activités biologiques des plantes de la médecine traditionnelle orientale. Elles possèdent en particulier des propriétés antibactériennes, antivirales, antifongiques, cardiovasculaires, cytotoxiques, immunomodulatoire, spermicide et molluscicide [14].

Des propriétés immunoadjuvantes et immunostimulantes ont été mises en évidence dans le cas de certains saponosides et qui pourraient être utilisées dans la formulation de nouveaux vaccins [15].

I.1.7. Emploi des saponines

Les saponines ont des propriétés tensioactives et biologiques importantes et sont utilisés dans des domaines variés tels que l'industrie, la pharmacie et la cosmétologie, et sont employées dans de nombreux produits commerciaux.

- Les saponines sont connues par leur utilisation dans l'industrie comme des détergents ou des émulsifiants. Elles entrent dans la formulation de nombreux produits tels que les shampoings, des détergents ou encore des sodas.
- Elles sont utilisées dans des vaccins à usage vétérinaire et humain sous forme de complexes immunostimulants.
- Elles sont également utilisées pour leurs propriétés surfactantes afin de diminuer la tension de surface d'électrolytes employés pour extraire le cuivre.
- Ces même saponosides sont utilisés comme agent hémolytique pour effectuer des numérations leucocytaires [3,16].

-Les sapogénines stéroïdes sont utilisés dans la semi synthèse des corticoïdes et les hormones sexuelles, nous avons comme exemple la Diosgénine, aglycone (isolée notamment d'espèces mexicaines de *Dioscorea*), a pris une grande importance industrielle pour l'hémisynthèse de la progestérone et de la cortisone [6].

II. VERBASCUM THAPSUS

II.1. PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE

Famille ; Scrophulariaceae.

Nom latin ; *Verbascum thapsus* L.



Figure (3) : Images correspondants à la plante *Verbascum Thapsus* L.

II.1.1.Présentation du genre *Verbascum*

Mieux connues sous les noms « Molène » ou « Bouillon », généralement additionnés d'un adjectif (noire, blanc, ...), les espèces du genre *verbascum* font partie de la famille scrofulariacée. Ce genre compte plus de 360 espèces et de nombreux hybrides, ce qui complique leur identification précise. Parmi les espèces les plus connues on distingue ; *Verbascum thapsus*[17].

Outre *V. Thapsus*, plus de 250 espèces de genre *Verbascum* sont classées dans la systématique et des dizaines d'entreelles ont subis des investigations chimiques et biologiques.

II.1.2. Présentation de l'espèce 'Verbascum thapsus L

II.1.2.1. Noms vernaculaires

Aussi nommé Bonhomme, Cierge de Notre-Dame, Fleur de Grand Chandelier. Sous le nom commun de « bouillon-blanc » [18],3 ou 4 espèces de Verbascum sont souvent confondues, ce qui ne porte pas à conséquence, car les propriétés sont les mêmes. En ce qui concerne le nom scientifique « Verbascum » on trouve dans la littérature plusieurs explications, certains scientifiques pensent qu'il viendrait du mot verbascus, il s'agirait en fait, du nom donné par les Grecs et les Romains à leurs mèches utilisées pour l'éclairage. Pour d'autres scientifiques ; son étymologie serait inconnue ou cela proviendrait de barbascum, barbu (barba : barbe), à cause de l'aspect des filets staminaux [19,20].

Quant à l'appellation Bouillon blanc cela vient du mot : bouillon, car les fleurs s'emploient en infusion pectoral.

II.1.2.2. Habitat et culture

Plante méditerranéenne, importée en Algérie et en Amérique, elle est très commune dans le Tell algérien. Celle-ci est originaire d'Europe centrale et méridionale et d'Asie occidentale. Elle se développe dans les champs et les pelouses, sur les terres en friche, au bord des chemins, dans les jardins et sur les sols arides [19,21].

II.1.2.3. Description botanique

C'est une plante herbacée bisannuelle, dont la hampe florale dépasse un mètre de hauteur, et pouvant aller jusqu'à 2 mètres pour certaines. Les feuilles sont lancéolées, crénelées, vertes-blanchâtres et très velues ; elles peuvent atteindre 40 cm de longueur. Le bord est entier ou légèrement denté. Les fleurs, visibles de juin à novembre ailleurs, mars pour notre région, presque sessiles, forment des glomérules groupés en longues grappes ressemblants à des épis. Chacune comprend un calice peu irrégulier, à 5 divisions lancéolées, et une corolle jaune souvent de grande taille, dont le tube très court s'étale en une roue de 5 pétales inégaux. Sur les 5 étamines, les trois supérieures sont les plus courtes avec un filet fortement velu. Les fruits sont des capsules ovoïdes s'ouvrant en deux parties, à maturité libérant des graines rugueuses [18,22]

II.1.2.4. Composition chimique

❖ Les fleurs

La fleur renferme des polyphénols : flavonoïdes (2 à 4 %), des acides phénols surtout sous la forme d'esters osidiques de l'acide caféique : verbascoside (également appelé actéoside), des saponosides, des acides gras et des caroténoïdes.

La teneur en mucilage est d'environ 3% : l'hydrolyse de ce mélange de polysaccharides fournit majoritairement du galactose, de l'arabinose, du glucose et des acides uroniques. On note aussi la présence d'iridoïdes : harpagoside, aucuboside, et des lignanes hétérosidiques. La fleur renferme un pigment, un phyto-stérol (verbastérol) [7].

❖ Plante entière

Dans la plante entière on trouve aussi des saponosides triterpéniques surtout dans les graines, des stérols et des stérones, des iridoïdes. Tous les organes renferment des esters osidiques de l'acide caféique : verbascoside, un acide phénol et le poliumoside [21].

II.1.2.5. Utilisation traditionnelle

Le bouillon blanc est utilisé traditionnellement comme antalgique dans les affections de la cavité buccale et ou du pharynx. C'est également un remède spécifique des trachéites et des bronchites et soigne la toux. Préparée en infusion, les feuilles et les fleurs réduisent la formation de mucosités bronchiques et favorisent leur évacuation. La fleur et ses préparations sont traditionnellement utilisées dans le traitement symptomatique des pathologies inflammatoires ORL. Cette plante s'associe bien avec d'autres expectorants [21].

En Allemagne, le bouillon blanc est utilisé en macérant les fleurs dans l'huile d'olive, le produit qui en résulte sert de remède contre les infections auriculaires et les hémorroïdes [19,23].

II.1.2.6. Activités biologique

La plante *Verbascum thapsus*, soumise à des études biologiques, a montré des activités antibactérienne, anti-tumorale et inhibitrice de la germination des graines. Les tests ont porté sur les extraits alcoolique et aqueux, ainsi que les saponines isolées. Ces dernières ont présenté une activité antibactérienne sur 6 types de bactéries à gram positif et négatif [5].

L'utilisation des produits végétaux pour la gestion des maladies des plantes, en agriculture, ont atteint une plus grande importance durant ces dernières années en raison de leur grande disponibilité naturelle, leur activité antimicrobienne, facilité de biodégradabilité ainsi que leurs faible phytotoxicité, outre induire une résistance à l'hôte. Dans une autre étude V. thapsus a démontré une grande activité antifongique et de faibles propriétés phyto-toxiques sur les semences de blé [24].

L'extrait méthanolique des feuilles de cette plante s'est également révélé actif sur les virus herpès de type 1 [5].

II.1.2.7. Activité pharmacologique

❖ Anti-inflammatoire

Ce sont les fleurs qui ont un intérêt thérapeutique, comme anti-inflammatoire léger au niveau respiratoire et intestinal grâce aux mucilages. L'harpagoside possède des propriétés anti-inflammatoires.

L'actéoside (verbascoside) est un inhibiteur de la lipoxgénase des leucocytes : à la concentration de 2.93 μM il diminue de 50% la formation du LTB₄, un leucotriène directement impliqué dans les réactions inflammatoires et allergiques.

❖ Antibactérien et antifongique

L'aucuboside et les composés apparentés sont antimicrobiens. Les esters complexes de l'acide caféique suscitent aussi un intérêt grandissant : activité antibactérienne et antifongique. Un extrait aqueux de bouillon blanc montre une activité antibactérienne sur *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Escherichia coli* [20].

❖ Activité anti tumorale et anti cancéreuse

Le *V. Thapsus* avec ses composés ont des actions sur des ribosomes chez les rats [17].

II.2. Extraction et caractérisation des saponines de *V. Thapsus*

Le regain d'intérêt pour les plantes médicinales et produits alimentaires combiné à la spectaculaire évolution des outils d'analyse a débouché sur plusieurs publications concernant l'isolement et la caractérisation de nombreuses nouvelles saponines. Des méthodes modernes concernant la séparation et l'analyse des saponines ont été publiées [8].

a. Extraction et purification

Pour extraire un saponoside, on traitera la plante fraîche, humide ou séchée, par l'alcool dilué bouillant ce qui aura également pour avantage d'annihiler l'action des ferments qui, au cours de l'extraction, pourraient détruire les principes recherchés. On filtre, puis concentre. Dans bien des cas, on observera alors la séparation des saponosides sous forme plus ou moins pure.

On pourra aussi accélérer la séparation par adjonction d'éther. La purification du saponoside brut ainsi obtenu est un problème difficile pour lequel on ne peut malheureusement pas donner de règle générale [25].

b. Caractérisation

➤ Les techniques chromatographiques

La séparation d'un mélange de saponines en différents composants est une tâche difficile qui nécessite l'application combinée de plusieurs techniques chromatographiques. La chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) sont souvent utilisées pour les analyses qualitatives de routine [8].

➤ Les techniques spectroscopiques

Les méthodes spectroscopiques sont surtout employées pour l'identification qualitative ou la caractérisation de composés inconnus (saponines) après séparation et purification par d'autres méthodes comme la chromatographie.

En spectroscopie UV-visible, le cycle benzénique se caractérise par trois bandes intenses d'absorption. Les longueurs d'onde de ces bandes dépendent de la nature du substituant et du solvant.

La spectroscopie infrarouge est liée à la vibration des liaisons qui composent la molécule dont la structure détermine des fréquences spécifiques. Un solvant non aqueux est

généralement exigé vu la grande absorption de l'eau. On utilise généralement le chloroforme comme solvant [26].

III. Les tensioactifs

III.1. Généralités sur les tensioactifs

Les tensioactifs ou surfactants sont des composés organiques amphiphiles comportant des domaines polaires et apolaires, bien distincts, présentant une solubilité marquée dans l'eau. De telles molécules sont dites « actives » à la surface car elles conditionnent la tension de surface d'une solution, elles sont capables de réduire la tension interfaciale de mélanges (ex, huile et eau) en s'adsorbant aux interfaces [27,28].

Les tensioactifs qui peuvent être d'origine naturelle ou synthétique ont fait l'objet de nombreuses études fondamentales et appliquées. Ces composés ont une grande variété d'applications dont la plus connue est la détergence. On les retrouve dans de nombreux secteurs. Ainsi, la cosmétologie et l'hygiène corporelle représentent 10% de la production de tensioactifs. Par ailleurs, 40% des besoins sont liés au développement de secteurs industriels aussi variés que l'industrie textile, le raffinage du pétrole, les industries métallurgiques et minières, etc. ils sont également utilisés en agrochimie et en pharmacologie. Des applications aussi diverses nécessitent une grande variété d'agents de surface. La nature et la structure des tensioactifs sont donc modulées en fonction de l'application visée[28].

III.1.1. Structure

Ces molécules sont des substances amphiphiles, c'est-à-dire qu'elles possèdent une structure moléculaire spéciale : d'une part une chaîne à caractère lipophile présentant une affinité pour les huiles et d'autre part, un groupement hydrophile dit tête polaire présentant une affinité pour l'eau (figure 4) (2). C'est l'antagonisme de cette structure qui leur confère leurs propriétés particulières[29].

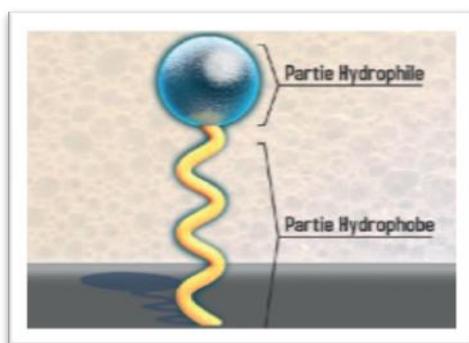


Figure (4) :
Représentation
schématique d'un
tensioactif.

La queue hydrophobe correspond généralement à une longue chaîne hydrocarbonée linéaire qui peut contenir des hétéroatomes comme l'oxygène, l'azote, le soufre ou le fluor. La tête hydrophile est habituellement constituée d'un atome, d'un groupement d'atomes ou d'un ion [30].

III.1.2. Historique

Parmi tous les tensioactifs connus à ce jour, le plus ancien est le savon. Les premiers utilisateurs de savon auraient été les Sumériens en 2500 av. J.C. Ils fabriquaient les pains de savon à partir d'huiles végétales ou animales, de cendre d'os ou de bois et d'extraits de plantes parfumées. L'apparition du savon, tel qu'il est connu aujourd'hui, aurait eu pour cadre la ville de Savone, en Italie, d'où il tire son nom. Pendant des siècles, le savon servait d'onguent, de cosmétique, de remède. Il faut attendre le Moyen-âge pour que le savon soit utilisé pour laver le linge. C'est en 1916 que le premier détergent complètement synthétique, le « Nekal a », fut créé en Allemagne. A partir des années 50, le savon se voit remplacé par des tensioactifs de synthèse dans les formulations détergentes [31].

III.1.3. Classification des tensioactifs

Les tensioactifs peuvent être classés en quatre grandes classes. On distingue ainsi, en fonction de la nature du groupement hydrophile, plus précisément, selon leur mode d'ionisation dans l'eau :

❖ Les tensioactifs anioniques

Ce sont les plus utilisés industriellement en raison de leurs excellentes propriétés détergentes. Ils sont caractérisés par une partie hydrophile chargée négativement, qui peut être une terminaison carboxylate, sulfate, sulfonate ou encore phosphate, et se présentent généralement sous forme de sels de métaux alcalins ou d'ammonium. [32].

❖ Les tensioactifs cationiques

Ce sont des tensioactifs qui libèrent une charge positive en solution aqueuse. Ils sont généralement des sels d'ammoniumquaternaire. Ces molécules ne sont pas compatibles avec les tensioactifs anioniques, et forment avec ces derniers des complexes insolubles dans l'eau. Cette classe de tensioactif présente des propriétés bactériostatiques et émulsionnantes [33].

❖ **Les tensioactifs zwitterioniques ou amphotères**

Ces tensioactifs possèdent deux groupements de charges opposées. Suivant le pH ils sont sous forme cationique ou anionique. Près de leur point isoélectrique, ils sont réellement amphotères, c'est-à-dire qu'ils possèdent les deux charges à la fois [32] ces tensioactif sont compatibles avec les autres tensioactifs et sont utilisés comme détergents. Les dérivés de la bétaine et les phospholipides sont les tensioactifs amphotères les plus répandus [34].

❖ **Les tensioactifs non ioniques**

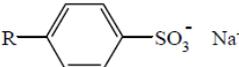
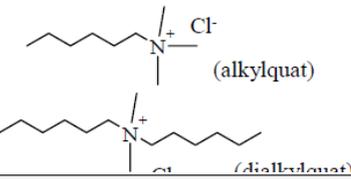
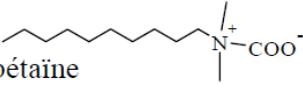
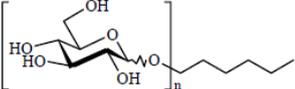
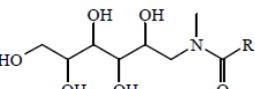
Ces tensioactifs viennent en deuxième place par ordre d'importance industrielle avec un peu moins de 40 % du total. En solution aqueuse ils ne s'ionisent pas, car ils possèdent un groupe hydrophile du type alcool, phénol, ester, éther ou même amide. Ils ne sont pas sensibles aux variations du pH et sont compatibles avec tous les autres types de tensioactifs[30].

On peut trouver dans ce groupe des substances très lipophiles et d'autres très hydrophiles, ainsi que tous les intermédiaires d'où la notion d'équilibre hydrophile-lipophile (HLB) qui caractérise les tensioactifs non ioniques [35].

Ce sont souvent les meilleurs détergents, car généralement, leur activité superficielle et la capacité de solubilisation sont plus élevées. De plus, ils ont des très faibles valeurs de CMC. Ces agents de surface sont émulsionnants et solubilisants et sont les plus employés et les mieux tolérés de tous les tensioactifs car ils sont biologiquement sans risque.

Contrairement aux ioniques, leur solubilité diminue lorsqu'on augmente la température (apparition de trouble) alors qu'ils donnent à froid des solutions limpides. Il a été constaté qu'au voisinage de cette température de trouble ces composés possèdent un pouvoir détergent maximal avec un pouvoir moussant minimal [32,33]. Parmi ces tensioactifs on distingue les saponines qui représentent l'objet de notre étude.

Tableau (1) : Récapitulatif des différents types de tensioactifs et leurs applications.

<i>famille de tensioactifs</i>	<i>principaux caractères</i>	<i>utilisation</i>
<u>ANIONIQUE</u>		
savons $R-COO^- Na^+$	- les plus courants - peu onéreux - n'irritent pas la peau - bonne biodégradabilité	détergent
alkylsulfate $R-O-SO_3^- Na^+$		agent moussant (shampooing, dentifrice), humectant et détergent (liquide vaisselle)
alkylbenzène sulfonate linéaire (LAS) 		agent émulsifiant, dispersant et détergent
<u>CATIONIQUE</u>		
ammonium quaternaire 	charge positive qui leur permet de s'adsorber sur des substrats chargés négativement	agent antistatique et adoucissant (produits de rinçage linge et cheveux) bactéricide (desinfectants chirurgicaux, antiseptiques)
<u>ZWITTERIONIQUE</u>		
alkylbétaine  alkylsulfobétaine dérivés d'acides aminés	peu agressifs pour les tissus vivants compatibles avec toutes les autres classes de tensioactifs	adoucissant pour textile et cheveux additif inhibiteur de corrosion
<u>NON IONIQUE</u>		
alcools éthoxylés $R-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$ alkylphénols éthoxylés	peu biodégradables	détergent (6 à 10 OE) dispersant, humectant et émulsifiant (liquide vaisselle et linge) (n>10 OE)
alkylpolyglycosides (APG) 	- très bas niveau de toxicité - pas sensible au pH - non irritant - bonne synergie avec les autres tensioactifs	C8-C10 : agent moussant dans l'agrochimie C12-C16 : co-tensioactif en détergence soins corporels
alkylglucamides 		formulation pour shampooing et gel douche
esters de glycérol esters d'hexitols		agent émulsifiant dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique

III.1.4. Propriétés des tensioactifs

III.1.4.1. Propriétés fondamentales

Les propriétés essentielles des tensioactifs qui permettent de comprendre les différents phénomènes qui les régissent et qui déterminent leurs domaines d'application sont :

➤ **Adsorption aux interfaces**

Présents à faibles doses dans l'eau, les molécules tensioactives ont tendance à s'orienter et à se concentrer aux interfaces de façon à augmenter les interactions attractives (partie hydrophile/eau et partie lipophile/phase lipophile) et à diminuer la tension interfaciale ainsi que la tension superficielle entre les deux phases considérées jusqu'à ce que l'interface soit saturée [36].

➤ **Micellisation**

Une fois l'interface 'eau-air' saturée par les molécules tensioactives (figure 5; b), celles restant en excès s'auto-associent en solution soit par leurs parties hydrophiles soit par leurs parties hydrophobes et ce de façon à former des agrégats appelés micelles (figure 5; c).

La présence de micelles a pour conséquence une augmentation importante de la solubilité et de la solubilisation [36] et le type d'agrégats formés (micelles sphériques, cylindriques, bicouches) est fonction de la nature du tensioactif ainsi que de sa concentration mais également du rapport des tailles de la partie hydrophobe et de la partie hydrophile [35].

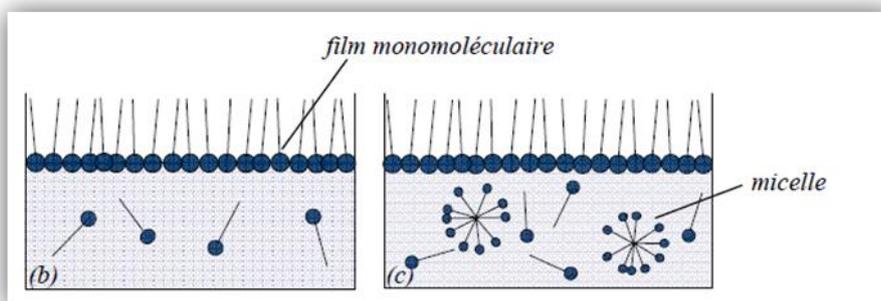


Figure (5): Comportement des tensioactifs en milieu aqueux – Phénomène de micellisation

➤ **Solubilité**

La solubilité des tensioactifs dans l'eau ou dans les hydrocarbures varie en fonction de l'importance relative de leurs parties hydrophobes et hydrophile (HLB). Lorsqu'elle a lieu, la

formation de micelles permet de rendre plus favorable la dissolution dans l'eau des amphiphiles, en réduisant l'aire de contact entre les chaînes hydrocarbonées et l'eau, ce qui induit des solubilités parfois extraordinairement élevées [37].

La connaissance de celle-ci permet en même temps de choisir les produits les plus adaptés pour des applications spécifiques et de définir les conditions optimales de leur utilisation [38].

III.1.4.2. Propriétés pratiques et fonctions des tensioactifs

En pratique, on trouve les tensioactifs dans les nettoyeurs ménagers, les lessives et les cosmétiques. En pharmacie galénique, ils sont employés comme émulsionnants, agents de suspension, solubilisant, mouillants, moussants ou détergents [30,39].

➤ L'émulsification

La préparation et la stabilisation d'émulsions requiert la présence d'un ou plusieurs composés tensioactifs (50), qui peuvent intervenir de deux manières, d'une part ils réduisent la tension interfaciale entre les liquides non miscibles, d'autre part ils forment une pellicule interfaciale entre le liquide dispersé et le milieu continu, agissant comme une barrière protectrice qui retarde ou empêche la séparation des liquides [40].

➤ L'humidification

L'action humidifiante se définit par la faculté d'étalement du liquide sur un substrat donné et par son pouvoir de pénétration dans les pores. Celle-ci est très importante dans les formes galéniques solides, dans lesquelles l'adsorption du tensioactif sur la surface des particules hydrophobes facilitera leur mobilité et augmentera la vitesse de désagrégation et libérera de ce fait les principes actifs [41].

➤ La dispersion

Cette propriété est utilisée généralement pour préparer des suspensions. En ce qui les concerne, on estime que ce processus se déroule en étapes successives : mouillage du solide par le liquide par action humectante, fragmentation des agrégats de particules solides et inhibition de leur agglomération grâce à la formation d'une barrière énergétique [41].

➤ La fonction moussante

La formation de mousse est intimement liée à la réduction de la tension superficielle et à la formation d'une pellicule de surfactifs adsorbés à la surface des bulles de gaz dispersé. Cette activité est généralement associée à l'action nettoyante des savons et shampoings [41].

III.2. Tensioactifs synthétiques et naturels

III.2.1. Tensioactifs synthétiques

Les tensioactifs synthétiques sont fabriqués à partir de produits de base tels que l'éthylène, le propylène, les benzènes et les paraffines (figure 6). La chaîne carbonée lipophile peut être synthétisée à partir d'éthylène via des procédés bien spécifiques, ou bien être obtenue directement à partir d'oléfines linéaires extraites des paraffines via un autre procédé. Ainsi sont obtenus majoritairement des alcools gras à chaîne moyenne. Pour former le tensioactif, un groupement hydrophile, sulfate, sulfonate ou éthoxylat, est ensuite greffé.

Parmi ces tensioactifs on peut citer les alkyl-benzènes sulfonates qui sont de loin les plus utilisés, à raison d'environ 50 % de la production totale, ils sont suivis des tensioactifs issus d'alcools gras représentent également une part importante (environ 40 %). Il faut noter que les alcools gras constituent un intermédiaire chimique également synthétisé à partir d'huiles végétales [42].

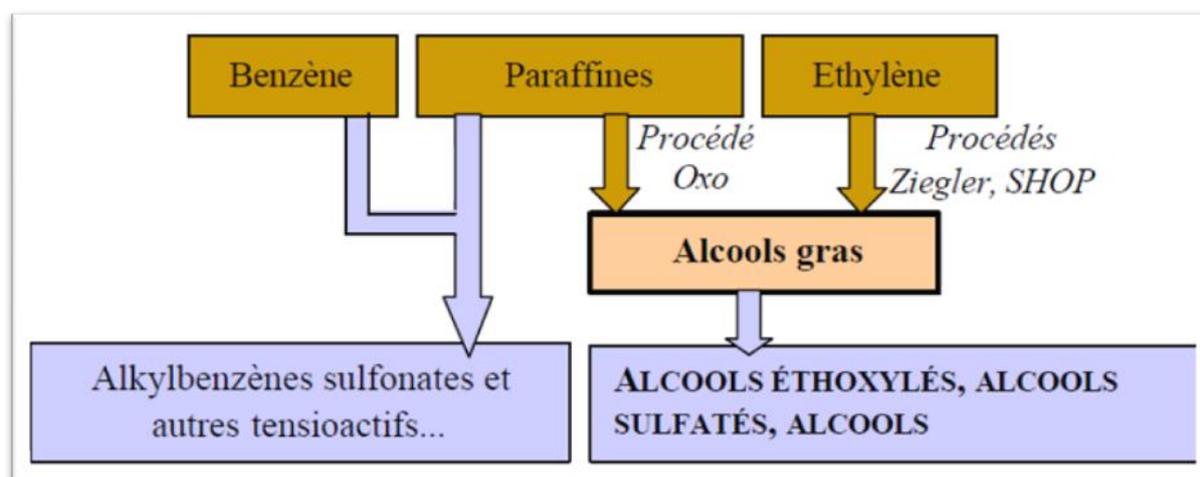


Figure (6) : Voie de synthèse des tensioactifs synthétiques

III.2.2. Tensioactifs naturels

Au sens strict, les « tensioactifs naturels » sont des molécules provenant directement de sources naturelles. Ils peuvent être d'origine animale, végétale ou bactérienne et sont obtenus par un procédé d'extraction, de précipitation ou de distillation qui n'introduisent pas de pollution. Leur obtention ne nécessite donc pas l'utilisation de la synthèse organique. En réalité, très peu de tensioactifs répondent à ces critères. Par ailleurs, de nombreux auteurs évoquent l'utilisation de 'tensioactifs naturels' lorsque leur procédé de synthèse fait intervenir principalement l'eau, en remplacement des nombreux solvants organiques couramment utilisés ou bien lorsque leur synthèse se fait à partir de matière première naturelle. Ces tensioactifs composés de molécules issues du vivant peuvent avoir, dans certains cas, une meilleure dégradabilité et permettent de répondre aux exigences actuelles [43].

Les principaux tensioactifs naturels commercialisés sont soit dérivés de polyols comme les alkyl-poly-glucosides (APG), les sucro-esters et les alkyl-glucamides ; soit dérivés d'acides aminés. Les tensioactifs dérivés de polyol sont non ioniques, contrairement aux dérivés d'acides aminés [44].

III.2.2.1. Origines des tensioactifs naturels

➤ Tensioactifs d'origine végétale

Les tensioactifs d'origine végétale ont connu une forte croissance ces dernières années. Ils représentent aujourd'hui 25 à 30% des tensioactifs utilisés. On cite la lécithine extraite du soja et les saponines, ces dernières ont montré une excellente capacité de solubilisation vis-à-vis du cholestérol.

Autres tensioactifs considérés comme étant naturels, ceux issus de l'oléochimie dont les alcools gras qui représente 80 % de la production, les amines grasses et les acides gras.

Parmi les tensioactifs issus des acides gras ; les **esters de glycérol et poly-glycérols** résultant de la réaction entre une molécule de glycérol ou poly-glycérol et une molécule d'acide gras. Les poly-glycérols proviennent de la condensation du glycérol sur lui-même en milieu acide. Ces esters sont des bases importantes pour la formulation de crèmes en cosmétique et en pharmacie, en effet, elles s'émulsionnent avec grande facilité [42].

Tableau (2) : Exemple de tensioactif issu de ressources végétales.

Source	BTA nonioniques	BTA anioniques	BTA cationiques et amphotères
Alcools gras	Alkylpolyglucosides Alcools gras éthoxylés ou éthoxy-propoxylés	Alkyléthersulfates Alkylsulfates Sulfosuccinates	
Acides gras	Esters de sorbitan Esters de (poly)glycérol Acides gras éthoxylés ou éthoxy-propoxylés	Savons Condensats acides gras acide aminé/peptide Alkyl iséthionates	Imidazolines
Amines grasses	Oxydes d'amines Amines éthoxylées		Sels d'amines Sels d'ammonium quaternaire
Esters méthyliques	Sucroesters Alcanolamides	Méthyléther sulfonates	
Huile	Alcanolamides Huiles éthoxylées		

➤ **Tensioactifs d'origine animale**

Le cholestérol ; molécule complexe rencontrée dans la plupart des organismes animaux où il participe au transport des graisses.

Les protéines ; elles ont un certain pouvoir émulsionnant, mais elles sont toujours associées à un autre tensioactif. Elles ont plutôt un rôle de stabilisateur de dispersion [45].

Sels biliaires ; Les sels biliaires agissent naturellement comme des solubilisants ou émulsifiants. Ils sont synthétisés dans le foie, stockés dans la vésicule biliaire, contenus dans la bile et existent principalement chez l'homme sous forme conjuguée avec la taurine et la glycine. Ces tensioactifs naturels jouent un rôle primordial dans la solubilisation et l'absorption des composés apolaires ingérés tels que le cholestérol, les lipides, les acides gras et les vitamines liposolubles, ils les solubilisent sous forme de micelles mixtes accélérant ainsi leur diffusion à travers la membrane des entérocytes.

Tableau (3) : Tensioactifs naturels rapportés dans la littérature.

Tensioactif	Origine	Provenance	Référence
Albumine	Animale/humaine	Sérum plasmatique	(Cortes and Saura, 2010)
Caséine	Animale	Lait	(Lin et al., 2009)
Lécithine	Animale/végétale	Soja, jaune d'œuf	(Holmberg, 2001)
Lysozyme	Animale	Blanc d'œuf	(Blake and Johnson, 1984)
Saponine	Végétale	Quinoa, salsepareille	(Mitra and Dungan, 2001)
Rhamnolipides	Bactérienne	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Sánchez et al., 2007)
Sels biliaires	Humaine	Bile	(Matsuoka et al., 2006)

D'autres biotensioactifs synthétisés à partir de composés naturels sont recensés, ils peuvent posséder une partie hydrophobe de nature stéroïdienne, dérivée d'acides biliaires, couplée dans certains cas, à une tête polaire dérivée d'acides aminés, ou bien être dérivés des lipides. Ces derniers sont souvent couplés à des sucres ou des acides aminés pour obtenir des propriétés amphiphiles, et peuvent être utilisés comme agent tensioactif. Certaines revues de la littérature montrent que les tensioactifs dérivés d'acides biliaires ou de lipides, associés à des acides aminés, possèdent des propriétés intéressantes en termes d'auto-assemblage, de solubilisation et de toxicité [46].

➤ Tensioactifs d'origine bactérienne

La plupart des tensioactifs d'origine naturelle sont produits par des microorganismes, principalement par des bactéries et des levures. La biodégradabilité et la multitude des structures chimiques, et donc leurs propriétés diverses, ont permis de trouver de nombreuses applications aux biotensioactifs dans des procédés de biotechnologie environnementale [43].

III.2.2.2. Les avantages des tensioactifs naturels

➤ Biodégradabilité

Les agroressources présentent un caractère biodégradable, associé à la structure, qui, dans certains cas, les fait préférer aux dérivés issus de la pétrochimie. La rapide dégradation de ces fonctions est due à leur présence ubiquitaire dans la nature et à l'existence de nombreuses enzymes capables de les hydrolyser. Il a été démontré que certains tensioactifs à base de liaisons amides étaient dégradés à 60 % en 26 jours [46].

Les tensioactifs mis en œuvre sont inévitablement rejetés dans les circuits des eaux usées, leur caractère biodégradable devient alors une nécessité [43].

➤ **Biocompatibilité**

Les tensioactifs naturels présentent de bonnes biocompatibilités, c'est-à-dire qu'ils sont caractérisés par leur non toxicité et leur innocuité pour les aliments et les personnes, que ce soit par ingestion directe ou par contact cutané répété. De plus, ils possèdent une écotoxicité très réduite vis-à-vis des écosystèmes.

➤ **Complexité**

La nature met à disposition de l'homme des molécules qui, en l'état ou après transformation, offrent des caractéristiques techniques parfois supérieures à celles des bases pétrolières conventionnelles. Les tensioactifs végétaux sont des matières premières pré-synthétisées, déjà élaborées, alors que les surfactants synthétiques nécessitent de lourdes transformations pour atteindre le même degré de complexité.

➤ **Multifonctionnalité**

Des tensioactifs naturels peuvent également être qualifiés de plurifonctionnels et permettre une simplification des formulations. En effet, le pouvoir émulsifiant peut-être associé à un pouvoir hydratant, adoucissant ou antimicrobien par exemple [42].

III.2.2.3. Intérêt biologique de l'utilisation des tensioactifs naturels

Il est utile de se rappeler que les tensioactifs synthétiques sont des substances chimiques qui peuvent interagir avec des membranes cellulaires, pouvant produire des effets non recherchés et même indésirables. Ils peuvent altérer la perméabilité de ces membranes et leur intégrité et par conséquent le processus de transport des solutés au travers de ces membranes[41].

Il ne faut également pas négliger leur caractère amphiphile qui favorise la bioaccumulation. Ce phénomène de bioaccumulation de molécules chimiques peut conduire à long terme à de multiples maladies dont les cancers bien que cela n'ait jamais fait l'objet de recherche.

Concernant les biotensioactifs, l'introduction de liaisons clivables peut entraîner des problèmes de stabilité [46]. D'où l'intérêt des tensioactif d'origine naturelle, qui présentent une meilleure stabilité et permettent de libérer deux molécules présentes naturellement dans

l'organisme. Ces molécules peuvent être éventuellement réutilisées par l'organisme. Ce type de liaison favorise donc la biodégradation des tensioactifs et évite la bioaccumulation de molécules chimiques.

A decorative border in blue ink, consisting of a repeating geometric pattern of diamonds and lines, framing the entire page.

Partie pratique

Pour réaliser notre étude, des essais expérimentaux ont été effectués sur trois plantes afin de choisir celle qui contient le plus de saponines, une fois ce choix effectué des tests d'identification et de caractérisation ont été réalisés.

I. Matériels et méthodes

I.1. Matériel végétal

a) Origine géographique et période de récolte

Les espèces sélectionnées ont été récoltées dans trois régions différentes de la wilaya de Tizi Ouzou, elles sont locales ou adventices et appartiennent à différentes familles.

Les feuilles de *Pistacia lentiscus* ont été collectées en mois de mars 2014, à la région d'Azazga, à 30 km du littoral à 60 km à l'est de Tizi Ouzou et à 100 km à l'ouest de Bejaïa (Figure 7a).

Les feuilles et les fleurs de *Rosmarinus officinalis* ont été collectées en mois de mars 2014, à l'université de Mouloud Mammeri de la wilaya de Tizi Ouzou (Figure 7b).

Les feuilles et les fleurs de *Verbascum thapsus* ont été collectées en mois d'avril 2014 à la région d'Azazga et de Tamdaqui est de la commune d'Ouagnoune, située dans la wilaya de Tizi Ouzou (figure 7c).



(a)



(b)



(c)

Figure (7) : *Pistacia lentiscus* (a), *Rosmarinus officinalis* (b), *Verbascum Thapsus L* (c).

b) Identification botanique

L'identification botanique a été effectuée par « le Botaniste LARIBI MAHMOUD » au niveau du département de Biologie de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

c) Traitement et préparation des échantillons

- o **Récolte :** La récolte s'est faite vers la fin de la matinée.

○ **Lavage – Séchage**

Tous les organes collectés ont été lavés à l'eau courante durant 5 min dans un tamis, puis rincés à l'eau distillée et séchés à l'air libre et à l'ombre, à l'abri de la lumière et de l'humidité, ce séchage a été complété dans l'étuve à 50°C environ 4heures.



Figures (8) :Séchage des fleurs de Verbascum Thapsus à l'aire libre.

○ **Broyage – conditionnement**

Les organes secs qui résultent du séchage ont été broyés à l'aide d'un moulin à café électrique de marque « Coffee Grinder Sayona » en poudre très fine. Les poudres ainsi obtenues ont été conservées dans des boîtes hermétiques à température ambiante et à l'abri de la lumière.

I.2. Matériels biologiques

Les tests microbiologiques ont été effectués sur trois souches bactériennes provenant du laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, il s'agit des espèces suivantes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

I.3. Matériels du laboratoire

Tableau(4) : Récapitulatif du matériel utilisé lors de la pratique.

Equipement de laboratoire	Verreries de laboratoire
Evaporateur rotatif	Ampoule à décanter
Bain marie	Bécher
Etuve	Erlenmeyer
Pompe à vide	Eprouvette graduée
Agitateur magnétique	Fiole jaugée
Réfrigérateur	 Tubes à essais
Balance	Ballon
Spatule	Boite de pétri
Spectromètre UV-VIS	Burette
Spectromètre IR	Entonnoir
Thermomètre	Dessiccateur
Haute	Entonnoir Buchner
	Pipette

II. Méthodes d'identification et d'extraction

II.1. Mise en évidence des saponines

La mise en évidence des saponines est basée sur leurs propriétés tensio-actives dues à leur caractère amphiphile.

II.1.1. Détermination de l'indice de mousse

La présence des saponines est déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, degré de dilution d'un décocté aqueux donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées.

a) Préparation des extraits aqueux

Deux grammes de matériel végétal sec broyé à tester de chaque plante ont été placés dans un ballon et utilisés pour préparer une décoction, avec 100 ml d'eau. On a porté à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, on a réajusté le volume à 100 ml avec de l'eau distillé [47].

b) Calcul de l'indice de mousse

À partir de l'extrait aqueux de chaque plante, on a préparé 10 tubes (1,3 cm de diamètre interne) avec 1, 2, ... 10 ml, le volume final étant réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée.

Chacun des tubes est agité avec énergie en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, on relève la hauteur de la mousse persistante en cm.

Si elle est proche de 1 cm dans le X^{ème} tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le X^e tube} \times 5 / 0,0x$$

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100[47].

II.1.2. Choix de la plante

Le choix de la plante étudiée a été effectué en fonction de l'indice de mousse le plus élevée qui confirme sa richesse en saponines.

II.2. Extraction des saponines des fleurs de *V. Thapsus*

Deux méthodes d'isolement standards ont été établies en suivant la démarche expérimentale ci-dessous :

II.2.1. Protocole d'extraction n°1

Une première extraction à partir du matériel végétal sec a été réalisée à chaud en utilisant un alcool dilué, dans notre cas 'l'éthanol' ; Après refroidissement et filtration, l'extrait obtenu est concentré à sec. Cette extraction primaire conduit à un extrait brut renfermant un grand nombre de composés polaires, autres que les saponosides comme des mono- et des disaccharides, des acides aminés, des tanins..., ou des composés moins polaires comme des graisses et des terpènes. Pour l'obtention des saponosides bruts, un protocole a été suivi au laboratoire qui consiste, après l'extraction primaire, en plusieurs étapes de purification.

Les saponines de *Verbascum thapsus* ont été, de ce fait, extraites selon la méthode décrite par Okwu et Josiah, (2006) [48].

Dans un Erlenmeyer, une prise d'essai de 20 g des fleurs séchées broyées de la plante sélectionnée a été dispersée dans 200 ml de solution à 20% d'éthanol, une première extraction a été réalisée dans un bain marie à 55°C sans rotation pendant 4 heures, après filtration, le résidu obtenu a subi une deuxième extraction avec 200 ml d'une solution d'éthanol à 20% qui a été filtré ensuite.

Les filtrats collectés ont été concentrés dans un bain marie à 90°C pour obtenir un volume de 40 ml, la solution concentrée obtenue a été mélangée avec 20 ml d'éther diéthylique, dans une ampoule à décanter, en agitant vigoureusement. Cette opération a été répétée trois fois, la phase aqueuse récupérée après décantation a subi une extraction avec 20 ml du n-butanol, opération qui a été répétée trois fois et qui a conduit à l'obtention de l'extrait butanolique.

A partir de l'extrait butanolique trois procédés ont été suivis afin d'optimiser le protocole d'extraction.

1^{er} Procédé

- Les extraits combinés du n-butanol ont été lavés deux fois avec 10 ml d'une solution aqueuse à 5% de NaCl puis chauffés dans un bain-marie à 70°C afin de permettre le relargage des saponines.
- Après évaporation, on a gratté le fond du Becher pour récupérer la poudre.
- Le résidu obtenu est déterminé en poids pour calculer le rendement en saponines [48].

Le relargage est une technique qui consiste à séparer une substance en solution de son solvant en introduisant une autre substance plus soluble qui prend sa place. Le relargage peut être suivi d'une distillation.

2^{ème} Procédé

Après l'obtention de l'extrait butanolique on procède à l'évaporation du solvant, celle-ci a été effectuée directement sans passer par le relargage avec la solution du NaCl à 5%, cette opération a été réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif de marque « LABOROTA 4001-efficient- HEIDOLPH » à 70°C (Figure9).

L'évaporateur rotatif communément appelé rota-vapeur a été utilisé afin d'éliminer rapidement le n-butanol et obtenir un extrait sec qui représente la poudre de saponine.



Figure(9) : L'évaporateur rotatif

3^{ème} Procédé

L'extrait butanolique a été mis sous la haute durant une semaine.

II.2.1.1. Evaluation du rendement en saponines

L'extrait de saponine obtenu par chaque procédé a été pesé. Le rendement, exprimé en pourcentage par rapport au poids du matériel végétal de départ, a été déterminé par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

R (%) : Rendement exprimé en %.

M: Masse en gramme de l'extrait sec résultant

M₀ : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

II.2.1.2. Conservation

La poudre extraite par le premier procédé a été conservé à l'abri de la lumière dans un carton quant à la poudre du deuxième essai dans un dessiccateur.

II.2.2. Protocole d'extraction n°2

5g de drogue pulvérisée ajoutée à 50ml de CCL₄ ou d'éther de pétrole (traité pendant 1H50min), ce traitement sert à la séparation des chlorophylles, lipides, des huiles essentielles ainsi que pour la décomposition des complexes de saponines avec les sterines [47]. Le mélange est filtré, la suite du protocole d'extraction est présentée dans le schéma suivant :

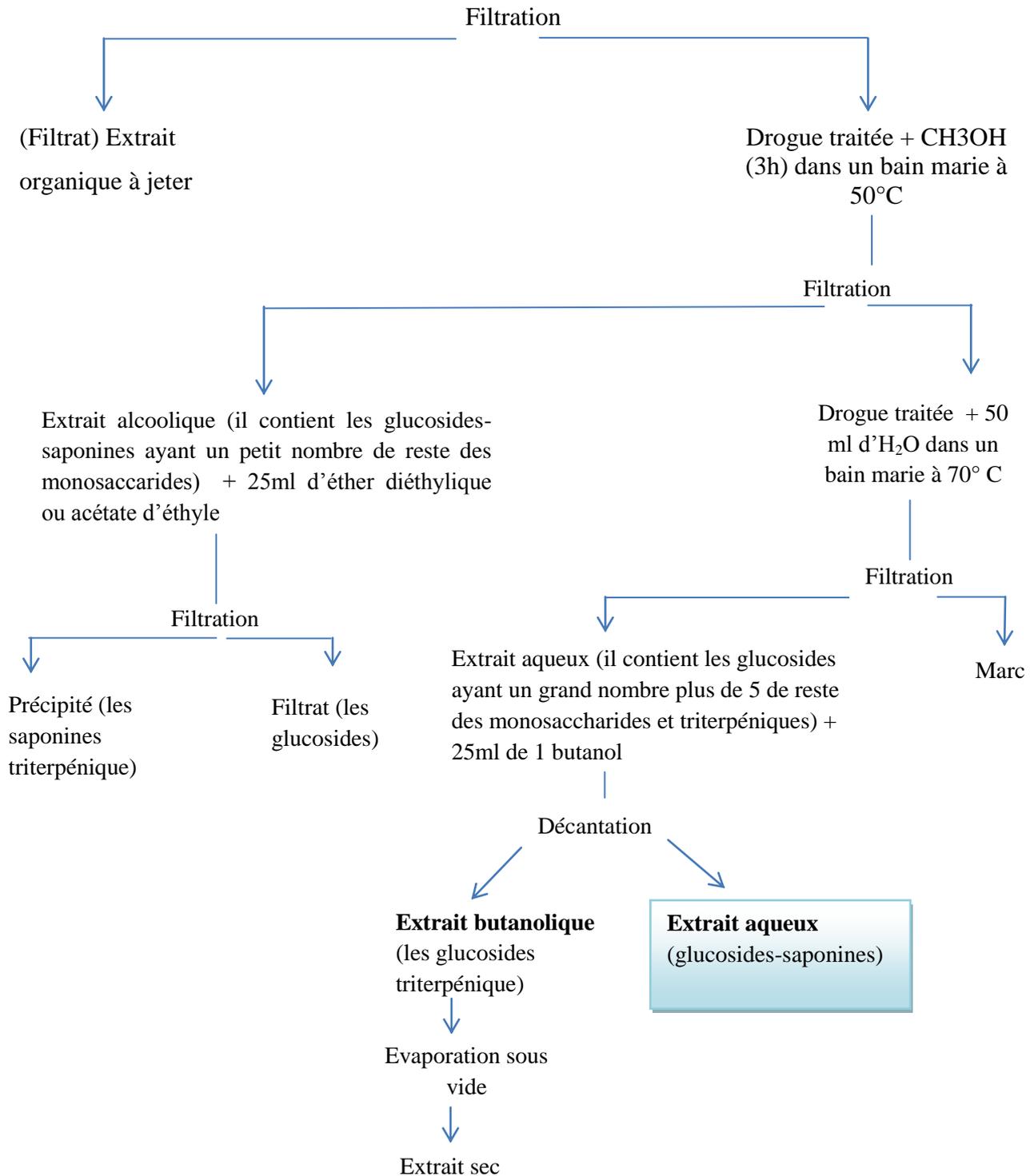


Figure (10) : Schéma général d'extraction des saponosides (protocole N°2) [47].

A partir de l'extrait aqueux (glucosides-saponines) deux procédés ont été suivie ;

Procédé 1. La solution a été concentrée à l'évaporateur rotatif pour ensuite être caractérisée et utilisée pour des tests microbiologiques.

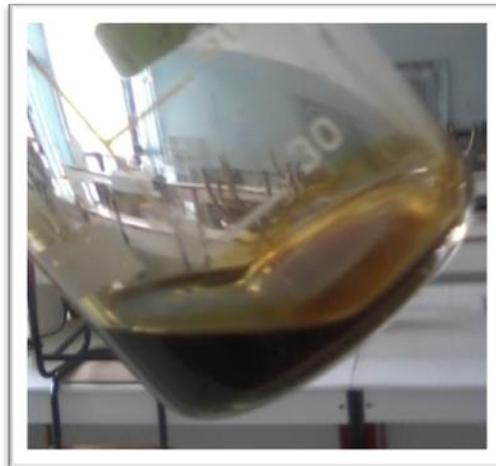


Figure (11) : Solution concentrée au Rotavapor.

Procédé 2. La solution obtenue a été lavée à plusieurs reprises par du chloroforme pour chasser la couleur brunâtre des flavonoïdes figure (12). Cette solution de flavonoïde a à son tour fait l'objet de plusieurs tests.

Le chloroforme est ensuite enlevé par l'éthyle acétate jusqu'à l'obtention d'une couleur jaune transparente. Les saponines sont précipitées dans l'acétone et récupérées par filtration sur filtre à papier de diamètre 110 mm [49].



Figure (12) : Décantation de la solution après ajout du chloroforme.

III. Caractérisation des extraits obtenus

III.1. Tests d'identification chimique

Des tests de caractérisation préliminaires ont été effectués afin de confirmer la présence et le type des saponines dans les extraits aqueux et les extraits alcooliques obtenus.

III.1.1. Tests sur l'extrait aqueux

- Quelques gouttes d'extrait aqueux ont été ajoutées à 5ml de HCl puis agités.
- Quelques gouttes d'extrait aqueux ont été ajoutées à 5ml de NaOH puis agités.

L'apparition de mousse dans le premier tube seulement, démontre l'existence de saponosides triterpéniques.

L'apparition de mousse dans les deux tubes, démontre la présence de saponosides stéroïdienne.

III.1.2. Tests sur les extraits alcooliques

2ml d'extrait alcoolique, 1ml de solution de nitrate de sodium 10% et une goutte de H₂SO₄ concentré ont été mélangés dans un tube à essai, l'apparition d'une coloration rouge sang démontre la présence des saponosides.

➤ Réaction de caractérisation des flavonoïdes

Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes ont été mis en évidence par la réaction à la cyanidine.

5ml de la solution sont introduits dans un tube à essai. A cette solution sont ajoutés 5ml d'acide chlorhydrique, 5ml d'eau distillé et quelques copeaux de magnésium.

L'apparition d'une couleur rose orangée, rose violacée ou rouge rassemblée dans la couche surnagente de l'alcool indique la présence des flavonoïdes libres (génines).

III.2. Techniques d'analyses

Dans le but de caractériser l'extrait préparé à partir des feuilles de *Verbascum thapsus*, des analyses qualitatives ont été effectuées.

Cette analyse a été effectuée sur l'extrait butanolique et aqueux obtenus à partir des deux protocoles.

La spectrométrie et la chromatographie sont des outils analytiques de plus en plus utilisés pour la séparation, l'identification et la quantification de composés chimiques dans des mélanges complexes comme des extraits de plante.

III.2.1. Techniques spectrométriques

a) Spectrométrie UV-visible

Méthode analytique qualitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. Plus cette espèce est concentrée plus elle absorbe la lumière dans les limites de proportionnalités énoncées par la loi de Beer-Lambert. La densité optique des solutions est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de l'espèce chimique à étudier.

➤ Mode opératoire

Dans un premier temps on fait des délutions (1/400, 1/400, 1/20, 1/5) à partir de nos échantillons ; EQn°1, EQn°2, EB n°1, le témoin, respectivement.

Dans une cuve en Quartz de 1 cm de largeur, on introduit l'extrait brute méthanolique à analyser, environ 1ml, après quelques minutes l'absorbance est lue au spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-2401 PC).

Avant cette procédure on étalonne d'abord l'appareil par le blanc de chaque extrait, qui est dans notre cas le butanol, chloroforme et l'eau successivement [53].

b) Spectrométrie infrarouge

Le spectre infrarouge est une technique d'analyse qui sert principalement à déterminer la présence de groupements fonctionnels dans les molécules organiques et les structures dans certaines molécules simples. Elle est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par

l'échantillon analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans l'échantillon [53].

Mode opératoire

Des études par spectroscopie infrarouge ont été effectuées sur un spectromètre IRTF (SHIMADZU 8400) à la température ambiante (nombre d'onde compris entre 400 et 4000 cm^{-1} , résolution de 2cm^{-1}).

Pour la poudre l'analyse est effectuée à l'aide des pastilles constituées d'un mélange de 0.6mg de l'échantillon et 200mg de KBr, alors que les deux extraits liquides par lecture directe en déposant une goutte du liquide entre deux plaques transparentes.

III.2.2. Techniques chromatographiques

a) Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une technique analytique simple, rapide et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur les phénomènes d'adsorption et de partage, où les molécules à séparer s'adsorbent à la surface d'un support (phase stationnaire) et seront entraînées à travers ce dernier par un éluant (phase mobile), donc la séparation est fonction des différences d'adsorption des composants de l'échantillon sur la phase stationnaire et des différences de leur solubilité dans la phase mobile.

➤ Mode opératoire

Dépôt de l'échantillon ; Les extraits alcooliques sont analysés sur une plaque de gel de silice (TLC Silia gel 60 F254) prête à l'emploi découpée aux dimensions voulues (20 x 20 cm) en utilisant comme témoin une saponine référence. 10 μl de chacun des extraits ont été déposés à l'aide d'un capillaire à 3.0 cm du bord inférieur de la plaque et espacés de 4 cm. Les dépôts sont séchés à l'air libre.

Développement de la plaque ; La plaque est ensuite placée dans une cuve à chromatographie DESAGA préalablement saturée par les vapeurs de solvant de migration. la phase mobile utilisée a été le mélange; DCM/ CH_3COOH glacial/MeOH/ H_2O (64:32:12:8). Celle-ci migre par capillarité vers le haut de la plaque (chromatographie ascendante), et lorsque le front du

solvant se trouve à 3 cm du bord supérieur de la plaque, la chromatographie est arrêtée. La plaque est retirée de la cuve puis séchée à l'aire libre.

Révélation du chromatogramme

La révélation se fait :

- soit par visualisation des substances ayant migré sous lumière ultraviolette à 254 nm et à 366 nm. Les constituants apparaissent sous forme de taches fluorescentes ;
- soit par pulvérisation de la plaque avec le réactif à la vanilline sulfurique. Suivie d'un chauffage de 10min à l'étuve à 100°C. Les saponines apparaissent sous forme de taches rose-violacé, bleu, bleu-violet, rouge [51].

La composition du réactif à la vanilline sulfurique est donnée en annexe.

b) Chromatographie liquide à haute performance

L'HPLC met en œuvre, aussi bien des phénomènes de partage qui sont les plus courants, que des phénomènes d'adsorption, ou d'échange d'ions. La méthode de séparation fait sensiblement appel aux mêmes éléments de base que ceux employés en chromatographie sur colonne. Des colonnes de large diamètre sont utilisées avec un débit faible et sous pression. La distribution du soluté entre la phase stationnaire greffée dans la colonne et la phase mobile, se fait grâce à une pompe qui maintient constant le débit du liquide. Les solvants les plus souvent utilisés sont le méthanol ou l'acétonitrile purs ou mélangé à l'eau distillée. En outre, l'emploi de détecteur permet l'enregistrement électronique du message qui est traduit par des pics ou chromatogramme.

➤ Mode opératoire

L'analyse par HPLC a été réalisée sur un système Agilent 1100 HPLC, équipé d'un dégazeur à vide, pompe à gradient quaternaire, échantillonneur automatique et le détecteur de longueur d'onde multiples en utilisant une colonne ODS-2 Hypersil (250 mm x 4,6 mm, 5 m, Thermo Scientific) avec certaine condition, notamment la température de la colonne qui était à 26 °C, et la détection qui était à 203 et 210 nm.

Phase mobile utilisée a été l'acétonitrile et l'eau à la fois contenant de l'acide acétique à 0,1%, représentants A et B, respectivement.

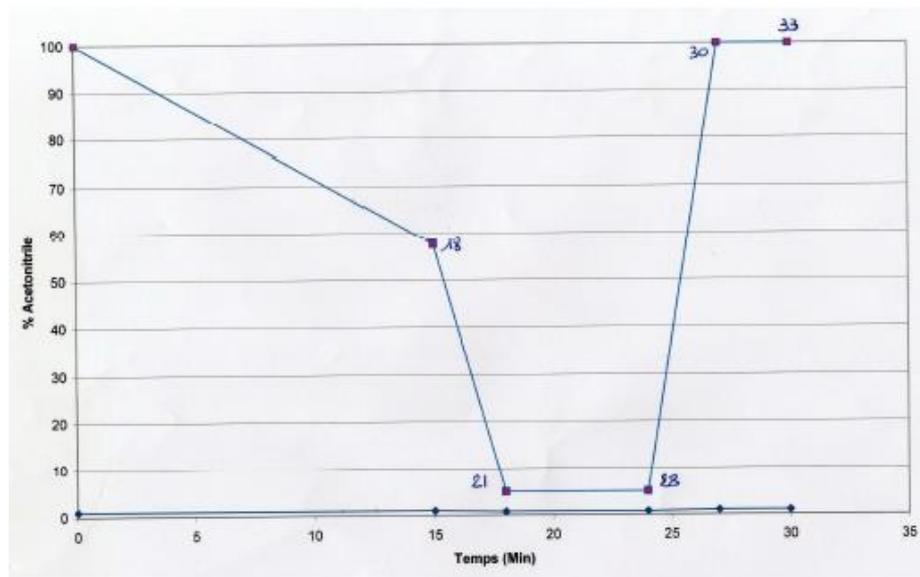


Figure (13): Gradient d'analyse des saponines de *V. Thapsus*

Le gradient (mélange A et B) mis en place s'étale sur 33 mn et se déroule en 3 phases (Figure 13):

- Première phase: le gradient débute par 100% de phase mobile B (acétonitrile) et diminue à 58% en 18 mn.
- Seconde phase: à 18 mn le gradient chute en 3 minutes à 5 % de phase B et y stagne pendant 7 mn.
- Troisième phase: le gradient remonte en 2 mn à 100% de phase B puis y plafonne jusqu'à la fin des 33 mn afin de rééquilibrer la colonne. Le volume d'injection était de 500 µl pour la saponine de référence ainsi que les échantillons de Verbascum avec lavage de l'aiguille. La collecte et l'intégration de données ont été réalisées avec le logiciel « Millennium » afin que tous les pics soient intégrés de la même manière [52].

Cet étalon interne est chimiquement inerte vis-à-vis des différents solutés du mélange à étudier et donne sur le chromatogramme un pic proche du pic représentant les solutés à doser sans interférer avec les autres pics.

Préparation du témoin

0.25g de saponine référence en poudre a été pesée grâce à une balance analytique, puis mélangée à 50ml de méthanol.

Préparation des échantillons

Grâce à une micropipette on injecte dans des flacons en verre les échantillons à analyser un à un qu'on insert par la suite dans l'appareil pour la lecture.

III.3. Etude de l'activité biologique

III.3.1. Test hémolytique

La propriété hémolytique des saponines a mené à la mise en place de tests hémolytiques permettant leur détection dans les extraits de plantes.

Un tampon phosphate où existe une suspension de sang (Hématies) a été mélangé à l'extrait aqueux de la plante, également dans un tampon phosphate. Nous avons obtenu donc les saponosides en milieu aqueux et les hématies. Après agitation pendant 6 heures deux cas peuvent se présenter [54] ;

- ⊗ La concentration en saponoside a hémolysé tous les globules rouges, donc l'apparition d'un liquide rouge limpide indique une hémolyse totale.
- ⊗ Il y'a une concentration limite et il y'a un dépôt de globules rouges restant.

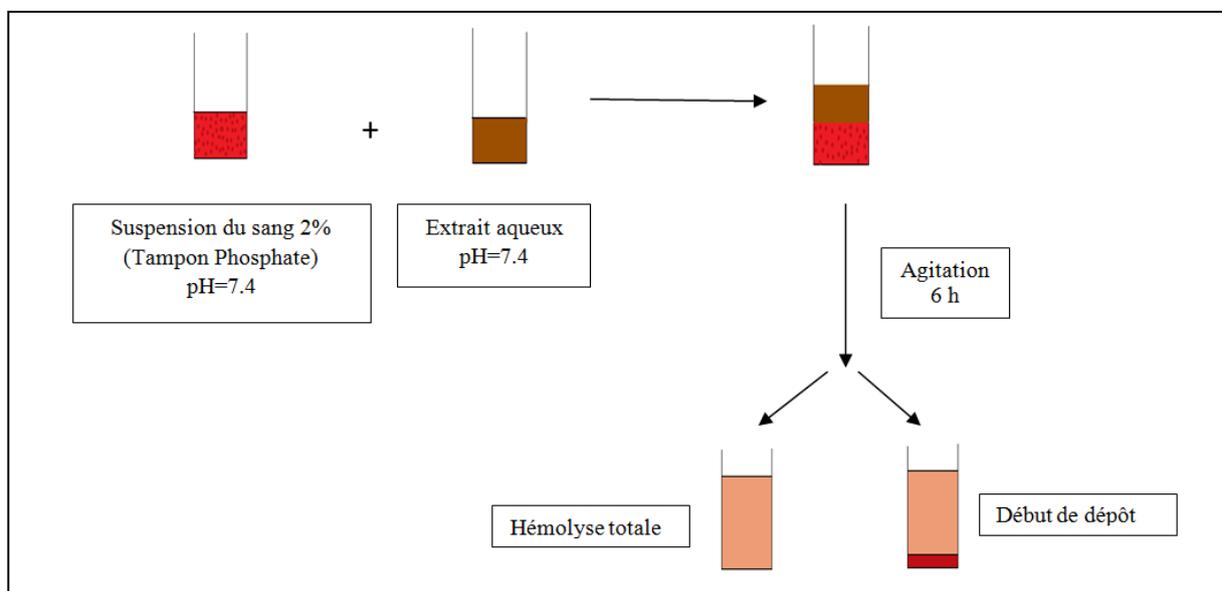


Figure (14) : Schéma du test hémolytique.



Figure (15) : Agitation magnétique du mélange.

III.3.2. Tests antibactériens et antifongiques

Une étude qualitative de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux concentré a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé citée par (Trekietal.2009).

➤ Microorganismes testés

Les tests ont été effectués sur trois souches bactériennes provenant du laboratoire de Microbiologie de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, il s'agit des espèces suivantes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

➤ Préparation de l'inoculum

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées dans des bouillons nutritifs par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées qui ont servi par la suite à préparer l'inoculum en les trempant dans des tubes de solution d'eau physiologique à 0,9% NaCl. Les suspensions bactériennes ont été standardisées à 10^6 germes/ml. Cette dernière est obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant la densité optique à 620 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

➤ Ensemencement

Après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, on a trempé un écouvillon dans la suspension et on a étalé la surface entière avec la gélose Mueller Hinton à trois reprises. Après chaque application, on a tourné la boîte de 60° environ en vue d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, on a écouvillonné partout autour du bord de la surface de la gélose.

➤ Dépôt de disque et incubation

Un disque de papier Wathman stérile (6 mm de diamètre) a été déposé sur la surface du milieu GMH de chaque boîte à l'aide d'une pince flambée. Un volume de l'extrait aqueux qui contient les saponines a été versé au milieu de chaque disque à l'aide d'une micropipette jusqu'à sa saturation.

Après une heure de dépôt des disques, les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24 heures à 37°C.



Figure (16) : Incubation des boîtes de pétrie à 37°C.

A decorative border with a repeating geometric pattern of diamonds and lines, rendered in a dark blue color, frames the entire page.

Résultats et discussions

I. Résultats de la mise en évidence des saponines

I.1 Détermination des indices de mousse

L'indice de mousse a permis de mesurer le pouvoir aphrogène de chaque plante directement lié à sa teneur en saponines. Les résultats du test de mousse des fleurs de *V.thapsus* sont illustrés dans les figures suivantes :

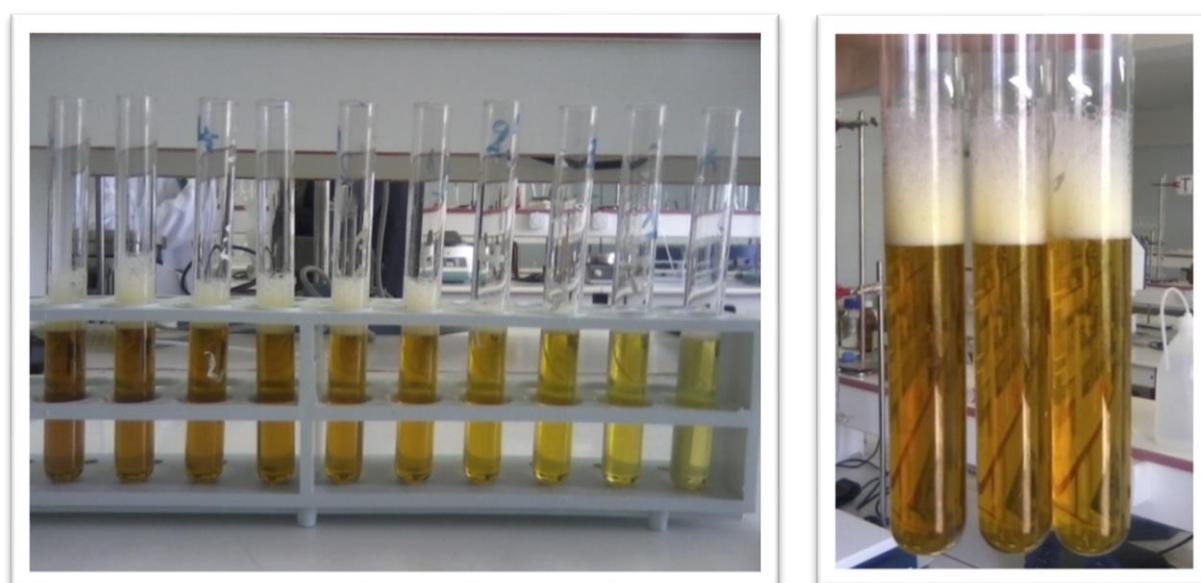


Figure (17): Résultat du test d'indice de mousse des fleurs de *V. Thapsus*.

Les valeurs des hauteurs de mousse trouvées, sont présentées dans les tableaux suivants :

Tableau (5): Valeurs des hauteurs de mousse des feuilles et des fleurs de *V. Thapsus*.

N° de tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Hauteur (cm) (Fleurs)	1	1.7	1.5	1.5	2.4	2.5	2.6	2.2	3.2	2.7
Hauteur (cm) (Feuilles)	0	/	/	/	0.5	0.6	/	/	/	0.9

Tableau (6) : Valeurs des hauteurs de mousse des feuilles de *P. Lentiscus*.

N° de tube	2	5	6	10
Hauteur (cm) (Feuilles)	0.1	0.7	1	0.9

Tableau(7) : Valeurs des hauteurs de mousse des feuilles et des fleurs de *R. Officinallis*.

N° de tube	2	5	6	10
Hauteur (cm) (Fleurs)	0.1	0.1	0.1	0.1
Hauteur (cm) (Feuilles)	0	0.1	0.1	0.2

Lors du calcul de l'indice de mousse pour les plantes *R. Officinallis* et *P. lentiscus*, nous avons utilisé uniquement quatre tubes à essais au lieu de dix et ce par manque de matière première, cependant cela ne change en rien la justesse des résultats.

Pour le Calcul des indices de mousse, on applique la relation suivante :

$$I = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le } X^{\text{ème}} \text{ tube} \times 5 / 0,0x$$

A partir des tableaux ci-dessus, on tire les valeurs de X correspondant aux numéros des tubes contenant une mousse de hauteur égale ou proche de 1 cm.

Fleurs de *Verbascum thapsus* ; le tube n°1 correspond au tube ayant la hauteur de la mousse recherchée. Donc l'indice de mousse, ici, est égal, soit :

$$I = 1 \times 5/0.01 = 500$$

Feuilles de *Verbascum thapsus* ; le tube n°10 correspond au tube ayant la hauteur de la mousse recherchée. Donc l'indice de mousse, ici, est égal, soit :

$$I = 0.9 \times 5/0.1 = 45$$

Feuilles de *Pistacia lentiscus* ; le tube n°6 correspond au tube ayant la hauteur de la mousse recherchée. Donc l'indice de la mousse, ici, est égal, soit :

$$I = 1 \times 5/0.06 = 83.3$$

Rosmarinus officinallis, les hauteurs de mousses trouvées sont toutes inférieures à 1 cm, donc l'indice de mousse est inférieur à 100, ce qui indique que cette plante contient très peu de saponines.

Un récapitulatif des indices de mousse évalués des trois plantes est représenté dans le tableau suivant :

Tableau (8) : Indice de mousse des feuilles et des fleurs de *V. Thapsus* et de *R. Officinallis*, et des feuilles de *P. Lentiscus*.

Espèce	<i>Pistacia lentiscus</i>	<i>Verbascum thapsus</i>		<i>Rosmarinus officinallis</i>	
Organe	Feuilles	Feuilles	Fleurs	Feuilles	Fleurs
Indice de mousse	83.33	45	500	<100	<100

Les résultats indiquent que toutes les plantes contiennent des saponines mais avec des teneurs différentes.

La richesse en saponines est illustrée par un indice de mousse très marqué. Ceci signifie que les fleurs de *Verbascum thapsus* ont une teneur plus importante en saponines par rapport aux autres plantes.

I.2. Choix de la plante

Afin d'obtenir un bon rendement d'extraction, nous avons choisi d'étudier et de travailler avec la plante *V. thapsus* qui a la teneur la plus importante en saponines triterpéniques.

II. Résultats de l'extraction des saponines

II.1. Protocole d'extraction n°1

Afin d'optimiser le protocole d'extraction décrit par Okwu et Josiah, (2006), nous avons essayé plusieurs procédés complémentaires et ce dans le but d'obtenir la poudre des saponines.

a) Evaporation au bain marie

Première extraction : A la fin de l'évaporation au bain marie à température de 90°C, on a obtenu sur le fond du Becher un précipité de couleur brunâtre et d'odeur caramel, ce qui indique que les saponines se sont caramélisées.

Cette caramélisation est due à la thermo-sensibilité des saponines qu'on veut extraire, à noter que les saponines sont des hétérosides qui se caramélisent à partir d'une température déterminée 50°C, donc on peut considérer la formation du caramel comme une confirmation quant à la présence de saponines.

Deuxième extraction : Lors de celle-ci, nous avons effectué l'évaporation à une température de 70°C, on a obtenu une poudre de 1.4 g ; mais sa couleur ne correspond pas à la couleur des saponines, comparativement à celle avancée dans la littérature.

Calcul de rendement :

$$R = 1.4 / (40 \times 100)$$

$$R = 3.5 \%$$

Le rendement d'extraction en saponines des feuilles du bouillon blanc obtenu a été de 3.5 %. Ce faible rendement comparé au rendement théorique qui est de 13.5 % peut être expliqué par l'utilisation de la filtration simple (figure 18) au lieu d'une filtration sous vide utilisée ultérieurement (figure 19), ce qui a induit à l'absorption d'un volume important de la solution par le papier filtre lors des deux filtrations, engendrant une solution faiblement concentrée en saponines.



Figure (18) : Etape de la simple filtration.



Figure (19) : Etape de la filtration sous vide.

En raison des conditions défavorables de conservation dont le milieu humide et les températures saisonnières élevées (30°C), la poudre obtenue s'est dégradée, par conséquent nous n'avons pas pu effectuer de tests d'identification. Cependant, la couleur de la poudre obtenue ne correspond pas à celle des saponines décrite dans la documentation, qui est jaune claire, ceci peut-être expliqué soit par un début de caramélisation, soit par la présence de flavonoïdes qui donnent une coloration brunâtre.

b) Evaporation au Rotavapor

Lors du chauffage à 70°C , nous avons abouti une seconde fois à une caramélisation de la solution, qui s'est collé au fond du ballon, ceci indique la thermosensibilité de notre substance également à cette température.

A 40°C , on a obtenu le même résultat précédent.



Figure (20) : Résultat de l'évaporation au Rotavapor.

L'évaporation a consacré une durée importante, ceci est dû au faible débit de la pompe utilisée.

Aucune amélioration du rendement n'a été observée sous l'effet du chauffage à basse température, mais plutôt une dégradation du composé a été détectée (figure 20). Nous avons donc décidé de ne pas utiliser les autres méthodes utilisant le chauffage pour l'extraction de cette substance.

c) Séchage à l'air libre

Après évaporation à l'air libre, on a obtenu une poudre de couleur brunâtre, goût sucré, qui se colle facilement au papier filtre, ne correspond pas tout à fait à celle décrite dans la littérature [11].

Les tests infrarouge ont été réalisés avec la poudre obtenue cependant celle-ci n'a pas résisté à l'humidité et s'est dégradé.

Le séchage à l'air libre est une méthode simple qui écarte les problèmes liés au chauffage des cristaux (Sublimation, Fusion, Décomposition). Par contre, elle est lente (Le séchage pouvant durer de quelques heures à quelques jours et ne peut être employée lorsque les cristaux sont hygroscopiques ou s'oxydent à l'air ambiant contenant de la vapeur d'eau, cette méthode ne permet pas l'élimination complète de l'humidité.

A l'issue de ces résultats, nous avons constaté la nécessité d'améliorer cette technique d'extraction et plus précisément l'étape d'évaporation utilisée qui a posé de grande difficulté pour obtenir notre poudre et de ce fait d'explorer les potentialités d'autres méthodes extractives.

d) Evaporation au lyophilisateur

Malheureusement les lyophilisateurs des laboratoires que nous avons sollicités ne fonctionnaient que pour les solvants aqueux et comme notre solvant était alcoolique, ce n'était pas possible.

Nous avons donc été obligés de travailler et de faire la caractérisation directement sur les extraits butanoliques et aqueux obtenus avec les deux protocoles d'extraction suivie en éliminant l'étape d'évaporation.

II.2. Protocole d'extraction n°2

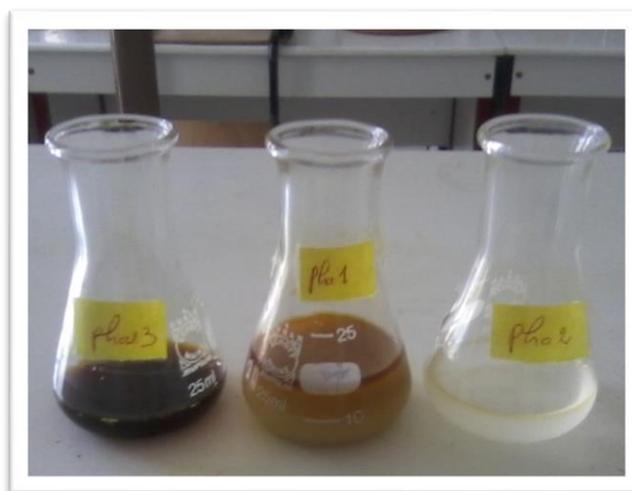
Nous avons obtenu un extrait aqueux de 6 ml de volume et un extrait butanolique de 40 ml de volume, tous deux contenant des saponines et des glucosides.

Après l'ajout du chloroforme pour l'extrait aqueux, suivi d'une décantation on obtient trois phases [49] ;

Phase 1 : phase contenant les saponines.

Phase 2 : phase contenant le chloroforme.

Phase 3 : phase contenant les flavonoïdes



Phase 3

Phase1

Phase2

Figure (21) : Résultat du 1^{er} procédé du protocole d'extraction n°2.

III. Résultats de caractérisation des saponines

III.1. Résultats des tests d'identification chimiques

III.1.1. Tests sur l'extrait aqueux

Les tests d'identification effectués sur l'extrait aqueux des fleurs de *V.thapsus* ont permis de confirmer la présence des saponines ainsi que leurs types. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau (9): Résultats des tests chimiques sur l'extrait aqueux des fleurs de *V.thapsus*

Espèce	<i>V. thapsus</i>
Organe	Feuilles
Tube N°1 (Ajout de HCl)	-
Tube N°2 (Ajout Du NaOH)	+

(+) : Présence de mousse persistante

(-) : Absence de mousse persistante

On obtient une mousse persistante (30 min) de plus de 2cm (figure 22), ce qui démontre sa richesse en saponines [47].

L'apparition de mousse dans le tube n°2 et non dans le tube n°1, indique que ces saponines sont de type triterpénique, ce résultat est conforme aux informations trouvées dans la recherche bibliographique [55].



Figure (22) :
Résultat du test d'identification sur l'extrait aqueux.

III.1.2. Tests sur l'extrait butanolique

- En ajoutant le nitrate de sodium et H_2SO_4 à l'extrait butanolique obtenu, on observe l'apparition d'une coloration rouge sang, ceci démontre la présence des saponosides[54].

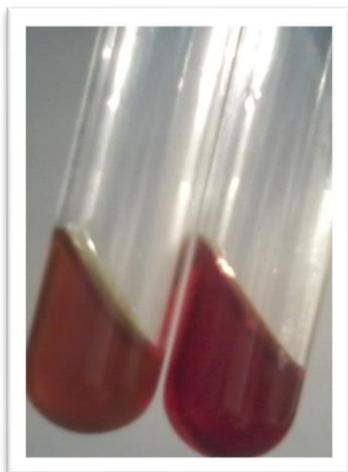


Figure (23) :
Résultat du test d'identification de l'extrait BuOH.

III.1.3. Tests sur l'extrait chloroformique

- o Le test d'identification avec la phase 1 ne donne aucune coloration – absence de saponines.
- o Le test d'identification avec la phase 2 donne une coloration marron claire – absence de saponines.
- o Le test d'identification avec la phase 3 donne une coloration rouge sang- présence de saponines.

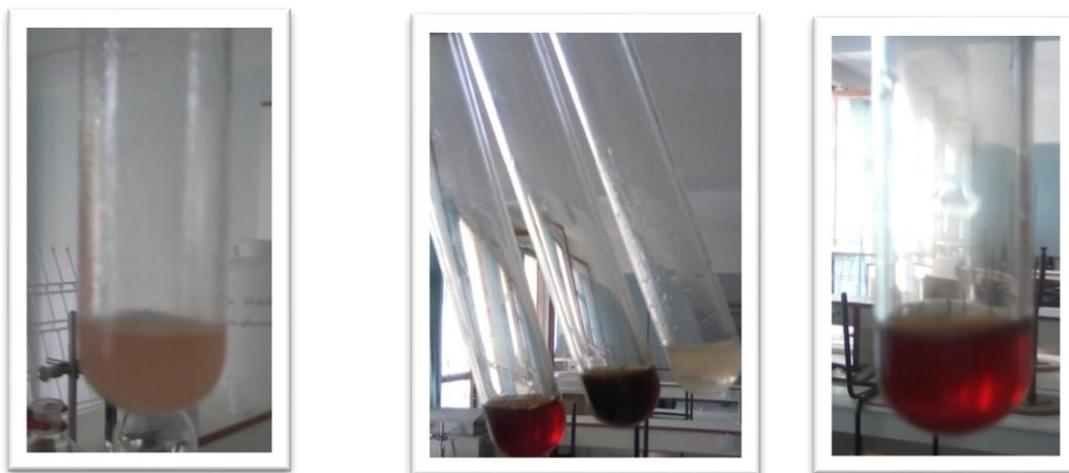


Figure (24) : Résultats des tests d'identification sur les extraits chloroformiques.

Ces résultats démontrent que les saponines se trouvent dans la phase 3 où est supposé être les flavonoïdes et non dans la phase 2 comme l'indique la recherche bibliographique.

➤ **Caractérisation des flavonoïdes**

Afin de s'assurer que la phase 3 est dépourvue de flavonoïdes, on a réalisé ce test de caractérisation et il s'avère qu'elle en est dépourvue car la réaction à la cyanidine n'a donner aucune coloration [50].



Figure (25) : Résultat de la caractérisation des flavonoïdes.

III.2. Résultats des techniques d'analyse

III.2.1. Résultats des techniques spectroscopique

a. UV-Visible

Les spectres d'absorption en UV-visible des extraits aqueux et alcoolique ainsi que la saponine témoin ont été obtenus par un balayage spectral entre 200 et 300nm.

1- Le témoin

Ce spectre (figure 26) montre deux longueurs d'onde du maximum d'absorption 205 nm et 289.28 nm.

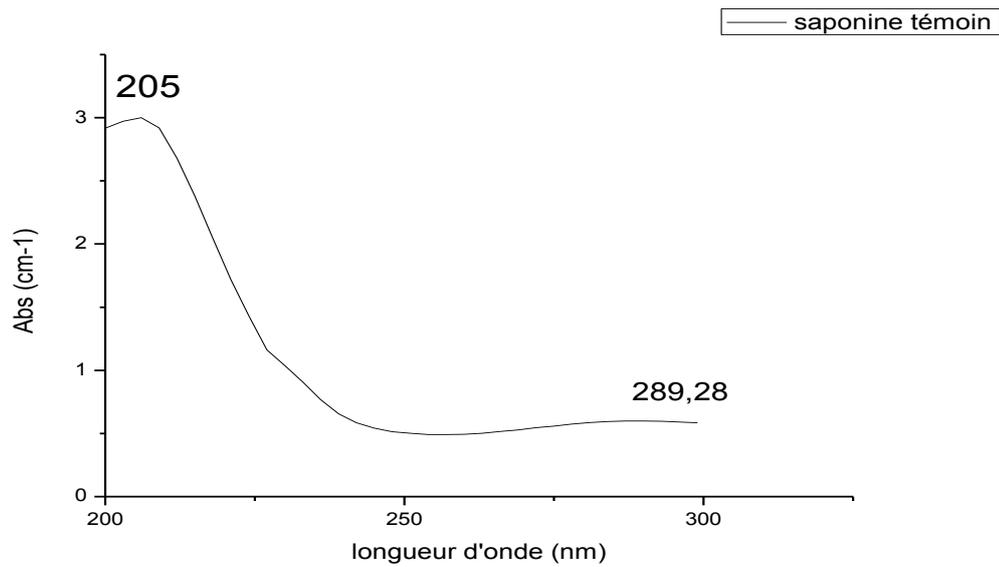


Figure (26) : spectre d'absorption en UV-visible de la saponine témoin.

2- L'extrait aqueux :

Le spectre (Figure 27) montre la longueur d'onde du maximum d'absorption à 202nm et à ~262 nm

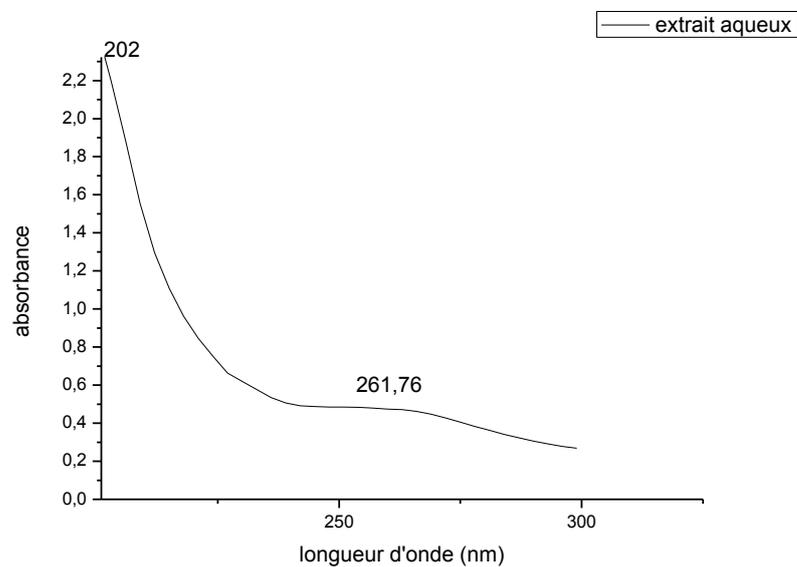


Figure (27) : spectre d'absorption en UV-visible de l'extrait aqueux.

3- L'extrait butanolique :

Le spectre (Figure 28) montre la longueur d'onde du maximum d'absorption à 293nm.

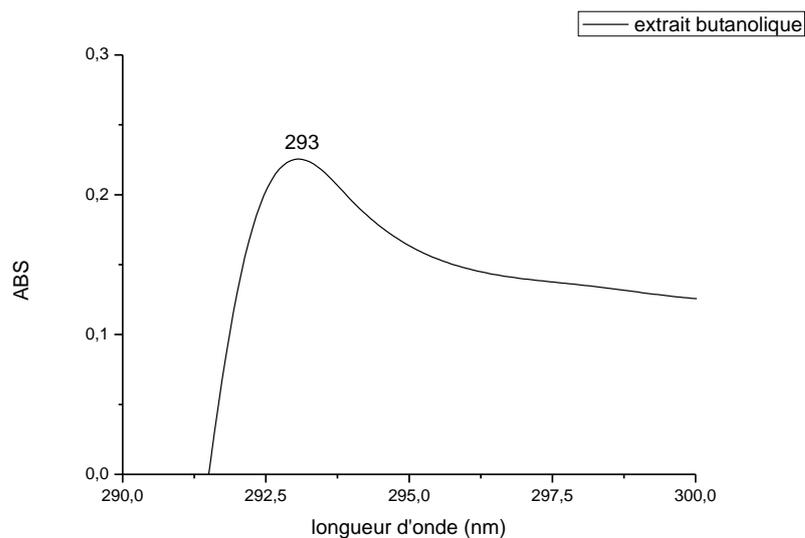


Figure (28) : Spectre UV-Visible de l'extrait butanolique.

Une simple comparaison entre les deux spectres d'extrait aqueux et l'extrait butanolique avec le spectre de la saponine témoin montre que l'extrait aqueux contient un type des saponines qui absorbe à 203nm et l'extrait butanolique contient un autre type qui absorbe à 293nm

b. Infrarouge

Des études par spectroscopie-infrarouge ont été effectuées sur un spectromètre à la température ambiante (nombre d'onde compris entre 400 et 4000 cm^{-1})

1- L'échantillon de la poudre saponine :

Le spectre infrarouge est représenté sur la figure (29). Les bandes les plus intenses sont reportées dans le tableau 10.

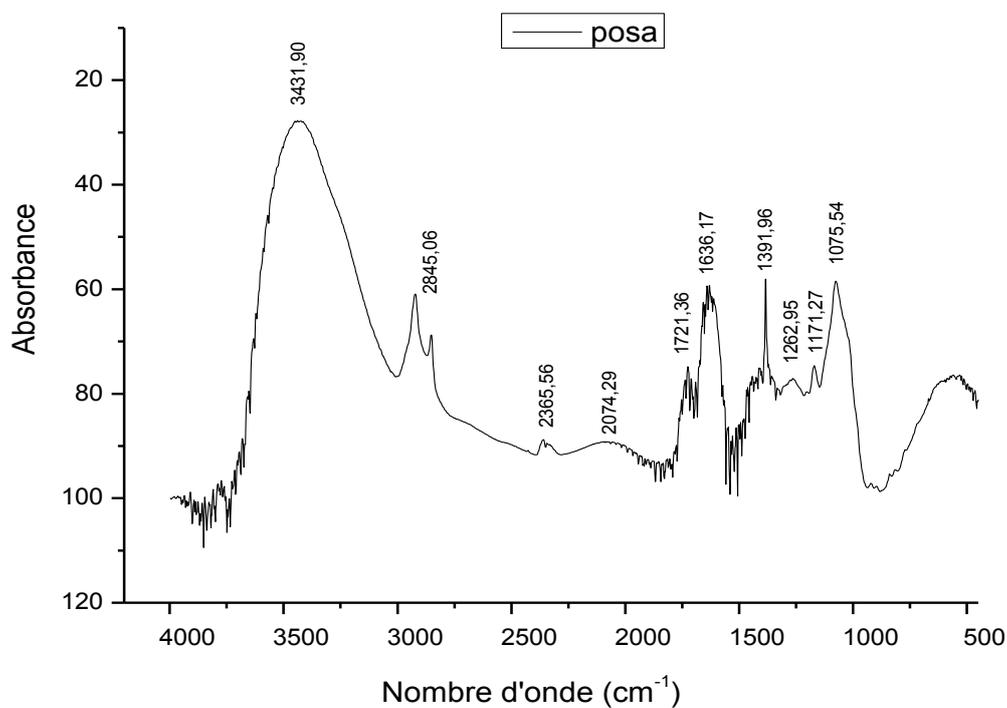


Figure (29) : Spectre infrarouge de la poudre de saponine obtenue.

Tableau (10) : Bandes IR observées dans le spectre de la poudre de la saponine.

Position de bande (cm⁻¹)	Attribution
3431.90	vibration d'élongation O - H
2926.20 ; 2845.06	vibrations d'élongation des C- H aliphatiques
2074.29	Vibrations d'élongation des C≡C des alcynes
1721.36	vibrations d'élongation de C=O des cétones ou des aldéhydes aliphatiques.
1633.17	vibrations des liaisons C=C dans les cycles aromatiques.
1391.96	vibrations de déformation de O – H ; vibrations de déformation des CH dans CH ₃
1262.95	élongation de C – O dans le groupe acide
1171.27 ; 1075.54	élongation de C – O dans les alcools tertiaires et secondaires

2- L'échantillon de l'extrait butanolique des saponines :

Le spectre infrarouge est représenté sur la figure (30). Les bandes les plus intenses sont reportées dans le tableau 11.

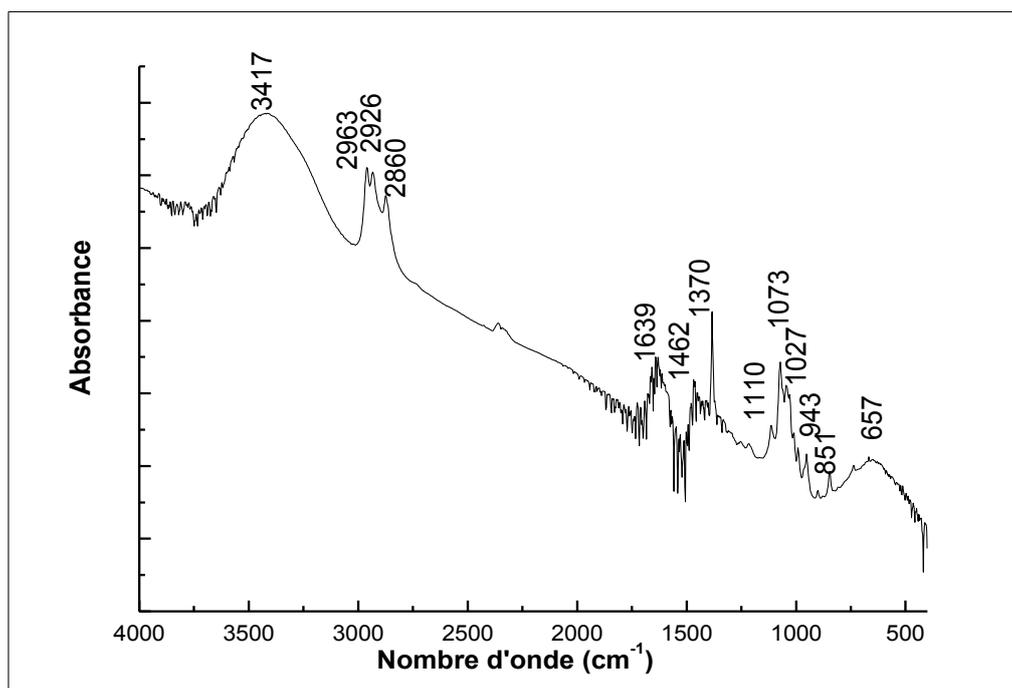


Figure (30) : Spectre infrarouge de l'extrait butanolique des saponines

Tableau (11) : Bandes IR observées dans le spectre de l'extrait butanolique de la saponine.

Position de bande (cm⁻¹)	Attribution
3417	vibration d'élongation O – H
2963 ; 2926 ; 2860	vibrations d'élongation des C- H aliphatiques
1639	vibrations des liaisons C=C dans les cycles aromatiques.
1462	Vibration d'élongation C – C dans les cycles aromatiques
1370	vibrations de déformation de O – H ; vibrations de déformation des CH dans CH ₃
1110 ; 1073 ; 1027	élongation de C – O dans les alcools tertiaires et secondaires

1- L'échantillon de l'extrait aqueux des saponines :

Le spectre infrarouge est représenté sur la figure (31). Les bandes les plus intenses sont reportées dans le tableau 12.

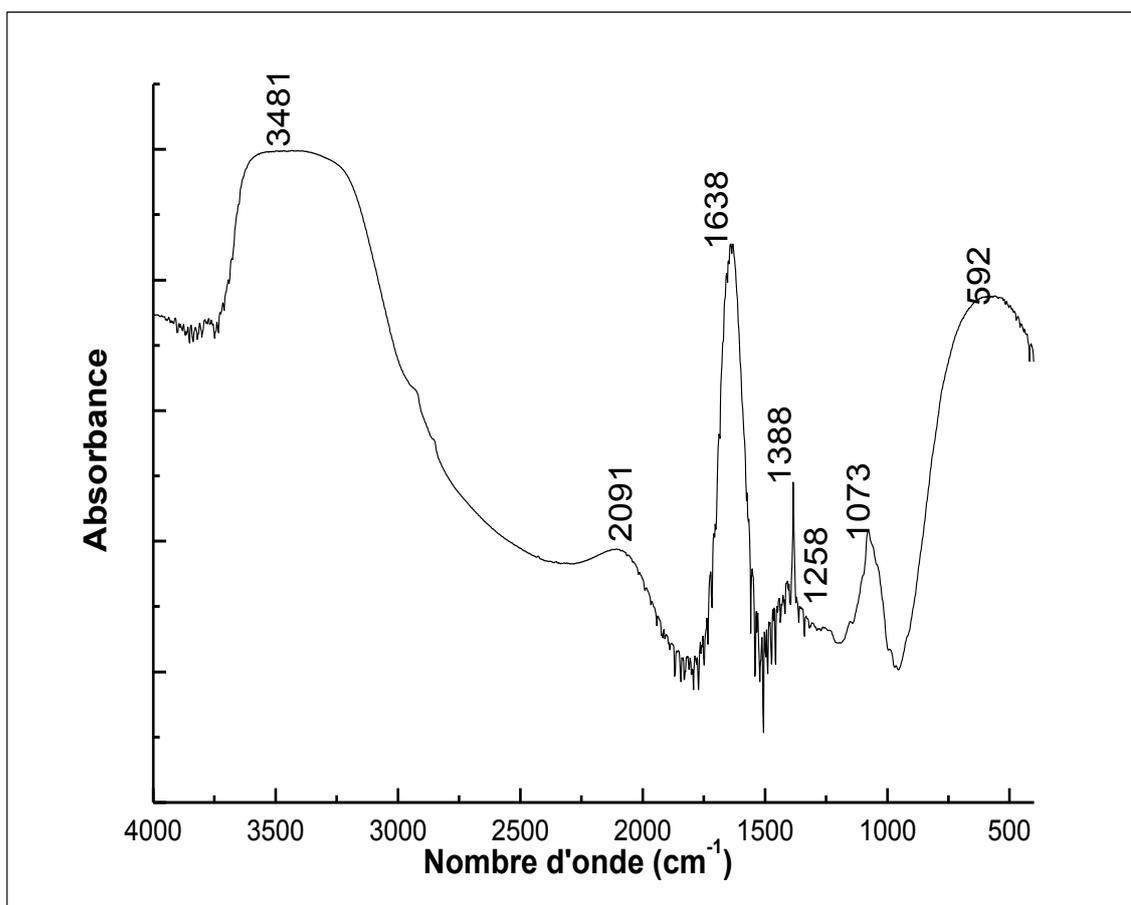


Figure (31) : Spectre infrarouge de l'extrait aqueux des saponines.

Tableau (12) : Bandes IR observées dans le spectre de l'extrait aqueux de la saponine.

Position de bande (cm⁻¹)	Attribution
3481	vibration d'élongation O - H
2091	Vibrations d'élongation des C≡C des alcynes
1638	vibrations des liaisons C=C dans les cycles aromatiques.
1388	vibrations de déformation de O - H ; vibrations de déformation des CH dans CH ₃
1258	élongation de C - O dans le groupe acide
1073	élongation de C - O dans les alcools tertiaires et secondaires

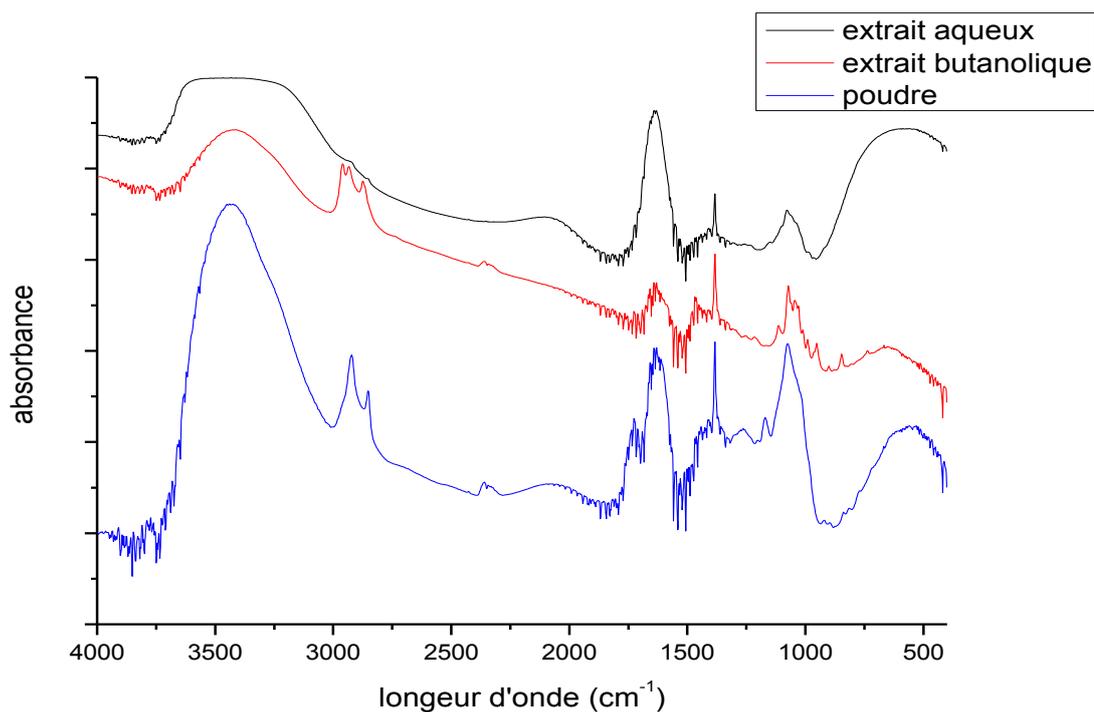


Figure (32) : Spectre infrarouge des extraits aqueux, butanolique, et la poudre des saponines.

La comparaison des trois spectres IR des extraits aqueux, butanolique et de la poudre de la saponine nous permet de tirer les remarques suivantes :

- Une superposition entre les trois spectres
- Présence des bandes à 2800-2900 représentant les vibrations d'élongation des C- H aliphatiques dans le spectre de la poudre et de l'extrait butanolique et pas dans l'extrait aqueux
- La bande de vibration d'élongation de l'hydrogène de l'eau à 3600 – 3300 cm^{-1} est très large dans l'extrait aqueux

On se référant à la structure chimique générale des saponines (Figure 33) on peut conclure que les trois échantillons analysés : l'extrait alcoolique, l'extrait aqueux et la poudre représentent la substance recherchée qui est la saponine.

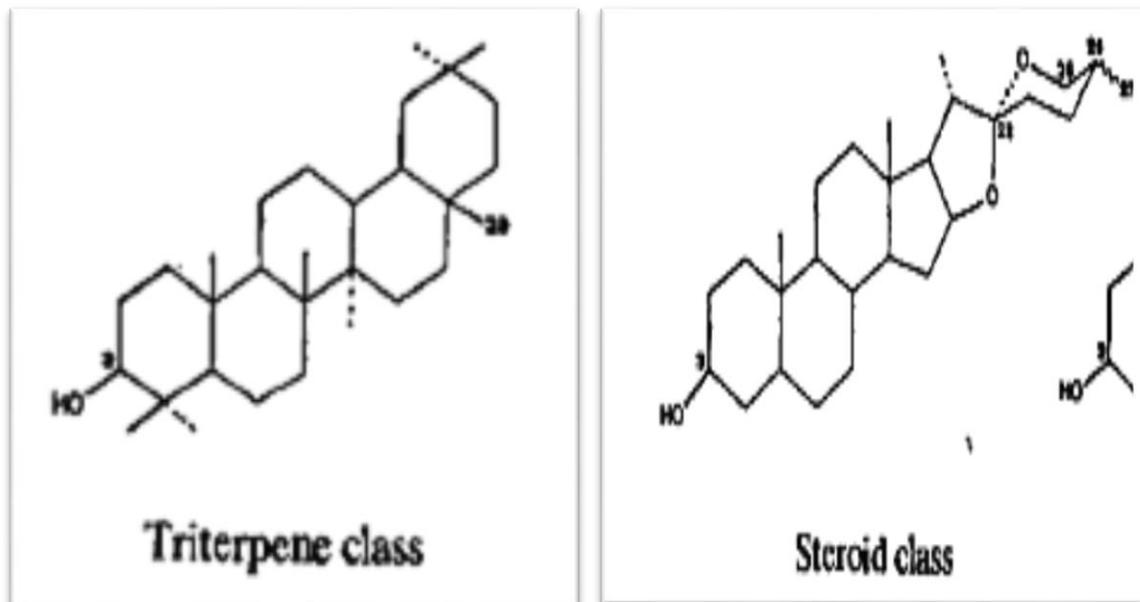


Figure (33) : Structure chimique générale des saponines triterpéniques et stéroïdiennes.

III.2.2. Résultat des techniques chromatographiques

a. La CCM

La CCM réalisée au laboratoire de chimie analytique de la faculté de médecine de MOULOU D MAMMERI nous a permis de contrôler la qualité de nos différents extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extraits (coloration, facteur de rétention...).

L'analyse par CCM des extraits butanoliques a donné trois spots de diverses couleurs (bleu, bleu violacé, rouge) et de différents facteurs de rétention (R_f) (figure 34). Les couleurs des bandes obtenues sont toutes de couleurs caractérisant les saponines.

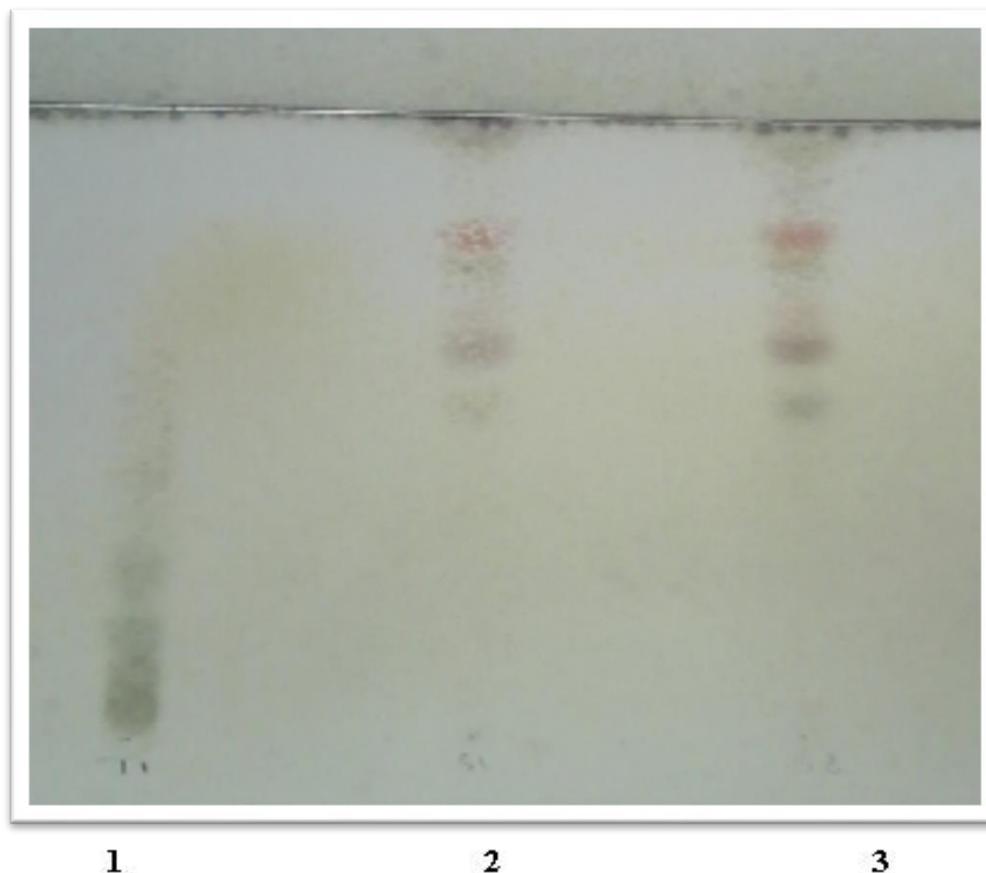


Figure (34) : Photos des chromatogrammes résultant de l'analyse des extraits BuOH de *V. Thapsus*.

- 1 : Témoin
- 2 : extrait butanolique 1
- 3 : extrait butanolique 2

Le tableau suivant présente les résultats obtenus :

Tableau (13) : Résultat de la CCM des extraits butanolique (Eluant : DCM/CH₃COOH glacial/MeOH/ H₂O (64:32:12:8))

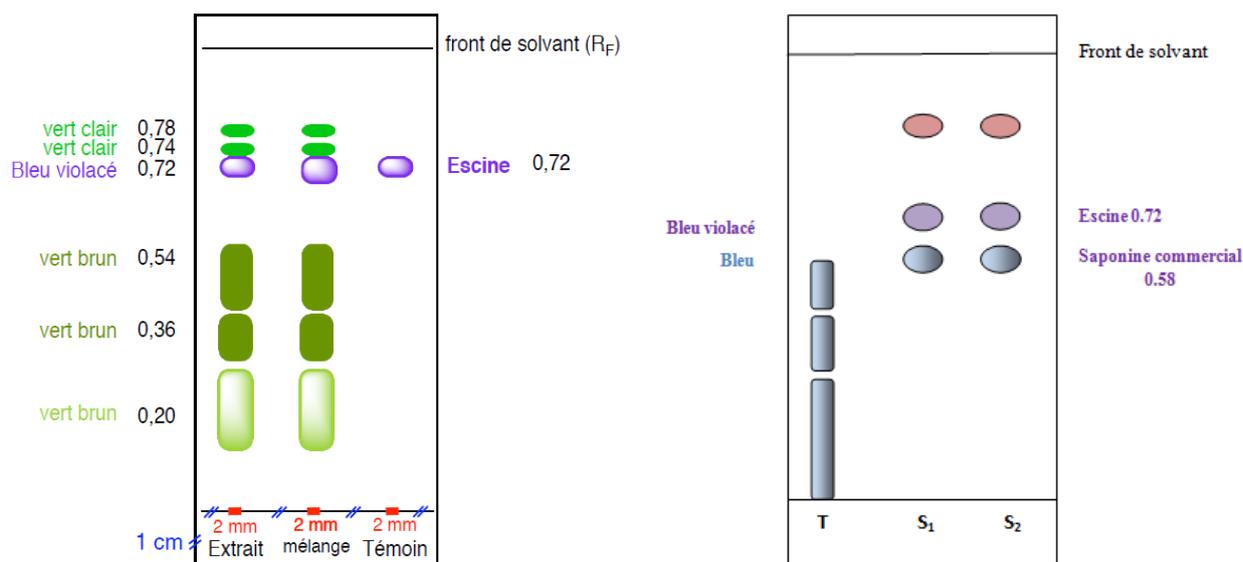
Ext.but 1	R_f	0.58	0.72	0.85
	Couleur	bleu	bleu violacé	rouge
Ext.but 2	R_f	0.58	0.72	0.85
	Couleur	bleu	bleu violacé	Rouge
Témoin	R_f	0.58		
	Couleur	bleu		

Le protocole utilisé nous a permis d'avoir une bonne séparation et une visibilité acceptable des spots. L'extrait chloroformique a été éliminé du fait qu'ils donnent une tâche diffuse massive dû sûrement à la présence de tanins ou de flavonoïdes qui sont de couleur brunâtre.

On remarque sur la plaque CCM que les deux extraits alcooliques donnent 3spots de même couleurs et de même rapports frontaux ; une tache d'une couleur bleu avec Rf de 0.58, une tache bleu violacé de Rfégale à 0.72, et une tache rouge avec un Rf de 0.85 ce qui prouve que les deux protocoles suivis donnent des extraits d'une composition identique

En comparant maintenant entre l'extrait alcoolique et le témoin on remarque que même le témoin représente 3spots mais les rapports frontaux sont différents. On remarque que ce témoin est caractérisé aussi par une tache bleue de mêmeRf que l'échantillon. De ce fait on conclut que les extraits alcooliques de notre extraction contiennent plusieurs types de saponines

Afin d'identifier les espèces contenues dans les extraits butanoliques, on a comparé les rapports frontaux (Rf) et les couleurs des spots avec les données trouvées dans la littérature et avecun témoin disponible au CHU de Tizi Ouzou : Saponinwei B rein erg B 6 MERCK.



CCM de l'extrait saponosidique de marron d'inde. *V. Thapsus* et du témoin.

CCM des extraits butanoliques de *V. Thapsus* et du témoin.

Figure (35) : Plaque CCM des saponines prises comme références.

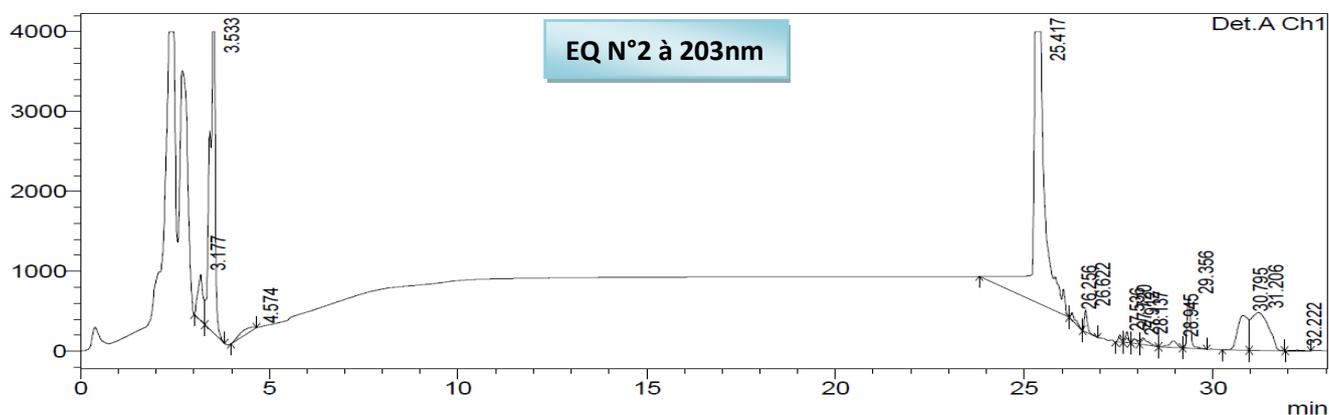
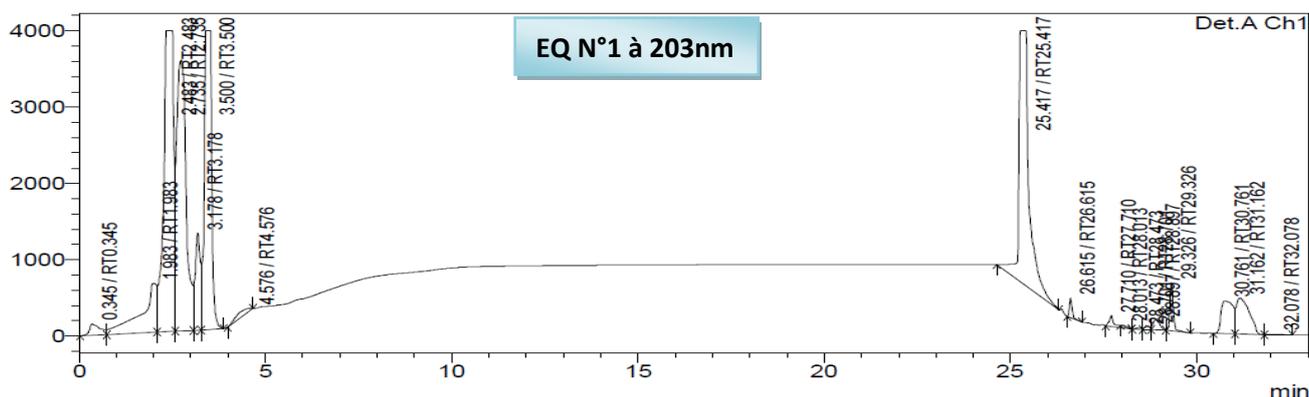
D'après la CCM de l'extrait saponosidique de marron d'inde [24], l'Escine est caractérisée par une tache bleu violacé avec un Rf de 072 ce qu'on trouve sur notre plaque CCM pour les deux échantillons butanoliques.

La CCM comparative nous a permis de prouver que notre extrait contient l'escine et la tache bleu semble correspondre à la saponine commerciale utilisée comme témoin. Cependant, le type de la saponine qui donne la bande rouge reste inconnue.

b. La HPLC

- **Résultats des extraits aqueux**

La figure (36) représente les quatre chromatogrammes des extraits aqueux de premier et de deuxième protocole d'extraction et à des longueurs d'ondes 203nm et 210nm.



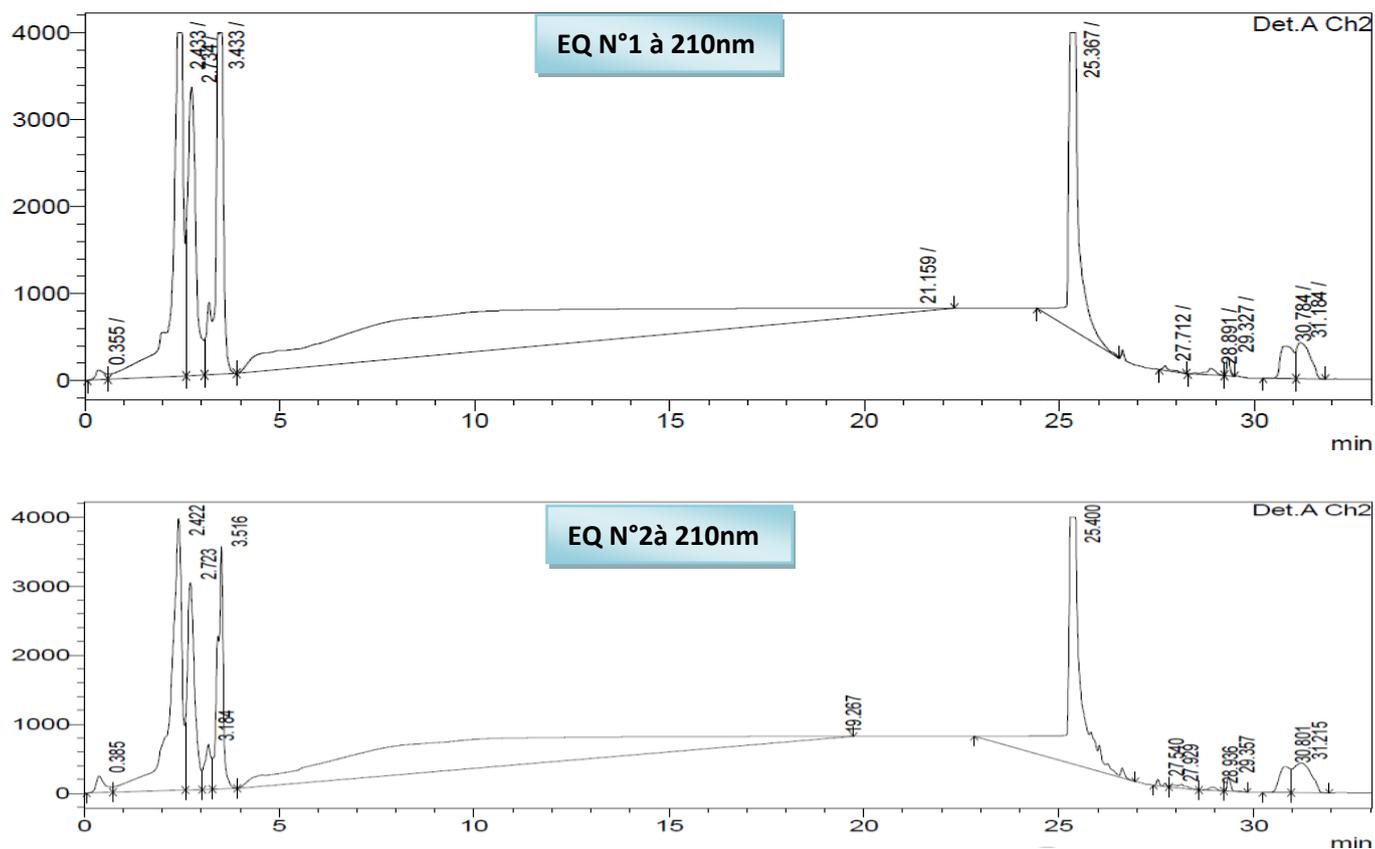


Figure (36): Chromatogrammes des extraits aqueux à 203nm et 210nm.

• **Interprétation**

D'après la figure (36) on tire les remarques suivantes :

- ✓ A 203nm les deux chromatogrammes du 1^{er} et du 2^{ème} extrait sont presque identiques
- ✓ La même remarque pour les deux extraits à 210nm
- ✓ En comparaison entre les deux longueurs d'onde, le nombre de produits détectés à 203 nm est supérieur à celui identifiés à 210 nm.

• **Résultats des extraits butanoliques**

La figure (37) regroupant les quatre chromatogrammes des extraits alcooliques de premier et de deuxième protocole d'extraction à des longueurs d'ondes de 203nm et 210nm.

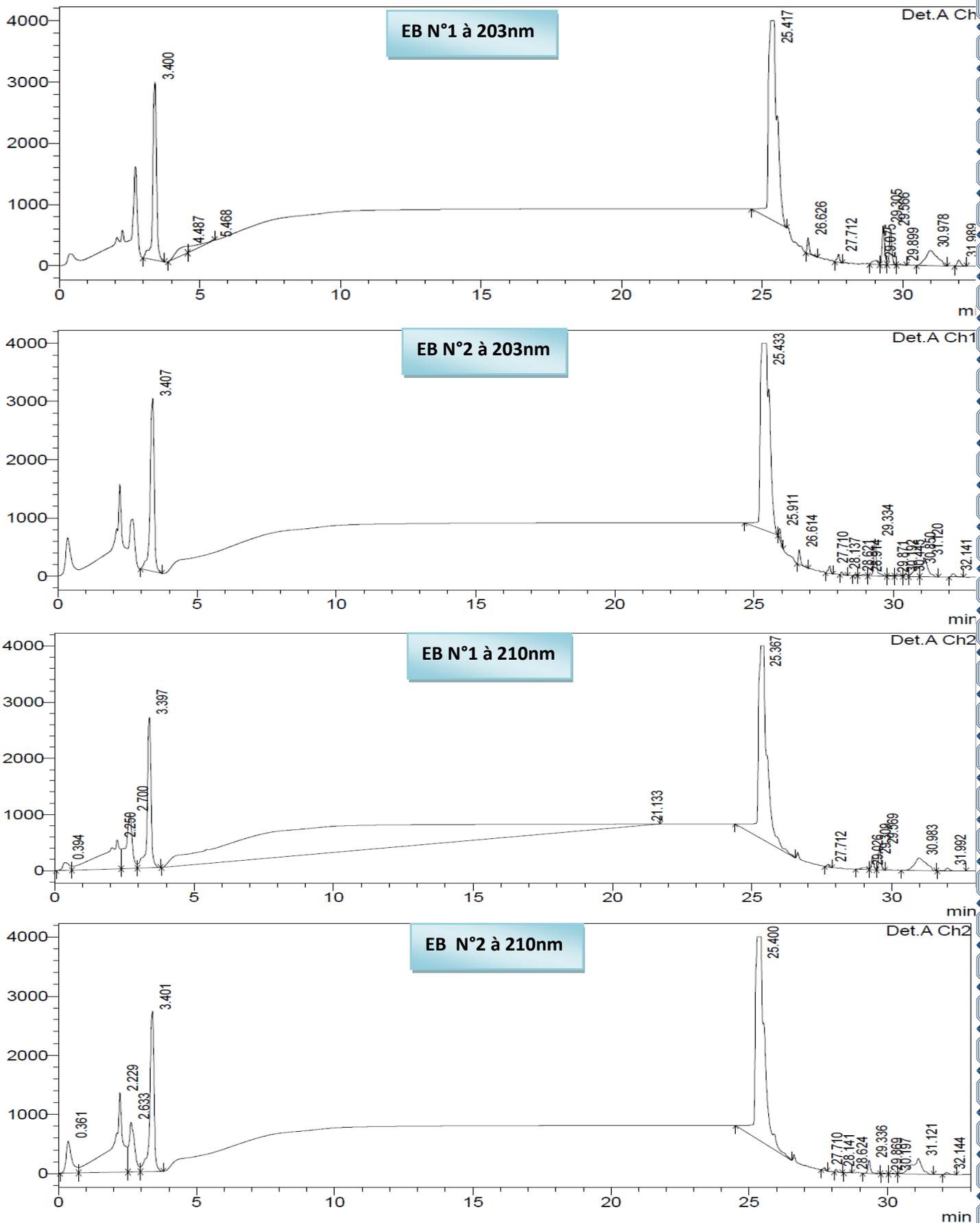


Figure (37) : Chromatogrammes des extraits butanologiques à 203 nm et 210nm

• **Interprétation**

La figure (37) nous permet de tirer quelques remarques :

- ✓ A 203nm les deux chromatogrammes du 1^{er} et du 2^{ème} extrait sont identiques
- ✓ La même remarque pour les deux extraits à 210nm
- ✓ En comparaison entre les deux longueurs d'onde, le nombre de produits détectés à 203 nm est supérieur à celui identifiés à 210 nm.
- ✓ Deux produits majoritaires ont été identifiés à $t_r = 3.4$ min et à 25.4 min.

• **Résultats de la saponine témoin**

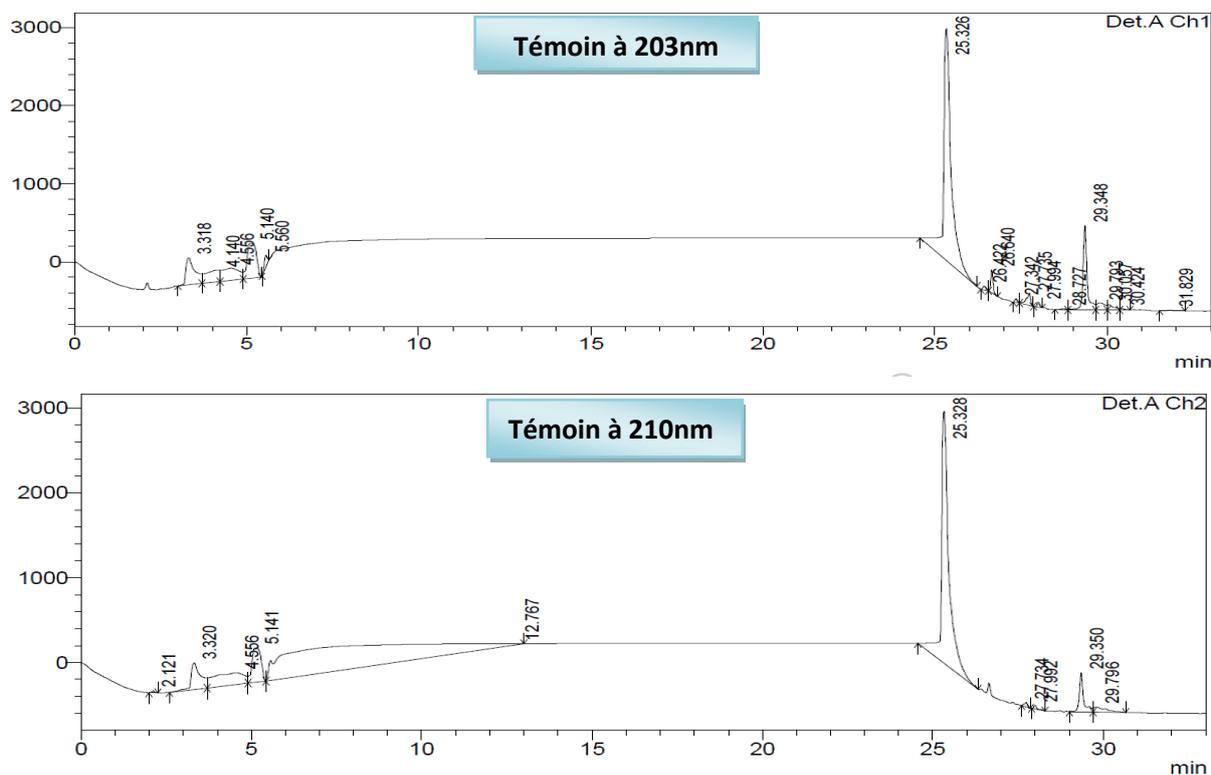


Figure (38) : Chromatogrammes de la saponine témoin à 203 nm et 210nm

• **Interprétation**

Le chromatogramme de la saponine témoin donne un seul pic identifié à $T_r=25,4$ min, et cela avec les longueurs d'onde 203 nm et 210 nm.

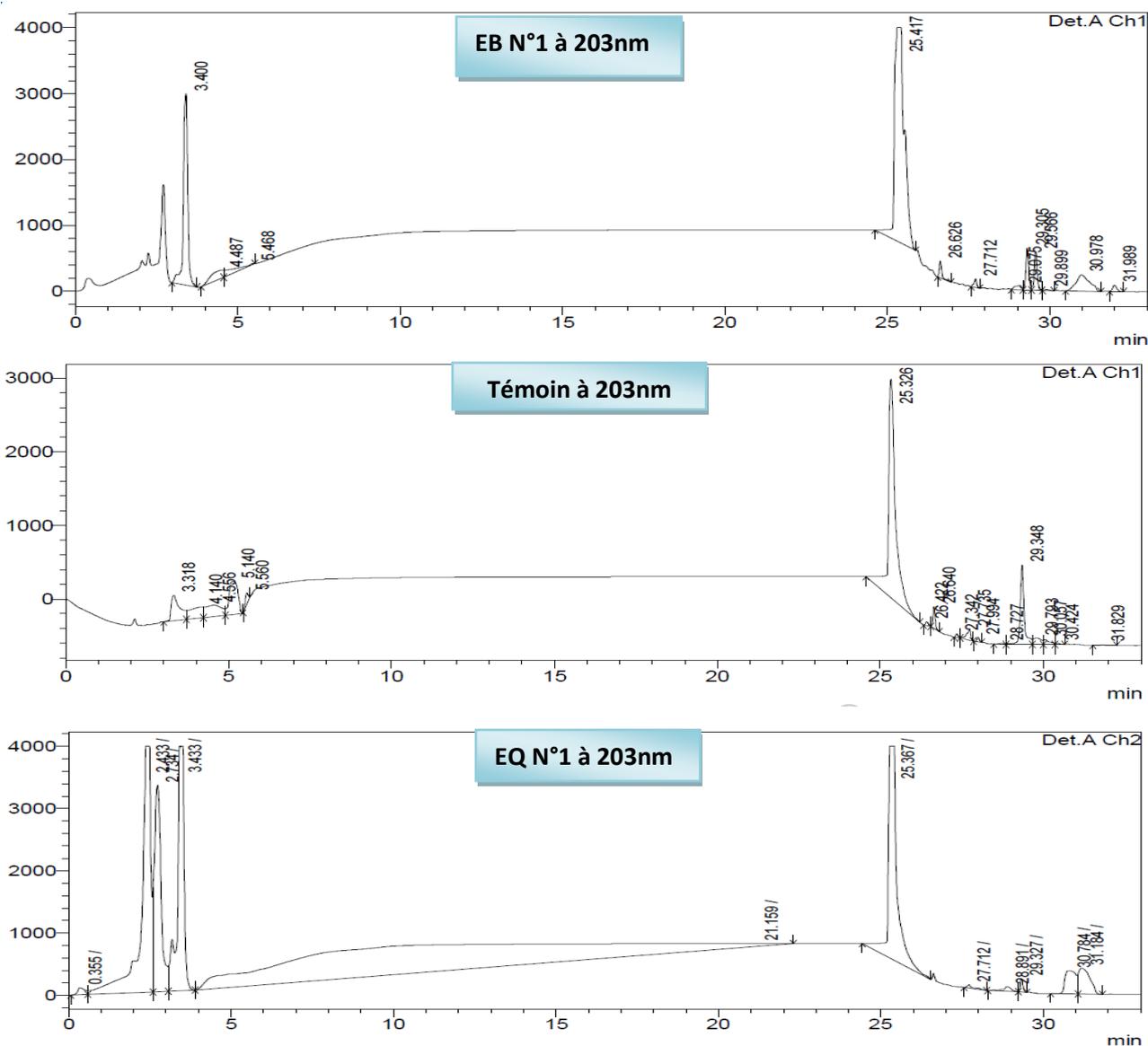


Figure (39) : Comparaison entre les échantillons et le témoin à 203nm.

La comparaison entre l'un des chromatogrammes des extraits aqueux et l'un des chromatogrammes des extraits alcooliques montre que les extraits aqueux ont permis d'extraire 15 composants alors que les extraits butanoliques ont permis d'extraire 12.

La comparaison entre l'un des chromatogrammes des extraits aqueux et l'un des chromatogrammes des extraits alcooliques avec les chromatogrammes de la saponine témoin donne :

✓ A 203nm (Figure 39): la partie droite du chromatogramme est identique entre les deux extrait aqueux et alcoolique avec le témoin, et produit majoritaire est identifier au même temps de rétention ~ 25.4min.

Dans la partie gauche du chromatogramme, on note un autre produit majoritaire à $t_r = 3.4$ min dans les échantillons et pas dans le témoin ce qui confirme les résultats de la CCM.

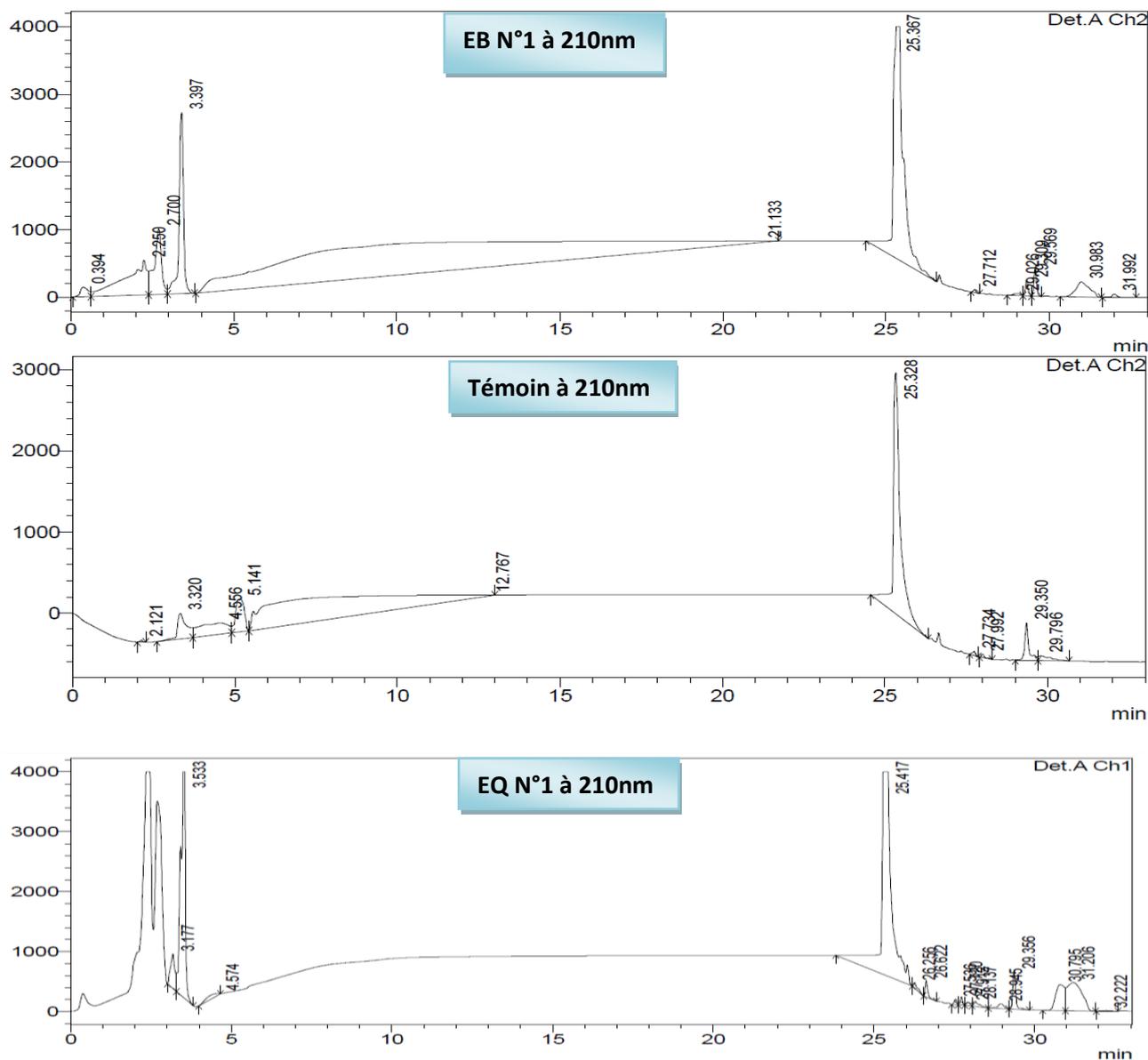


Figure (40) : Comparaison entre les échantillons et le témoin à 210 nm.

✓ A 210nm (Figure40) : les mêmes remarques signalées à 203nm

Cette analyse nous a permis de faire une étude qualitative de nos extraits. Les deux échantillons aqueux et alcoolique contiennent un composé de saponines, l'un des composés est identifié à $t_r = 25.4$ min de même que dans le témoin et un composé identifié à $t_r = 3.4$ min.

Qualitativement, l'EQ est plus riche en composés que l'EB pour les 2 longueurs d'ondes d'absorption des saponines, ceci signifie que l'EB a permis d'extraire les saponines d'une façon plus pure.

On peut conclure que nos extraits butanolique et aqueux contiennent majoritairement des saponines et cela a été détecté à deux longueurs d'onde.

III.3. Résultats de l'activité biologique

III.3.1. test hémolytique

Après l'agitation, on a obtenu un surnageant de couleur rouge limpide et un dépôt de globules rouges au fond du tube (figure 41), ceci est caractéristique d'une hémolyse partielle en présence des saponines. Le résultat ainsi obtenu confirme l'activité hémolytique de l'extrait aqueux des feuilles de *V. Thapsus* et de ce fait leur présence dans l'extrait aqueux.



Figure (41) : Résultat sur l'activité hémolytique des saponines dans l'extrait aqueux.

En raison de ce pouvoir hémolytique, aucune saponine ne peut être injectée par voie intraveineuse.

III.3.2. Test microbiologique

Après 24 heures d'incubation, nous n'avons remarqué aucune zone d'inhibition autour du disque, cela veut dire soit qu'il n'y a pas d'effet antimicrobien ce qui indique que ces trois bactéries sont résistantes aux substances végétales contenues dans l'extrait testé, soit l'extrait utilisé pour faire le test microbiologique était trop dilué.



E. Coli



S. Aureus



P. aerogenosa

Figure (42) : Images correspondants aux boites de pétris de l'activité antimicrobienne de l'EQ sur les bactéries utilisées.

Au-dessous des disques, on a constaté qu'il n'y a aucune prolifération des germes de *E.coli* et *S.aureus*. Alors Qu'on observe une croissance normale des *P.airogenosa*. Ceci peut être expliqué par une faible activité antimicrobienne de l'extrait testé au deux premiers germes et sa sensibilité au *P.aerogenosa*.

Cette faible activité est sûrement due au faible rendement en saponines ; de la faible concentration des saponines dans l'extrait aqueux utilisé.

Conclusion

Dans le souci d'améliorer la qualité du médicament nous avons réfléchi à un moyen d'obtenir des produits cent pour cent naturel, étant donné que dans la plus part des formulations nous sommes dans l'obligation d'avoir recourt à des tensioactifs synthétiques qui peuvent par accumulation causer des problèmes de santé majeurs tel que les cancers, nous avons donc essayé d'extraire un tensioactif d'origine naturel qui est la saponine.

La fleur de *Verbascum thapsus* est révéler l'une des organes végétaux les plus riches en saponines vu l'indice de mousse relativement élevé qu'on a trouvé. Ceci pourrait être exploité pour obtenir de meilleur rendement d'extraction.

Une étude comparative de deux techniques d'extraction a été réalisé pour *V. thapsus*, l'étape d'évaporation préconisée dans le premier protocole a posé un grand problème du fait que ces molécules se retrouvent sous la forme de mélanges complexes, plusieurs séparations sur différents supports solides doivent être effectuées pour parvenir au résultat escompté. De plus, la forte polarité, la relative fragilité et les différences structurales mineures entre des composés de masse moléculaire élevée font qu'il est souvent long et difficile d'obtenir une saponine pure et homogène. Aussi, ces molécules cristallisent très mal en raison de leurs propriétés hygroscopiques. Cela nous a freiné dans notre lancée et empêchés d'aboutir à une poudre non dégradable de saponines qui allait nous permettre de formuler une émulsion et donc de confirmer la possibilité d'utilisation de ce tensioactif dans le domaine du médicament et éviter les méfaits des tensioactifs synthétiques, une lyophilisation nous aurais cependant facilité la tâche car c'est la meilleur technique pour aboutir à la poudre de saponines.

Toutefois, nous avons réussi à faire une étude qualitative des extraits aqueux et alcooliques obtenus en utilisant différentes techniques d'analyses spectroscopique et chromatographique ce qui nous a confirmé la nature de nos extraits en comparaison avec une saponine témoin.

Cependant, une étude quantitative des saponines de la plante *V. thapsus*, est recommandée pour finaliser le travail réalisé, cette étude peut notamment être réalisée grâce à la spectroscopie de masse ou la RMN.

Références

1. **Boutaghane N (2013)**. Etude phytochimique et pharmacologique de plantes médicinales algériennes *Genista ulicina* Spach (Fabaceae) et *Chrysanthemum macrocarpum* (Sch. Bip.) Coss. & Kralik ex Batt (Asteraceae). Doct. Chimie Pharmaceutique. Université de Constantine 1. faculté des sciences exactes. Département de Chimie.
2. **Hopkins G (2003)**. Physiologie Végétale. 2^e édition. De Boeck. pp.273-274.
3. **Khenaka K (2011)**. Effet de divers plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Magister de Biotechnologie Microbienne. Université de Mentouri Constantine. Département de biochimie et de microbiologie.
4. **Gouvenel Jean-Philippe (2007)**. Rapport de stage industriel en entreprise Techniques et méthodes d'extraction des composés actifs de la plante *Terrestris Tribulus L*. Génie des Procédés. Université Henri Poincaré Nancy.
5. **ARRIF S (2009)**. Etude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre *Verbascum*: *V. ballii* et *V. dentifolium*. DOCT. Chimie. Université El Hadj Lakhdar-Batna Faculté des sciences – Département de Chimie.
6. **Leray C (2012)**. Les lipides dans le monde vivant : Introduction à la lipidomique. Lavoisier. pp. 112-116.
7. **Bruneton J (2009)**. Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales : Saponosides. 4^e Ed. Lavoisier. pp.129, 811-815.
8. **Guy Beddos KOUGAN NKWOKAP (2010)**. Isolement et caractérisation des saponosides de trois plantes de la famille des *araliaceae* et *dracaenaceae* et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales. DOCT. Pharmacie. Université de bourgogne UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques.
9. **Sofowora A (2010)**. Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Suisse : édition KARTHALA. pp.213.
10. **Kjellin M., Johansson I (2010)**. Surfactants from renewable Resources. Edition John Wiley & Sons. pp.240.
11. **Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.-H et Journet M (1995)**. Nutrition des ruminants domestiques: Ingestion et digestion. Paris : INRA. pp.58.

12. **Hostettmann JA Marston (1995)**. Classes des saponines, Chemistry and pharmacology of naturel products, saponins, Cambridge University Press, First published 1995.
13. **Kambouche N.,Merah B.,Derdour A ., Bellahouel S., Benziane M.M (2009)**. Etude de l'effet antidiabétique des saponines extraites d'*Anabasis articulata* (Forssk) Moq, Plante utilisée traditionnellement en Algérie. *Phytothérapie*. 7 : 197-201.
14. **CHARLES GAUTHIER (2006)**. Glycosidation de triterpènes pentacycliques de type Lupane et évaluation in vitro de leur potentiel anticancéreux. Maitrise. Science. l'Université du Québec à Chicoutimi.
15. **Eleutéro M.I (2006)**. Synthesis of active analogs of adjuvant Quillaja saponins in order to determine the structure- activity Correlation Studies towards the synthesis of QS -21. Cuvillier Verlag Göttingen. pp.248.
16. **S. Aubert M. C. Daunay et E. Pochard (1989)**. Amélioration des plantes : Saponosides stéroïdiques de l'aubergine (*Solanum melongena L.*). *Agronomie*. 9, 641-651.
17. **Khentoul Halima**. Contribution à l'étude phytochimique et biologique de *verbascum atlanticum* batt. Magister. Chimie. université Constantine 1 faculté des sciences exactes Département de Chimie.
18. **Boullard B (2001)**. Plantes medicinales du monde :Réalités et Croyance (Dictionnaire). Paris : ISTEM. pp.1153-1154.
19. **MARCHIN Jérôme (2012)**. Monographie Culturelle du genre « *Verbascum* ». Certificat de spécialisation de Plantes à Parfums, Aromatiques et Médicinales. Agrobiologie.
20. **Stéphanie SCHAAL (2010)**. Les plantes médicinales des pelouses calcaires de la Réserve Naturelle de Montenach. DOCT. Pharmacie. Université Henri Poincare – Nancy 1 Faculté de Pharmacie.
21. **J. Bottet (2001)**. Larousse Encyclopedia of Medicinal Plants. 2nd edition. Londres. Andrew Chevallier.
22. **Boullard B (2006)**. Plantes et arbres remarquables des rues, squares et jardins de Rouen : Itinéraires d'un amoureux de la nature. AREHN. pp.129-130.
23. **Lacoste S (2014)**. Ma bible de la phytothérapie : le guide de référence pour se soigner avec les plantes. *Quotidien Malin*. pp.89-90.
24. **V. Vogt, C. Cravero, C. Tonn, L. Sabini, S. Rosas (2010)**. *Verbascum thapsus*: Antifungal and phytotoxic properties. *IDECEFYN* vol 20, 105-108.

25. **Georges Robinet F (1951)**. Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse. DOCT. Chimie. Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich.
26. **Debbache NADRA (2005)**. Phototransformation de tensioactifs anioniques induite par les sels de fer (III) en solution aqueuse. DOCT. Chimie. Université Mentouri Constantine.
27. **Allo O., Pascale B., Dalmaso M-A (2005)**. Cahiers du préparateur en pharmacie : pharmacie galénique B.P.2^e édition. Groupe Laisons. pp.99.
28. **Alain Le Hir et All (2009)**. Pharmacie galénique : Bonnes pratiques de fabrication des médicaments. 9^e édition. Elsevier Masson.
29. **Nau F., Guerin-Dubiard C., Baron F., Thapon JL (2010)**. Science et technologie de l'œuf : de l'œuf aux ovoproduits « volume 2 ». Paris : Lavoisier. pp.406-407.
30. **Raison-Peyron N (2011)**. Progrès en Dermato-Allergologie. Montpellier. Edition John Libbey.
31. **Belhadj M (2013)**. Structure et interactions d'un système micellaire non ionique fluore par diffusion de neutrons aux petits angles. Magister. Chimie physique. Université d'Oran, Département de Chimie.
32. **Tharwat F.Tadros (2005)**. Applied Surfactants: Principles and Applications. Germany: Wiley-VCH Verlag. pp.2-14.
33. **Myers D (2006)**. Surfactant Science and Technology. 3^e édition. Canada: John Wiley. pp.47-78.
34. **Jean-Luc WERTZ. 2012**. Aperçu sur les biotensioactifs et les biosolvants. Document FARR-Wal – Avec le soutien de la Région Wallonne – DGO3/4.
35. **M.-C. Martini (2008)**. Cosmétologie : BTS Esthétique-cosmétique. 2^{ème} édition. Elsevier Masson SAS.
36. **Briant J (1989)**. Phénomènes d'interface agents de surface : principe et modes d'action. Publication de l'institut français du pétrole. Paris : Editions TECHNIP. pp.72-73.
37. **Ghezouali C (2010)**. Interactions des Polyélectrolytes Complexes Tensioactifs. Magister. Chimie et Physico-chimie Organique Macromoléculaires. Université Abou-Bakr Belkaid –Tlemcen.
38. **Nogueira D (2005)**. Extraction à deux phases aqueuses à l'aide d'alcools polyéthoxyyles en vue de l'élimination de polluants organiques et d'ions métalliques. DOCT. Sciences des procédés. Institut national polytechnique de Toulouse.

- 39. Reynal B., Multon JL (2009).** Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. 4^e édition. Lavoisier pp.473-474.
- 40. Vermout S., Denis M., Losson B., Mignon B.** Choix d'un adjuvant lors d'essais de vaccination. *Ann. Méd. Vét.*, 2003, 147, 393-401.
- 41. Minana- Pérez M (1991).** Applications pharmaceutiques et cosmétiques des surfactifs. Cahier FIRP N° 372-A. Module d'enseignement de phénomènes interfaciaux. Université de LOS ANDES.
- 42.** Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (2001). Tensioactifs et oléagineux : Etude sur les matières premières oléagineuses disponibles sur le marché européen pour la production de tensioactifs. Web Ademe : www.ademe.fr.
- 43. Prescott., Harley., Klein (2003).** Microbiologie : Les biosurfactants. 2^e édition. Paris : De Boech. pp.1009.
- 44. Rondel C (2009).** Synthèses et propriétés de mélanges de nouvelles molécules polyfonctionnelles. Lipopeptidiques tensioactives. DOCT. Sciences des Agroressources. Université de Toulouse.
- 45.** Invitation à la chimie organique (2003). Johnson. De Boeck. pp.283.
- 46. Nathalie MENARD (2011).** Tensioactifs d'origine naturelle Pour la solubilisation de principes actifs : synthèse, physicochimie et toxicité. DOCT. : Pharmacotechnie et physicochimie pharmaceutique. Université Paris-Sud 11.
- 47. Qrinkevich N.I (1983).** Analyse chimique des plantes médicinales. Edition "Ecole supérieur", Moscou.
- 48. Bougandoura Nabila (2011).** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales *Saturejacalaminthassnepta* (nabta) et *Ajugaiva L.* (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Magister en Biologie. Option substances naturelles, activités biologiques et synthèse. Université de Tlemcen.
- 49. Gouvenel Jean-Philippe (2007).** Rapport de stage industriel en entreprise : Techniques et méthodes d'extraction des composés actifs de la plante *Terrestris Tribulus L.* Université de Technologie Chimique et de Métallurgie Sofia, Bulgarie.
- 50. Yves-Alain B, Janat A, MAMYRBEKOVA B, Boua B (2007).** Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi. *Sci. Nat. Vol. 4 N°2 : 217 – 225.*
- 51. Marie-Caroline JONVILLE.** Etude de la composition chimique et des potentialités antipaludiques de plantes utilisées en médecine traditionnelle au Cambodge et dans

l'archipel des Mascareignes. Doctorat en sciences Biomédicales et Pharmaceutiques de l'Université de Liège : Marseille.

- 52. Paule TERES (2007).** Stage de fin d'études : Effet de la lumière et de la température sur l'accumulation en saponines triterpénoïdiques chez *Centella asiatica*. Master : Biologie, Géosciences, Agrossources, Environnement. Montpellier.
- 53. Chenni Mohamed (2010).** Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale : *Bryona dioica* Jacq. Magister : Chimie moléculaire. Université d'Oran.
- 54. OUEDRAOGO Y., NACOUIMA O., GUISSOU I.P., GUEDE GUINA F.** évaluation in vivo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de traces de *Mitragyna Inermis* (rubiaceae). *Pharm. Méd. Trad. Afr.* .2001. Vol 11,pp.13-29.
- 55. Mayank A. Panchal, Krishna Murti, Vijay Lambole.** Pharmacological properties of *Verbascum thapsus* - A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* November – December 2010; Article-015, Volume 5, Issue 2.
- 56. Vigor C., Vercauteren J., Montels J.** Les substances naturelles dans "la chaîne Médicament" : Travaux pratiques de Pharmacognosie. Université Montpellier I. 2010-2011.

Glossaire

Aphrogène : propriété d'engendrer une mousse persistante.

Corticostéroïdes ou **corticoïdes** : sont des hormones stéroïdiennes naturelles sécrétées chez les êtres humains par le cortex de la glande surrénale.

Diosgénine : en biologie, aglycone utilisé pour synthétiser la progestérone.

Escine : est un mélange de saponines ayant des effets anti-inflammatoires et vasoconstricteurs. Il est produit par *le* marronnier d'Inde.

Ethoxylation : est un procédé industriel dans lequel l'oxyde d'éthylène est ajouté à des alcools et phénols, généralement pour produire de puissants agents surfactants ou mouillants.

Flavonoïdes (ou **bioflavonoïdes**) : sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C₆-C₃-C₆, chaîne souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa- ou pentagonal.

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation.

Hémiacétal : est un groupe fonctionnel formé par réaction d'un aldéhyde et d'un alcool ou un composé chimique contenant ce groupe fonctionnel.

Lécithine : C'est un lipide de la classe des phosphoglycérides, il comporte un acide gras saturé et un autre insaturé.

Molluscide : est une substance active ou une préparation ayant la propriété de tuer les mollusques (limaces, ou escargots, y compris aquatiques). Les hélicides sont les produits qui en théorie ne ciblent que les escargots

Oléfine : appelé également **alcène**, c'ont un hydrocarbure insaturé.

Oléochimie est la science des transformations physico-chimiques appliquées aux huiles et aux graisses animales et végétales. Aujourd'hui, on l'utilise dans plusieurs industries : agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Paraffine: du latin parum affinis, « qui a peu d'affinité », sont des alcanes, à savoir des molécules linéaires d'hydrocarbures saturés à chaîne droite. On distingue principalement : paraffine solide : cires ; paraffine liquide

Pétrochimie est la science qui s'intéresse à l'utilisation des composés chimiques de base issus du pétrole pour fabriquer d'autres composés synthétiques qui peuvent exister ou non dans la nature ; dans le dernier cas, ces composés sont dits artificiels. Ces fabrications sont, en général, basées sur des réactions chimiques appropriées en présence ou non d'un catalyseur.

Prégnénone : est le précurseur des hormones stéroïdiennes naturellement synthétisées dans notre corps à partir du cholestérol.

Sels biliaires : ou acides biliaires sont formés par des dérivés du cholestérol¹ et par des stéroïdes acides sécrétés par le foie et se trouvant principalement dans la bile de mammifères.

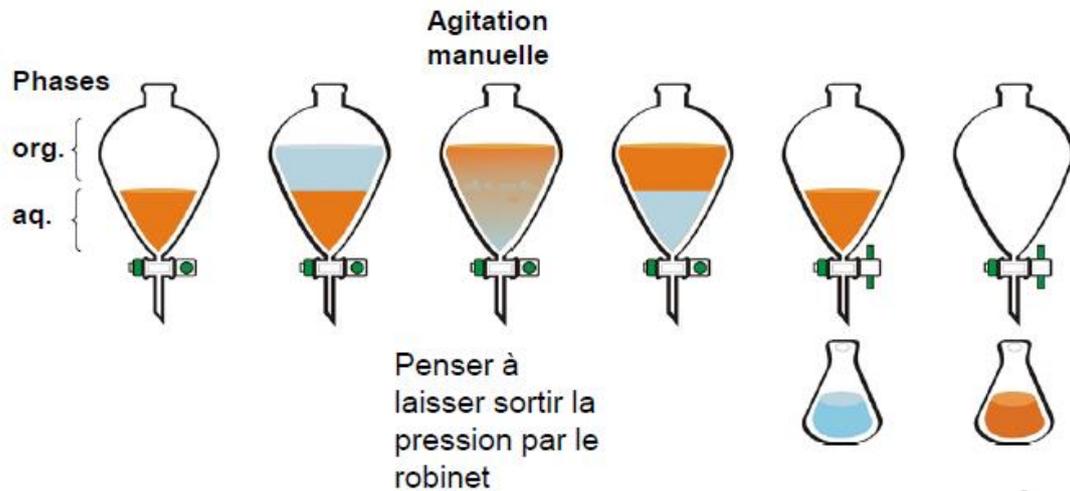
Stéroïdes : constituent un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes, majoritairement le squalène. Ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique hydrophobe partiellement ou totalement hydrogéné

Tanins : sont des substances naturelles phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leurs solutions aqueuses. Ce sont des métabolites secondaires des plantes supérieures que l'on trouve dans pratiquement toutes les parties des végétaux où ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites.

Taurine : La taurine est un dérivé d'acide aminé soufré dont la formule chimique est : $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$.

Principe de l'extraction

L'extraction consiste à faire passer un produit d'un solvant dont il est difficile à séparer (eau) à un autre solvant dont il sera facilement isolable (solvant organique).



Problèmes rencontrés

1) Formation d'une émulsion

Solutions :

- Patienter
- Ajouter du sel (NaCl)
- Filtrer
- Centrifuger
- Ajouter quelques gouttes de solvant polaire (MeOH, EtOH, Acetone)

2) Produits d'interface

Solutions :

- Les prélever dans la phase organique (extraction).
- Les éliminer dans la phase aqueuse (lavage).



Décantation lors de la formulation des émulsions

2. Evaporation au Rotavapor

➤ Principe du Rotavapor

Un Rotavapor permet de réaliser des distillations rapides en une étape et d'une façon qui ménage le produit. Cette procédure se base sur l'évaporation et la condensation de solvants au moyen d'un ballon d'évaporation par rotation sous vide qui permet d'éviter la formation de bulles d'ébullition trop grosses ainsi que d'augmenter la surface en contact avec l'air. La pression est généralement diminuée grâce à une trompe à eau et la solution est chauffée en fonction du solvant à éliminer pour compenser le caractère endothermique de la réaction. La distillation sous vide améliore le résultat du traitement et aide à protéger les produits.

L'évaporateur rotatif est constitué de plusieurs zones dont l'ensemble permet l'évaporation du solvant, sa récupération et la protection du produit de la dégradation

- a) Zone d'évaporation ; Le solvant est porté à une certaine température à l'aide d'un bain de chauffage. Une fine couche de solvant se forme à l'intérieur du ballon d'évaporation en rotation, ce qui augmente le taux d'évaporation. La rotation produit un mélange homogène de l'échantillon en empêchant ainsi une surchauffe stationnaire dans le ballon.
- b) Enchaînement par rotation avec conduit de vapeur ; L'unité d'entraînement garantit une rotation régulière du ballon d'évaporation.

Le conduit de vapeur intégré transporte la vapeur de la zone d'évaporation jusqu'à la zone de refroidissement.

- c) Zone de refroidissement ; La vapeur de solvant pénètre très rapidement dans le réfrigérant. Ici, l'énergie contenue dans la vapeur du solvant est transférée au produit réfrigérant (en général de l'eau) de façon à entraîner une condensation du solvant.
- d) Ballon récepteur ; celui-ci recueille le solvant condensé.
- e) Vide ; Le vide réduit la température d'ébullition en augmentant ainsi la performance de distillation. Cette performance est influencée par la pression de distillation (vide), la température du bain de chauffage, la vitesse de rotation et la taille du ballon d'évaporation.

3. Décantation

La **décantation** est une opération de séparation mécanique, sous l'action de la gravitation, de plusieurs phases non-miscibles dont l'une au moins est liquide. On peut ainsi séparer soit plusieurs liquides non-miscibles de densités différentes, soit des solides insolubles en suspension dans un liquide.

4. Préparation de la Vanilline sulfurique

Elle est formée d'un mélange V/V d'une solution éthanolique, d'acide sulfurique V/V et d'une solution éthanolique de vanilline à 1%