

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de l'Ingénieur

Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Génie des procédés organiques

EXTRACTION DE SUBSTANCES ACTIVES DU FRUIT

DE L'ARBRE DU *SAPINDUS MUKOROSI* :

CARACTERISATION ET APPLICATIONS

Par

Djamila YOUCEFI

Devant le jury composé de :

M ^r H.KHALAF	Professeur, U.S.D., Blida	Président
M ^{me} S. KASMI	Maitre de conférences A, U.S.D., Blida	Examineur
M ^r H.BOUTOUMI	Maitre de conférences A, U.S.D., Blida	Examineur
M ^{me} A. HADJ ZI ANE	Maitre de conférences A, U.S.D., Blida	Rapporteur

Blida, février 2012

REMERCIEMENT

Quels que soient les remerciements, ce ne sera jamais assez

La direction scientifique de cette étude a été assurée par Madame Hadj Ziane Amel et Mr Boutoumi.H. Je tiens à leur exprimer mes sincères remerciements pour la confiance et le soutien qu'ils m'ont témoigné ainsi que pour leurs conseils au cours de toute la durée de la réalisation de ce travail. Sans leur disponibilité, leur rigueur scientifique, leurs compétences et leurs qualités humaines, ce travail n'aurait pas eu la même « saveur ».

En prenant sur leur temps, Monsieur KHALAF.H, professeur à l'université Saad Dahleb de Blida, Monsieur Bal.Y, professeur à l'université Saad Dahleb de Blida et Mme Kasmi .S maître de conférence, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs et ont accepté de faire partie du jury de la soutenance. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Je ne pourrais oublier les membres de l'institut de Chimie industrielle : Etudiants et Enseignants. Je leur remercie pour leur sympathie et tous les services qu'ils m'ont rendus.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide passionnée et indispensable de Amel. I pour la GC-MS ; Belkacem et Nafissa pour leur aide apportée en Chromatographie, Samir pour l'IR, Mr Lazhari pour la spectrométrie d'absorption atomique, Dr Chaib pour m'avoir aidé à réaliser les tests hémolytiques au sein de son laboratoire et tout le personnel du laboratoire d'hygiène.

Je n'oublie pas les stagiaires que j'ai participé à leur encadrement au cours de cette année ; ceux qui ont une contribution dans ce travail (Warda, Lamia, Imad, Amine). La bonne ambiance présente dans le laboratoire d'organique a été un facteur essentiel à la bonne réalisation de ce mémoire, je n'oublierai jamais ceux qui m'ont beaucoup apporté à différents niveaux, je pense d'abord à la charmante et douce Zahira pour sa disponibilité dans les

moments difficiles à Maskri, Mourad, Rachid, Zoubir, Mouloud, Karima, Samia et Amel de lycée Elouzeri.

J'adresse mes remerciements à ceux qui m'ont permis le travail acharné de mémoire en acceptant de me voir très peu: mes sœurs Houda, Nora, Salima pour leur amitié et leur générosité, bien sûr je n'oublie pas mon très cher frère Ridha merci d'être mon frère à Mohamed, Dahmene, Kamel.

Un grand merci à Farida, mon bras droit, pour nos longues discussions scientifiques et pédagogiques et nos nuits blanches à Imen, Nesrine, Nadjia Nora je leur souhaite bon courage pour la fin de leur thèse.

Enfin, j'exprime ma plus grande reconnaissance à mon mari Zine de m'avoir supporté et accompagné dans cette aventure et mes enfants Ahlem, Housseem Eddin Raouf, Chahrazed fatma à mon ange Anis qui sont la fontaine infinie de mon courage et inspiration. Mes efforts sont dédiés à eux. Qu'ils soient rassurés de mon engagement avec eux dans l'avenir. Je vous aime trop. Merci.

RESUME

Au cours de ce travail, on a procédé à l'extraction de substances bioactives des fruits du *Sapindus mukorossi* puis à la caractérisation de ces substances par les méthodes chimiques et physiques (IR, CPG, GC-MS, RMN).

Les extraits obtenus ont été utilisés comme biopesticides.

Ces extraits, riches en saponines, se sont révélés efficaces en tant que biomolluscicides contre les mollusques phytophages et vecteurs de la Bilharziose.

L'essai de ces extraits comme bioinsecticides contre les pucerons des agrumes et les psylles des oliviers était fructueux et prometteur.

Mots clés : *Sapindus mukorossi* , *bioinsecticide*, *biomolluscicide* , *saponines*

ABSTRACT

In this study; some bioactive substances were extracted from *Sapindus mukorossi* soapnut by using different methods .the different extracts were characterized qualitatively by chemical reactions and physical methods (IR, MNR, GC-MS,CPG).

Then these extracted were tested as biopesticides. There application as biomolluscicide was efficient.

The aim of present study was to evaluate molluscicidal activity of *Sapindus mukorossi* soapnut against *the snails* to explore the full potential use of these plants as molluscicides in future.

The goal of this work was to determine whether or not extracts containing triterpenoid saponins can act synergistically as insecticidal components. The crude methanolic and water extracts from the *Sapindus mukorossi* soap nut were screened *in vitro* for possible insecticidal activity against citrus aphids and the olive psyllid and they showed a good efficacy.

Key words: *Sapindus mukorossi* , *bioinsecticide*, *biomolluscicide*, *saponins*

ملخص

أثناء هذه الدراسة، تم استخلاص بعض المركبات الحيوية من شجرة الصابونيات الهندي: سابانديس موكوروسي ذات الأصل الياباني و المنبت الجزائري بعدة طرق.

تم تشخيص هذه المركبات بالتحليل النوعي لمختلف الوظائف العضوية الموجودة في المستخلصات و بالطرق الطيفية: الأشعة تحت الحمراء, الرنين المغناطيسي النووي لذرتي الكربون والهيدروجين و مطياف الكتلة المندمج مع الكروماتوغرافيا الغازية و الكروماتوغرافيا الطور الغازي.

تم اختبار بعض المستخلصات و تطبيقها كمبيدات طبيعية حيث أثبتت نجاعتها كمبيد الرخويات الناقلة للفيروس المتسبب في داء البلهارسيا و معالجة الشجار الحمضيات المصابة بحشرة الافيس سيتروكولا بمستخلص مائي أدى إلى مغادرة هذه الحشرة لأوراق الشجيرات المعالجة و النفور منها لمدة تزيد عن الشهر.

كلمة مفاتيح: سابانديس موكوروسي، مبيد حشرات طبيعي، مبيد رخويات طبيعي، صابونيات

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION	12
1. PRESENTATION DE LA PLANTE <i>SAPINDUS MUKOROSSI</i>	15
1.1. Historique	15
1.2. Classification	15
1.3. Description	17
1.4. Chimie du fruit	18
2. EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE DE SUBSTANCES BIOACTIVES DE LA MATIERE VEGETALE	24
2.1. Extraction solide-liquide	24
2.2. Extraction solide-liquide des métabolites secondaires d'origine végétale	27
2.3. Quelques méthodes d'extraction décrites dans la littérature	32
3. LES SAPONINES	34
3.1. Les sources des saponines	34
3.2. La structure des saponines	35
3.3. La biosynthèse des saponines	36
3.4. La synthèse de saponines	43
3.5. Les Propriétés des saponines	44
3.6. Les biotensioactifs du fruit du <i>Sapindus mukorossi</i>	49
3.7. Toxicologie	50
4. LES BIOPESTICIDES	51
4.1. Définition	51
4.2. Les biomolluscicides	51
4.3. Les saponines en tant que biomolluscicides	57
4.4. Les bioinsecticides	58
4.5. Les Saponines en tant que bioinsecticides	61

5. METHODOLOGIE EXPERIMENTALE	65
5.1. L'objectif de l'étude	65
5.2. Matériels	65
5.3. La méthode de préparation et de conservation du fruit	66
5.4. Les méthodes de caractérisation de la matière végétale	67
5.5. Les méthodes d'extraction et de purification de saponines	70
5.6. Les méthodes d'analyses chimiques des extraits	73
5.7. Les méthodes d'analyses physiques des extraits	75
5.8. Les méthodes de caractérisation de l'extrait du fruit en tant que biosurfactant..	78
5.9. Les tests hémolytiques	80
5.10. L'application en tant que biopesticides	81
6. RESULTATS ET DISCUSSIONS	86
6.1. Les résultats de caractérisation du fruit de <i>Sapindus mukorossi</i>	86
6.2. Les résultats d'extraction et purification	88
6.3. Les résultats d'analyse chimique des extraits	91
6.4. Les résultats de caractérisation physique des extraits	93
6.5. Les résultats de caractérisation de l'extrait du fruit en tant que biosurfactant	100
6.6. Les résultats des tests hémolytiques	104
6.7. Les résultats d'application des extraits bioactifs en tant que biopesticides	105
CONCLUSION	110
APPENDICE	
A. Caractérisation des solvants	113
B. Liste des plantes pouvant contenir des saponines tritèrpéniques	115
C. Structure d'une cellule végétale	117
D. Répartition des métabolites secondaires dans les plantes	119
E. Les spectres RMN des saponines	120
F. Notations et abréviations	123
REFERENCES	124

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Les relations phylogénétiques entre les familles dans le sapindales impliquées des marqueurs de plastide	17
Figure 2.1	Couplage entre les différents phénomènes lors de l'extraction solide-liquide	27
Figure 3.1	Les principaux squelettes stéroïdiques	35
Figure 3.2	Les principaux squelettes triterpéniques	36
Figure 3.3	Les sucres les plus courants au niveau de saponosides	36
Figure 3.4	Les étapes de biosynthèse de phytostérols et des saponines triterpénoïdes	38
Figure 3.5	Oxydation du squalène	39
Figure 3.6	Les principaux cations dans la biosynthèse	40
Figure 3.7	La cyclisation de l'oxidosqualene pour donner différentes saponines	41
Figure 3.8	Les structures des 11 classes importantes de saponines après cyclisation, et leurs dérivés différents	42
Figure 3.9	Synthèse du 2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-di-O-benzoyl- α -L-arabinopyranosyl trichloroacétimide	43
Figure 3.10	Synthèse d'une saponine bidesmosidique par glycosylations successives	44
Figure 4.1	Cycle évolutif des schistosomes	53
Figure 5.1	Procédure pour l'extraction et la séparation de saponines à partir de la poudre végétale	71
Figure 5.2	Typical HPLC/ESI/MS decomposition reactions generating β - and hydroxyesters from sugar moieties in sodium adducts	77
Figure 5.3	Exemples des fragmentations en spectrométrie de masse des triterpènes	78
Figure 5.4	Montage de Ross-Miles	79
Figure 5.5	Psylle d'olivier (adulte)	81
Figure 5.6	Dégâts de psylle sur fleurs d'olivier (Soies cireuses)	81
Figure 5.7	Le puceron	82
Figure 5.8	Les arbustes mis sous serre pour l'étude	83
Figure 5.9	Le type d'escargot traité	83
Figure 6.1	Le fruit immature et le fruit mature	86

Figure 6.2	Coupe histologique colorée du fruit immature	86
Figure 6.3	Coupe histologique du fruit mur montrant les poches de saponines	87
Figure 6.4	Aspect des saponines extraites	90
Figure 6.5	Le spectre infrarouge de l'extrait à l'eau	93
Figure 6.6	Le spectre infrarouge de l'extrait au méthanol	93
Figure 6.7	Le spectre infrarouge de l'extrait à l'acétate d'éthyle	94
Figure 6.8	Le spectre infrarouge de saponines extraites au méthanol	94
Figure 6.9	Chromatogramme de l'éther de pétrole pur	96
Figure 6.10	Chromatogramme de l'extrait à l'éther de pétrole	96
Figure 6.11	Les spectres issus de GC-MS	97-100
Figure 6.12	Courbe de variation de la hauteur de la mousse en fonction du temps	101
Figure 6.13	L'évolution de la turbidité en fonction de la concentration de l'extrait à l'eau brut	101
Figure 6.14	L'évolution de la turbidité en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut	102
Figure 6.15	Variation de la turbidité en fonction de la concentration de saponines pures méthanoliques	102
Figure 6.16	L'activité hémolytique de l'extrait methanolique et les saponines methanoliques	104
Figure 6.17	Les feuilles des agrumes avant et après traitement	106
Figure 6.18	Le taux de mortalité des mollusques en fonction de la concentration d'extrait méthanolique brut	107
Figure 6.19	Variété de taux de mortalité des mollusques en fonction de la concentration d'extrait à l'eau brut	108
Figure 6.20	Le taux de mortalité des mollusques en fonction de la concentration de saponines pure méthanolique	108

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Les composés isolés du genre <i>Sapindus</i>	19
Tableau 2.1	Les solvants spécifiques utilisés lors de l'extraction des certains composés	29
Tableau 2.2	Les co-solvants utilisés lors de l'extraction des saponines par CO ₂ supercritique	30
Tableau 2.3	Effet du quotient du solvant sur le rendement en saponine	31
Tableau 4.1	Les classes majeures de produits naturels avec une activité molluscicides reconnues d'après A. MARSTON et K. HOSTETWANN	55
Tableau 4.2	Structures des quelques molécules molluscicides	56
Tableau 4.3	Principales classes de métabolites secondaires impliqués dans la défense des végétaux face aux insectes et autres ravageurs	59
Tableau 4.4	Structures de quelques molécules insecticides	60
Tableau 5.1	Conditions de culture des mollusques	84
Tableau 6.1	La composition massique du fruit	87
Tableau 6.2	Les taux de matière sèche, d'humidité et de matière organique	87
Tableau 6.3	Les valeurs des cendres	87
Tableau 6.4	Composition minérale de la poudre végétale	88
Tableau 6.5	Caractéristiques des différents extraits bruts préparés à partir des fruits de <i>Sapindus mukorossi</i>	88
Tableau 6.6	Les valeurs d'extractive des fruits (rendement)	89
Tableau 6.7	Les valeurs de la teneur en lipides extractibles à l'hexane par sonication	90
Tableau 6.8	Résultats de criblage chimique	91
Tableau 6.9	Les bandes caractéristiques des spectres IR des extraits bruts et purifiés	95
Tableau 6.10	Résultats obtenus pour le test de mousse des saponosides	100
Tableau 6.11	Les valeurs de CMC des différents extraits	102
Tableau 6.12	Comptage le nombre de psylles trouvées sur les différentes parties des arbres avant le traitement	105
Tableau 6.13	Le nombre de psylles trouvés sur les différentes parties des arbres 24h après le traitement	105
Tableau 6.14	Résultat de premier traitement avec la poudre sèche de la plante	107

INTRODUCTION

Historiquement, les Hommes ont toujours puisé dans la nature de quoi se nourrir, se vêtir et se soigner. Les plantes produisent 70% de nos médicaments. Déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes.

D'une autre part, en une quinzaine d'années, la chimie verte a connu un développement considérable à un niveau mondial et dans la plupart des domaines de recherches afin d'atteindre un mode de développement qui vise à répondre aux besoins actuels sans compromettre la capacité des générations futures à répondre aux leurs. C'est donc un mode de développement :

- socialement souhaitable (Ethique)
- écologiquement durable
- économiquement viable

L'arbre *Sapindus mukorossi* est connu depuis des décennies par les populations qui ont toujours utilisé ses fruits pour ses pouvoirs détergents très intéressants pour le lavage du linge et les soins corporels. Son fruit appelé noix de lavage est très abondant en Algérie et très peu d'études y sont rapportés dans la littérature. La saponine ; substance bioactive majoritaire dans ce fruit est un tensioactif naturel à plusieurs propriétés et est utilisée par plusieurs industries. Que ce soit en agriculture en tant qu'insecticide, en médecine et en pharmacologie pour ses propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de contribuer à valoriser la ressource végétale pour la sauvegarder, de contribuer ainsi à son exploitation dans le respect de la diversité des espèces et de faire prendre conscience aux populations des risques encourus du fait de la déforestation.

La valorisation de cette espèce endémique à l'état brut se fait par extraction de sa matière bioactive par des méthodes classiques (décoction, macération par différents solvants puis sa purification et le calcul de son rendement.

La caractérisation de l'extrait par des méthodes d'analyse physico-chimiques (détermination de CMC par la mesure de la turbidité), screening chimique pour la détection des familles chimiques et spectroscopiques (FTIR, CPG, GC-MS, SA) a confirmé les propriétés des saponines. Les applications à des fins d'intérêts visant le secteur agricole ont porté sur l'utilisation de l'extrait en tant que biopesticide :

- comme bioinsecticide contre les pucerons des agrumes et les psylles des oliviers : L'extrait aqueux des fruits s'est révélé très actif sur ces insectes.
- comme biomolluscicide contre les escargots qui causent des dégâts agricoles et sont vecteurs de graves maladies : les bilharzioses ou schistosomiasés qui sont des maladies parasitaires humaines, connues depuis l'antiquité, dues à la présence dans l'organisme de vers trématodes. Ce parasite présente un cycle de vie faisant intervenir, à côté de l'homme, un mollusque ou escargot hôte: l'extrait aqueux et méthanolique ainsi que les saponines extraites ont une activité molluscicide très marquée contre les mollusques traités dans ce travail.

Notre recherche est structurée comme suit :

- une partie théorique dans laquelle sont présentées les notions bibliographiques sur cette espèce végétale et sur les méthodes d'extraction ainsi qu'une synthèse bibliographique sur les applications déjà envisagées
- une partie expérimentale qui regroupe les aspects suivants :

- la caractérisation botanique de la matière végétale par identification et quantification de ses différents composés (alcaloïdes, polyphénols, saponines ...)
- l'extraction de la matière active par différentes techniques et la caractérisation des substances extraites
- les protocoles d'application de ces produits dans les domaines cités ci-dessus

Enfin, nous achevons cette recherche par une conclusion générale et surtout par des recommandations et des perspectives à envisager pour la continuité de cette étude afin d'exploiter au maximum les excellentes propriétés de cette richesse naturelle.

CHAPITRE 1

ASPECT BOTANIQUE ET CHIMIQUE DE LA PLANTE

SAPINDUS MUKOROSI

1.1. Historique :

Le *Sapindus* figure parmi les végétaux introduits, en Algérie, par la Pépinière du Gouvernement colonial français, un des plus intéressants est une espèce du genre *Sapindus* importée en 1845 [1]. Cet arbre, qui provenait des collections du Muséum, s'est rapidement développé et, en 1859, des jeunes sujets étaient déjà mis en vente sous le nom de *Sapindus indicus*. En 1867, M.Hardy, dans une très intéressante note à la Société d'Acclimatation, appelle l'attention sur la fructification abondante des *Sapindus* élevés à la Pépinière du Gouvernement ou Jardin d'Essai. Ce *Sapindus* est d'origine japonaise. C'est le *Sapindus Mukorom* légèrement modifié, ce qui justifie sa dénomination de *Sapindus nilia* appliquée à la forme fertile susceptible d'être cultivée. Le fruit est formé par une coque charnue, luisante, devenant coriace, gommeuse, translucide par la dessiccation.[2]

1.2. Classification :

La famille des Sapindacées est une famille tropicale et subtropicale qui se compose de 158 genres et 2230 espèces.[3]

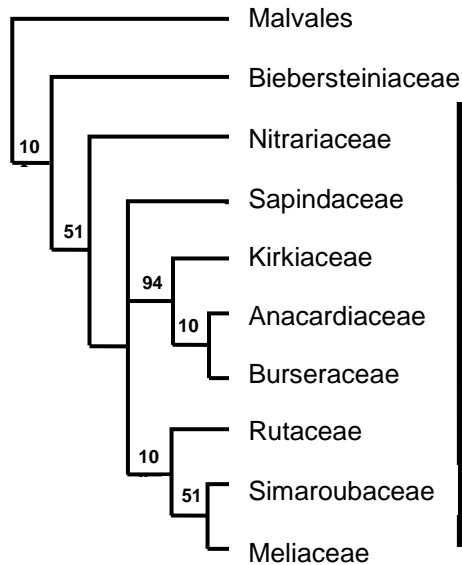
Classification systématique :

Parmi les classifications basées essentiellement sur des critères morphologiques et anatomiques, celle de Cronquist est la plus utilisée. [4]

Nom botanique: Sapindus Mukorossi
Nom de la famille: Sapindacée
Règne: Plante
Sous règne: Tracheobionta (plante vasculaire)
Division: Magnoliophyta (Flowering plants)
Classe: Magnoliopsida (Dicotyledones)
Sous classe: Rosidée
Ordre: Sapindales
Famille: Sapindacée (Soapberry family)
Tribu: Andropogonée
Genre: Sapindus (Soapberry)
espèce: Sapindus Mukorossi (Chinese soapberry)

Cependant, les apports récents de la biologie moléculaire, avec le développement de la cladistique moderne ou de la systématique moléculaire basée sur l'analyse des séquences de gènes, ont bouleversé les classifications usuelles et ont donné naissance en 1998 à une nouvelle classification ordinale des plantes à fleurs [APG, 1998]. La classification APG est la classification scientifique des angiospermes la plus récente établie selon les travaux d'un groupe de chercheurs : the *Angiosperm Phylogeny Group* reflète d'un consensus sur les connaissances acquises.[5]

Bayésienne de l'arbre (RBCL)



Bayésienne de l'arbre (RBCL and atpB)

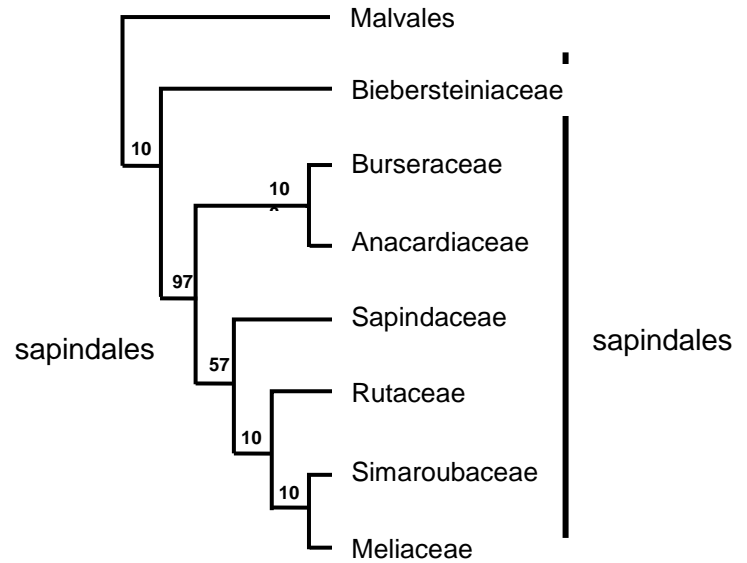


Figure 1.1 : les relations phylogénétiques entre les familles dans le sapindales impliquées des marqueurs de plastide. Les nombres au-dessus des branches sont des probabilités postérieures bayésiennes.[6]

1.3. Description :

Tous les *Sapindus* sont des arbres à savon. Les deux espèces principales fournissant les Noisettes de lavage sont asiatiques (Inde et Népal principalement): le *Sapindus mukorossi* (grosses Noisettes) et le *Sapindus trifoliatus* (petites Noisettes).[7]

C'est un petit arbre au tronc court, dépassant rarement une douzaine de mètres de hauteur.

Les arbres donnent leurs premières Noisettes au bout de 5 à 10 ans et la récolte s'étale ensuite annuellement sur 75 ans. Elle se fait en septembre/octobre. En général, 100 à 1500 kg de Noisettes par arbre par an.[8]



Les feuilles, sont alternes et de forme arrondie, elles sont constituées de tiges de 15 à 40 cm et dotées de 14 à 30 folioles : et la foliole terminale est souvent absente. Le feuillage est persistant dans les pays d'origine mais, on a observé que dans notre pays cette arbre perd ses feuilles dans les périodes froides donc, on a conclue que le feuillage est caduque.



Ses fleurs, qui apparaissent à la fin du printemps, forment de larges panicules d'une quinzaine de centimètres de diamètre composées de petites fleurs de couleur crème.

Ses fruits, mûrs en automne, sont réunis en grappes de drupes translucides de 1 à 2 cm de diamètre et dotés d'une fine peau, de couleur jaune-orangé au début, puis jaune-marronné de plus en plus foncée en mûrissant, et contiennent de 1 à 3 graines.



Les plus gros fruits pèsent 6 à 7 grammes, les plus petits pèsent 2 à 5 grammes. La graine est noire lisse, sphérique, elle représente, à peu près, le tiers du poids total du fruit, sous une enveloppe solide, se trouve un gros embryon huileux. [9]

1.4. Chimie du fruit :

Les fruits du *Sapindus* sont riches en saponines ; un détergent naturel antibactérien qui protège le noyau. Contrairement aux idées reçues, c'est le noyau qui est toxique et non la saponine du *Sapindus mukorossi*. Selon le type de sapindus, les fruits peuvent être toxiques en cas d'ingestion, et peuvent provoquer des réactions allergiques comme l'urticaire chez certaines personnes

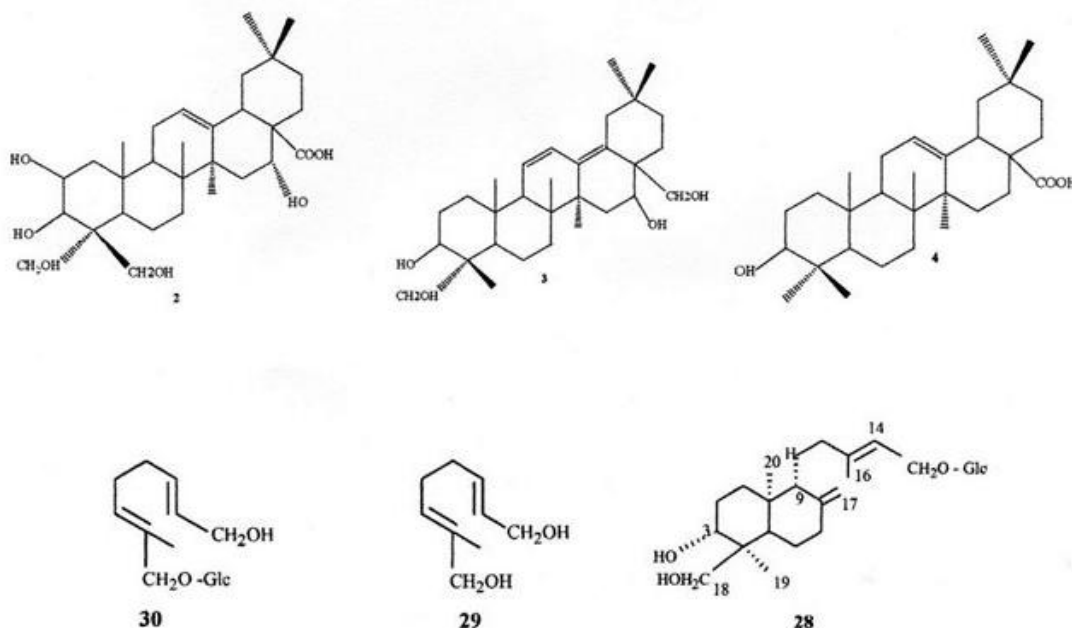
en cas de contact avec la peau. Le *Sapindus mukorossi*, ou l'arbre à savon, qui pousse en Inde et plus particulièrement dans les contreforts de l'Himalaya, est utilisé comme détergent par les Indiens. Le *Sapindus mukorossi* n'est pas toxique et est utilisé en médecine ayurvédique pour guérir les maladies de la peau. 1]

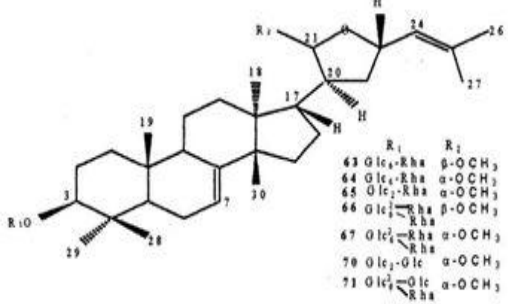
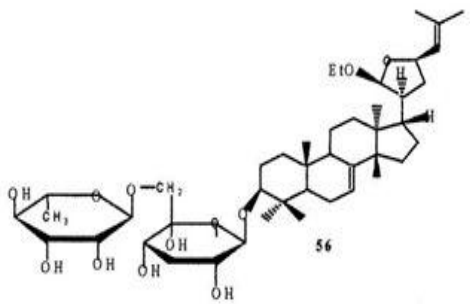
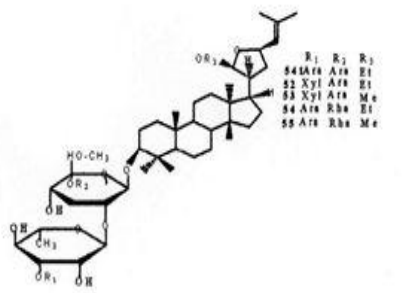
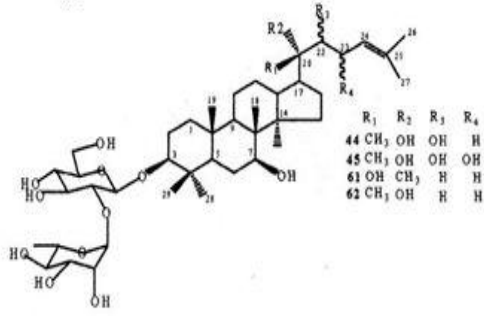
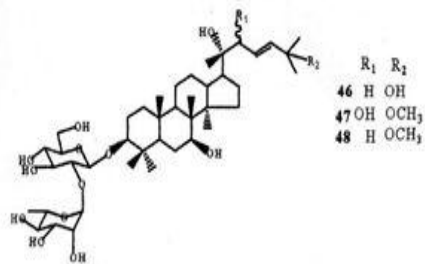
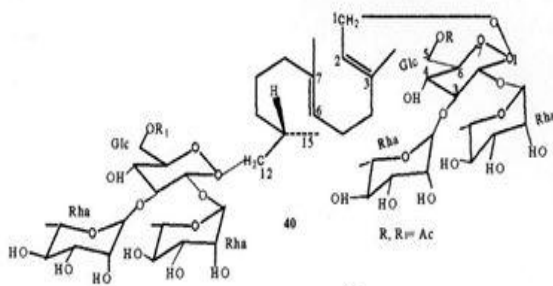
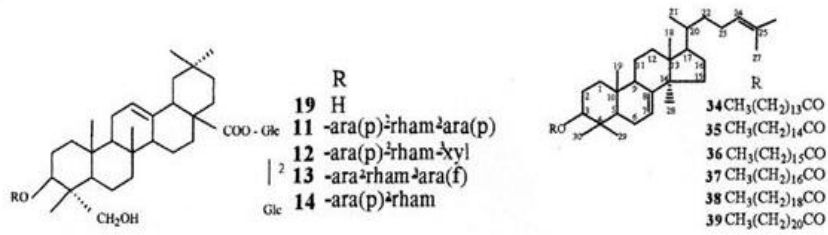
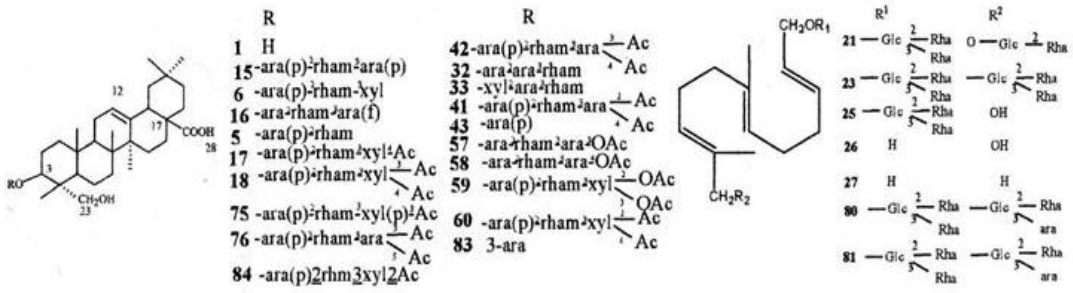
Tableau 1.1 : les composés isolés du genre *Sapindus* [10]

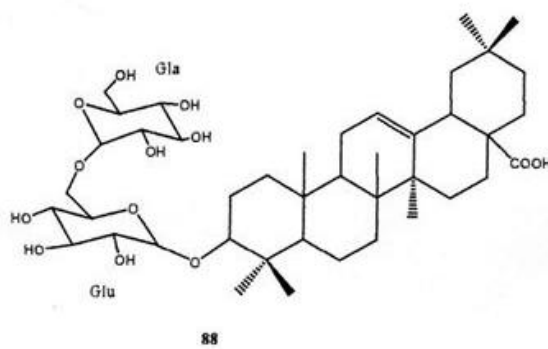
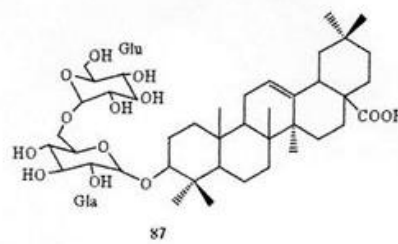
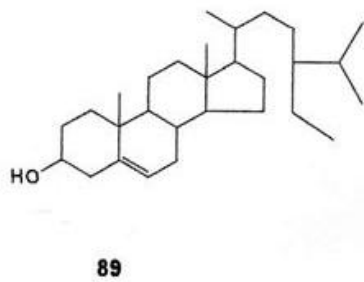
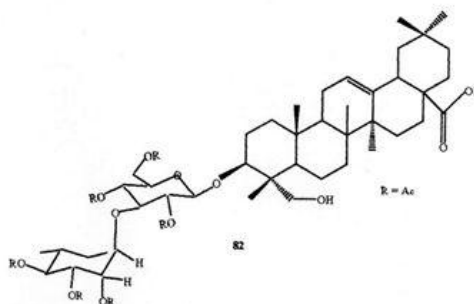
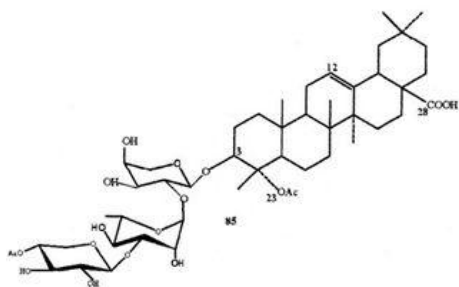
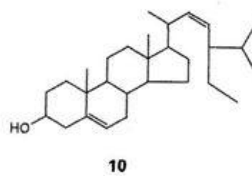
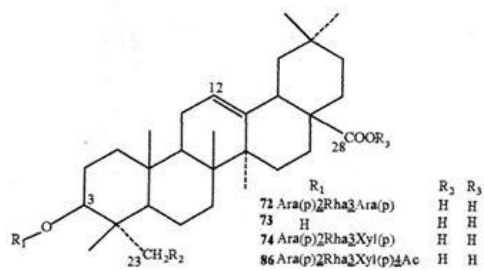
Nom des espèces	La partie utilisée de la plante	Constituants chimiques
<i>S. mukorossi</i>	L'écorce de fruit	Hederagenin[1]; platycodigenin [2]; saikogenin [3]; oleanolic acid [4]
	péricarpes	Hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranoside [5]; Hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranoside [6];
	fruits	hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(2 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopyranosyl(3 \rightarrow 1)- β -D-xylopyranosyl(4 \rightarrow 1)glucopyranoside [7];
	péricarpes	hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(2 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopyranosyl(3 \rightarrow 1)- β -D-xylopyranosyl(4 \rightarrow 1)glucopyranosyl[(2 \rightarrow 1)gluco-pyranoside] (5 \rightarrow 1)rhamnopyranoside [8];
	fruits	hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(2 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopyranosyl(3 \rightarrow 1)- β -D-xylopyranosyl,28-arabinopyranosyl(2 \rightarrow 1)- α -L-rhamno-pyranosyl(3 \rightarrow 1)xylopyranosyl(4 \rightarrow 1)glucopyranosyl[(6 \rightarrow 1)rhamnopyranosyl](2 \rightarrow 1)glucopyranoside [9];
	Fruits et galles	stigmasterol [10],
	écorces	hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside,28-di- <i>O</i> -glycoside [11]; hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl,28-di- <i>O</i> -glycoside [12]; hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinofuranosyl,28-di- <i>O</i> -glycosides [13]; hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl,28-di- <i>O</i> -glycoside [14]
	péricarpes	hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [15]; hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinofuranosyl [16]; hederagenin3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-4-acetyl [17]; Hederagenin3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -acetyl- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [18]; Hederagenin,28-di- <i>O</i> -glycosides [19]
	Péricarpes	1- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranoside-12- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [20]; hederagenin12- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -glucopyranoside-1- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -glucopyranoside [21]; hederagenin1,12-bisglycoside- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranoside [22]; hederagenin 1,12-bisglycoside- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -glucopyranoside [23]; 1- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranoside-12-hydroxy-all-trans-farnesol [24]; 1- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -glucopyranoside-12-hydroxyfarnesol [25]; 12-hydroxy-all-trans-farnesol [26]; 1-hydroxylinalool [27]; GoshonosideF1 [28]; 8-hydroxygeraniol [29]; β -glucosidegeraniol [30]; 11(S)(E,E)-2,6-dodecadiene-3,7,11-trimethyl-1,12-diol [31]
	Fruits	3- <i>O</i> -{ α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl(3 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopyranosyl}-hederagenin [32]; 3- <i>O</i> -{ β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl(3 \rightarrow 1)- α -L-rhamnopyranosyl}hederagenin[33]

	Fruits	Eupha 7,24-dien-3-tetradecanoate [34]; eupha 7,24-dien-3-pentadecanoate [35]; eupha 7,24-dien-3-hexadecanoate [36]; eupha,7,24-dien-3-heptadecanoate [37]; eupha,7,24-dien-3-nonadecanoate [38]; eupha,7,24-dien-3-heneicosanoate [39];
	Péricarpes	11(S)-2,6(E,E)-dodecadiene-3,7,11-trimethyl-1,12-diol-1,12-bis-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-6-O-acetyl- β -D-glucopyranoside [40]
	Péricarpes	Hederagenin3-O-(2,4-O-Di-acetyl- α -L-arabinopyranoside)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [41]; Hederagenin3-O-(3,4-O-Di-acetyl- α -L-arabinopyranoside-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [42]; Hederagenin3-O- α -L-Arabinopyranoside [43]
	Galles	3 β ,7 β ,20(S),22-tetrahydroxydammar-24-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [44]; 3 β ,7 β ,20(S),22,23-pentahydroxydammar-24-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [45]; 3 β ,7 β ,20(S),22,25-pentahydroxydammar-23-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [46]; 25-methoxy-3 β ,7 β ,20(S),22-tetrahydroxydammar-23-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [47]; 25-methoxy-3 β ,7 β ,20(R)-trihydroxydammar-23-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [48]; 4-Allyl-2-methoxyphenyl-6-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside [50]
	Feuilles	4-Allyl-2-methoxyphenyl-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside [49];
	Racines	3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-21,23R-epoxyl tirucalla-7,24-diene-21 β -ethoxy-3 β -ol [51]; 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-21,23R-epoxyl tirucalla-7,24-diene-21 β -ethoxy-3 β -ol [52]; 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-21,23R-epoxyl tirucalla-7,24-diene-21 β -methoxy-3 β -ol [53]; 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-21,23R-epoxyl tirucalla-7,24-diene-21 β -ethoxy-3 β -ol [54]; 3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-21,23R-epoxyl tirucalla-7,24-diene-21 β -methoxy-3 β -ol [55]; 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-21,23R-epoxyl tirucalla-7,24-diene-21 β -ethoxy-3 β -ol [56]
	Fruits et Galles	hederagenin-3-O-(3-O-acetyl- α -L-arabinopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [57]; hederagenin-3-O-(4-O-acetyl- α -L-arabinopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [58]; hederagenin-3-O-(2,3-O-diacetyl- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [59]; hederagenin-3-O-(2,4-O-diacetyl- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [60]; hederagenin3,7,20(S)-trihydroxydammar-24-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [61]; 3,7,20(R)-trihydroxydammar-24-ene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [62]
	Galles	21 β -methoxy-3 β ,21(S),23(R)-epoxytirucalla-7,24-diene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside [63]; 21 α -methoxy-3 β ,21(R),23(R)-epoxytirucalla-7,24-diene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside [64]; 21 α -methoxy-3 β ,21(R),23(R)-epoxytirucalla-7,24-diene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [65]; 21 β -methoxy-3 β ,21(S),23(R)-epoxytirucalla-7,24-diene-3-O- α -L-dirhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2,6)- β -D-glucopyranoside [66]; 21 α -methoxy-3 β ,21(R),23(R)-epoxytirucalla-7,24-diene-3-O- α -L-dirhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2,6)- β -D-glucopyranoside [67]
	Racines	3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl (21,23R)-epoxyl tirucalla-7,24-diene-(21S)-ethoxy-3 β -ol [68]; 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl (21,23R)-epoxyl tirucalla-7,24-diene-(21S)-methoxy-3 β -ol [69]
	Galles	21 α -methoxy-3 β ,21(R),23(S)-epoxytirucalla-7,24-diene-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [70]; 21 α -methoxy-3 β ,21(R),23(S)-epoxytirucalla-7,24-diene-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranoside [71]
S. delavayi	Péricarpes	Oleanolic acid3-O- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [72]; monodesmoside [73]; oleanolic acid3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [74]; 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside-3-acetyl [75]; 3-O- α -L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-arabinopyranosyl-3,5-acetyl [76];

	Péricarpes	1- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -glucopyranoside-12-hydroxyfarnesol [77]; 1- <i>O</i> - α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -glucopyranoside-12-hydroxyfarnesol [78]; 1,12- <i>O</i> -bisglycoside- α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] [79]; 1,12- <i>O</i> -bisglycoside- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] [80]; 1,12- <i>O</i> -bisglycoside- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)] [81];
S. <i>saponaria</i>	Ecorce de fruits	3- β - <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glycopyranosyl]-hederagenin [82]
		3- <i>O</i> -{4-acetyl- β -D-xylopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- α -L-arabnopyranosyl}-hederagenin [17]; 3- <i>O</i> -{ α -L-arabinopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- α -L-arabnopyranosyl}-hederagenin [15]; 3- <i>O</i> -{ β -D-xylopyranosyl-(1-3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- α -L-arabnopyranosyl}-hederagenin [6];
S. <i>emarginatus</i>	péricarpes	hederagenin 3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranoside [83]; hederagenin3- <i>O</i> -(2- <i>O</i> -acetyl- β -D-xylopiranosyl)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [84]; 23- <i>O</i> -acetyl-hederagenin3- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetyl- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [85]; oleanoic acid 3- <i>O</i> -(4- <i>O</i> -acetyl- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside [86]
	Fruits	hederagenin-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl [87]; hederagenin-3- <i>O</i> - β -D-glucuronopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside [88]
	Péricarpes	3- <i>O</i> -{ β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl} hederagenin [6]; 3- <i>O</i> -{ α -L-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl}[15]; β -sitosterol [89];
S. <i>trifoliatius</i>	Péricarpes	1,12-bis- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside [90]; 15-hydroxyfarnesol [95]; 15- <i>O</i> - β -xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)-[α -rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -glucopyranoside farnesol [92]; 15- <i>O</i> - β -xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)-[α -rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -glucopyranoside-15-hydroxyfarnesol [93]; Sesquiterpene oligoglycoside [94]







CHAPITRE 2

EXTRACTION SOLIDE-LIQUIDE DE SUBSTANCES BIOACTIVES DE LA MATIERE VEGETALE

2.1. Extraction solide-liquide :

L'extraction solide-liquide est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer, de dissoudre soit par immersion soit par percolation d'un liquide, un ou plusieurs composants (liquide ou solide) mélangés à un solide. C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, qui contient la matière à extraire et une phase liquide : le solvant d'extraction. [11]

Cette opération est utilisée dans la préparation de produits alimentaires, pharmaceutiques, drogues, teintures ou parfums où elle prend des différentes dénominations. De la percolation à l'infusion en passant par la macération ou la décoction, chaque terme évoque une mise en œuvre domestique d'un procédé d'extraction solide-liquide, dont le solvant est généralement de l'eau ou de l'alcool. [12]

Pour une bonne extraction, il ne suffit pas de prendre en considération la solubilité du soluté désiré ou non désiré. L'extraction solide-liquide à partir de la matrice végétale est une opération unitaire complexe en raison de la nature même du substrat. Les résistances au transfert de matière dues à la structure végétale et la localisation des composés recherchés peuvent être déterminantes. [13]

La complexité de la structure et la variabilité (avec les saisons, les récoltes,...) de la matière végétale ainsi que la variété des composés à extraire (différents poids moléculaires, polarité, lien avec la structure,...) ont conduit à l'apparition d'une grande variété de technologies d'extraction. [12]

Le transfert de matière se réalise entre deux phases hétérogènes et la vitesse apparente d'extraction dépend de plusieurs phénomènes :

- pénétration du solvant dans la matrice solide
- libération du soluté dans le solvant
- diffusion de la solution enrichie vers l'extérieur de la particule
- transfert de la solution enrichie dans tout l'environnement [11].

2.1.1. Les facteurs influençant l'extraction :

Les phénomènes de transfert de soluté dans le solide, en l'occurrence la matière végétale, sont affectés par plusieurs facteurs caractérisant la matière solide, le soluté et le solvant, ainsi que par les conditions opératoires [14].

- Influence du solide : le solide a une double influence sur le transfert de matière, l'une par sa taille, l'autre par sa structure.
- Influence du soluté : le soluté à extraire influence la diffusion de par sa structure moléculaire, sa taille, sa localisation, sa répartition et ses liaisons dans la matière végétale avec d'autres composés.
- Influence du solvant : les solvants souvent utilisés sont : l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane) et le CO₂ supercritique. [14]

Le choix du solvant se fait selon plusieurs critères [15] :

- la solubilité des composants spécifiques dans le solvant.
- la régénération du solvant si celui-ci doit être réemployé. Il ne doit pas former d'azéotrope avec un des composés qu'il solubilise et sa chaleur latente doit être faible.
- la tension interfaciale et la viscosité, car le solvant doit correctement mouiller la matrice solide.
- idéalement il doit être non toxique, stable, non réactif, non inflammable, inoffensif pour l'environnement et peu coûteux. (Appendice A)
- Influence de la température : l'élévation de la température augmente la solubilité et la diffusivité de la solution et réduit sa viscosité. Mais elle augmente aussi la perméabilité des parois cellulaires et donc diminue la

sélectivité comme elle peut dégrader certaines structures thermostables. [16]

- *Influence de l'agitation* : une agitation mécanique des particules dans le solvant permet le maintien en suspension de celles-ci et l'homogénéisation du milieu. Elle a donc une grande influence sur le transfert de matière à l'interface solide-liquide. [12]
- *Influence de l'humidité* : en règle générale, les matières végétales sont séchées pour faciliter leur conditionnement et surtout leur stockage. Un surplus d'humidité peut donc détériorer le substrat. De plus, lors de l'utilisation des solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide [11].

2.1.2. La cinétique d'extraction :

Le transfert de soluté du solide vers le liquide se produit grâce à la convection, la diffusion moléculaire et la diffusion par mélange. Lors de la percolation, la diffusion moléculaire dans le solide est l'étape limitante.

Certains facteurs influent sur la cinétique d'extraction tels que :

- la taille et la forme des particules ;
- la distribution de tailles ;
- le gonflement de la matière ;
- et le changement de structure de la matière. [11]

2.1.3. Évaluation du potentiel extractible :

En extraction solide-liquide, une des principales questions réside dans la détermination de la teneur initiale de la matrice végétale en soluté, appelée aussi le potentiel plante. Cette donnée est essentielle si l'on veut établir des bilans matières, parler d'efficacité (rendement du procédé) ou comparer des résultats issus d'essais sur différents lots de plante. Car la matière végétale est une matière évolutive dont la teneur en solutés ne peut être garantie à un instant donné que pour un lot déterminé. Le potentiel plante varie selon l'origine de la plante, les conditions de culture et de stockage. [17]

2.2. Extraction solide-liquide des métabolites secondaires d'origine végétale :

L'extraction du métabolite secondaire végétal peut se réaliser par trois techniques différentes utilisant soit des solvants, soit de la vapeur, soit des fluides supercritiques [18]. Chacune a ses avantages et ses inconvénients. Le coût total est étroitement lié à la technologie nécessaire pour atteindre en toute sécurité la température et la pression exigées par la méthode choisie. C'est pourquoi l'extraction par solvant est souvent préférée par rapport aux autres techniques. Pour le substrat végétal : est une matière «vivante», donc évolutive. La qualité des plantes varie selon les origines géographiques, les saisons, le conditionnement et le stockage. Le choix du solvant est primordial pour obtenir une bonne extraction des molécules visées tout en respectant des contraintes de sécurité et de coût économique. Le choix de l'équipement va conditionner le procédé mis en œuvre (fonctionnement continu ou discontinu, taille des lots, mode de contact solide-liquide), et la nature des opérations connexes (filtration).[11]

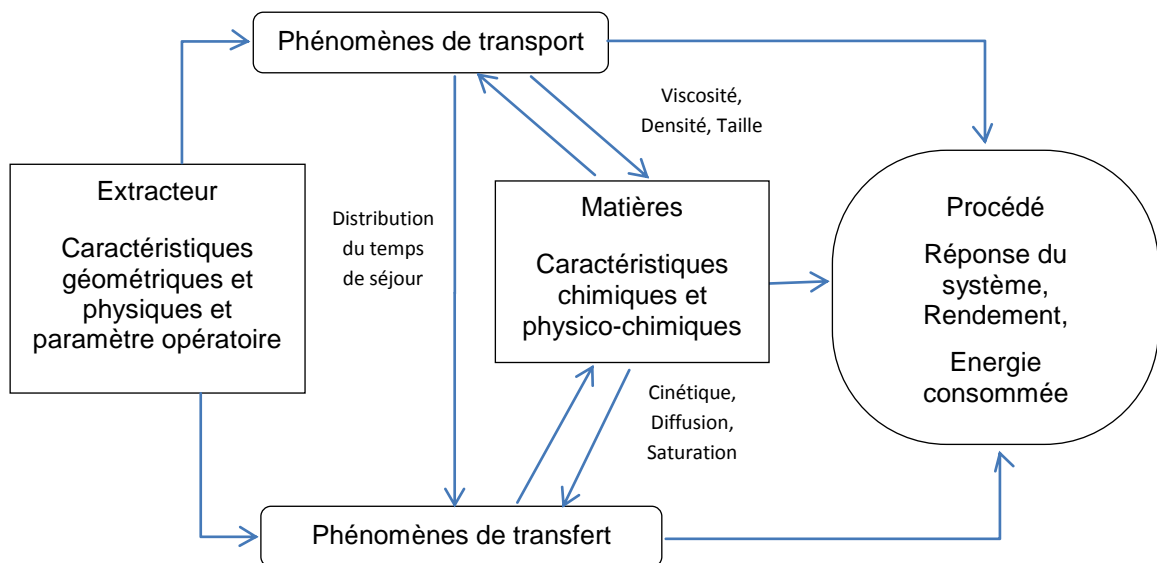


Figure 2.1 : Couplage entre les différents phénomènes lors de l'extraction solide-liquide [12]

2.2.1. Extraction des saponines et des sapogenines:

L'intérêt commercial prépondérant des saponines, leur extraction, leurs applications et la mise en évidence de leurs bienfaits sur la santé ont conduit

au développement de leur production à partir des sources naturelles à une échelle commerciale.

La première étape dans la fabrication de saponines implique leur extraction à partir de la matrice de la plante, et comme dans tout processus d'extraction le solvant d'extraction, les conditions d'extraction (comme la température, le temps, le pH, la quantité de solvant) et les propriétés de la matière (la composition et la taille des particules) sont les facteurs majeurs qui déterminent l'efficacité et les propriétés du produit fini.

Sauf en cas d'exceptions, les saponines ne peuvent être isolées d'une matrice végétale en une seule étape. Retrouvées fréquemment sous formes de mélanges complexes, plusieurs séparations sur différents supports solides doivent être effectuées pour parvenir au résultat escompté. Leur forte polarité, leur masse moléculaire élevée et les différences structurales minimales entre constituants d'un même extrait font qu'il est souvent long et difficile d'obtenir une saponine sous une forme pure et intacte. De plus, ces molécules se cristallisent très mal en raison de leurs propriétés hygroscopiques, et aussi par le fait même qu'elles donnent rarement des points de fusion nets et sans décomposition.[19]

Les conditions favorisant le rendement d'extraction peuvent diminuer la sélectivité et la pureté des saponines ce qui implique d'autres étapes de purification. [20]

2.2.1.1. Le prétraitement de l'échantillon :

Les étapes de prétraitement sont entreprises afin d'accroître l'efficacité de l'extraction. Elles incluent : le séchage, la réduction de la taille des particules et la delipidation (en utilisant un solvant lipophile comme l'acétate d'éthyle, l'éther de pétrole ou l'hexane). La delipidation peut être effectuée après l'extraction des saponines. La réduction de la taille des particules (par broyage) est souvent effectuée pour améliorer l'efficacité de transfert de masse lors de l'extraction. La distribution qualitative et quantitative variable des saponines dans la plante permet à en sélectionner des parties à utiliser comme matière première. L'efficacité de séparation est améliorée par l'utilisation des parties de

la plante avec une concentration en saponines la plus élevée, la sélection de la matière première permet aussi de surmonter les problèmes posés par la présence d'autres composés (comme l'amidon et les flavonoïdes).[20]

2.2.1.2. L'extraction des saponines par solvant :

À première vue, et en raison de la bonne solubilité de la plupart des saponines dans l'eau [31], il sera juste de penser qu'une macération ou un chauffage à reflux à l'aide de ce solvant polaire permettrait leur extraction. Cependant, la lyophilisation subséquente de l'extrait peut entraîner l'hydrolyse des bidesmosides. Par conséquent, l'extraction des saponines se fait habituellement à l'aide d'alcools comme le méthanol ou l'éthanol à différentes concentrations dans l'eau. [21]

2.2.1.2.1. Le solvant d'extraction :

L'eau, les alcools (méthanol et éthanol) ou les mélanges (eau + alcool) sont largement utilisés pour l'extraction des saponines de la matrice des plantes.

D'autres solvants sont investigués dans l'extraction des saponines incluant les solutions aqueuses de surfactants, les solutions alcooliques de surfactants et la glycérine. L'addition de l'ammoniaque aux solvants d'extraction de l'acide glycyrrhique a augmenté le rendement. [20]

Tableau 2.1 : les solvants spécifiques utilisés dans l'extraction de certains composés [22]

solvants	le chloroforme ou le dichlorométhane	l'acétate d'éthyle	<i>n</i> -butanol
Composés extraits	l'extraction des aglycones apolaires méthoxylés et peu hydroxylés	l'extraction des aglycones de polarité moyenne polyhydroxylés et monoglycosylés	l'extraction d'hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type C-glycosylés

Le CO₂ supercritique peut être une alternative aux solvants organiques avec quelques avantages (la durée d'extractions plus courte, une sélectivité

élevée et une facilité d'éliminer le solvant après l'extraction par simple décompression) mais l'application de la technologie du CO₂ supercritique aux solutés polaires comme les composés polyphénoliques et gluconiques est limitée par le faible pouvoir de solvatation du CO₂ supercritique pour ces composés, ce qui conduit à l'addition des co-solvants. Or l'utilisation de ces derniers fait perdre à cette technologie son avantage majeur qui est la facilité d'éliminer le solvant.

Tableau 2.2 : Les co-solvants utilisés dans l'extraction des saponines par le CO₂ supercritique : [20]

Source de saponine	Co-solvant
Ginseng ginsensides	Ethanol
Saikosaponines	Méthanol
Licorice (acide glycyrrhizique)	Méthanol aqueux

- Effets du solvant sur le rendement d'extraction : Le choix du solvant pour une application particulière doit se baser sur l'effet du solvant sur le rendement, la pureté des saponines et la composition des mélanges de saponines. Le rendement de saponines obtenues par extraction avec l'alcool aqueux (40-80%) avec la *Quinoa* est plus élevé que celui obtenu par extraction avec l'eau ou l'alcool pur. L'extraction assistée par les ultrasons et par Soxhlet de *Ginseng* utilisant le n-butanol saturé avec de l'eau donne un rendement plus élevé que celui du méthanol pur ou à 10%.
- Effets du solvant sur la composition des saponines et les propriétés des extraits : l'extraction par solvant affecte aussi la composition de l'extrait en saponines et les propriétés physicochimiques comme : la taille, la distribution de taille, la morphologie des particules, les isothermes de sorption, les densités, les propriétés de l'écoulement et les profils de compaction qui sont de grande importance dans les applications pharmaceutiques.[20]
- Effets de la température: la température peut affecter le rendement et la composition.

- Effet du quotient du solvant: effet du quotient (poids du solide en gramme/ volume du solvant en mL) peut affecter le rendement et dépend de la source des saponines et de la méthode d'extraction.[20]

Tableau 2.3 :L'effet du quotient du solvant sur le rendement en saponines

méthode	source	quotient	%
Micro-onde	Acide glycerrhizique	1 :5	1.88%
		1 :20	2.58%
	Saponine de quinoa	1 :10-50	optimal
Micro-onde	ginseng	1 :20	4.31
		1 :10	4.33
		1 :5	4.07

2.2.1.2.2. Les méthodes d'extraction par solvant:

Notamment en théorie, il existe différentes méthodes d'extraction des métabolites secondaires. L'une de ces méthodes est adoptée par notre laboratoire. Les étapes essentielles sont :

- La macération : une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante.
- Extractions successives de type liquide-liquide par des solvants de polarité croissante. [23]

Les autres méthodes sont :

- La lixiviation ;
- Extraction par chauffage à reflux ;
- La percolation ;
- Macération ;
- La Décoction ;
- L'Infusion ;
- La Digestion (leaching) ;
- L'élution.

-

2.2.1.3. Purification des saponines :

La méthode commune pour une purification préliminaire des saponines après l'étape de l'extraction est la partition des saponines entre l'extrait aqueux et le n-butanol, comme elles sont purifiées par précipitation, par adsorption, par ultrafiltration et par chromatographie [20]

2.3. Quelques méthodes d'extraction décrites dans la littérature :

a) La méthode élaborée par Applebaum et al. (1969) :

Les saponines sont extraites selon la méthode élaborée par Applebaum *et al.* (1969) et légèrement modifiée. Le broyat du fruit de *C. frutescens* a été délipidé durant deux heures par du n-hexane. Après l'élimination de la phase organique, le précipité obtenu a été macéré dans l'éthanol absolu sous agitation magnétique à la température ambiante pendant 24 heures. La phase éthanolique a été évaporée à sec sous vide à 40 °C par le rotavapor. Le résidu sec a été extrait trois fois par un mélange eau distillée/éther de pétrole (v : v) chauffé à 50 °C dans un bain-marie pendant 30 minutes. Les phases aqueuses ont été mélangées puis reprises par n-butanol.. La phase organique, évaporée à sec à 40 °C par le rotavapor.[24]

b) La méthode suggérée par Huang

Des saponines ont été extraites à partir *du S. mukorossi* par la méthode suggérée par Huang avec une légère modification. Les péricarpes *du Sapindus mukorossi* sont broyées et extraites trois fois avec l'eau bouillante. Après filtration, l'extrait à l'eau est concentré, divisé et traité avec un volume égal d'acétate d'éthyle. La phase d'acétate éthylique a été encore divisée avec un volume égal de n-butanol puis a été évaporée.[25]

c) La méthode utilisée pour l'extraction de six ginsenosides(Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re and Rg1) des racines de *P. quinquefolius*.

La méthode d'extraction : la sonication dans le méthanol à température ambiante.[26]

- d) La méthode : chauffage à reflux avec une solution aqueuse d'éthanol à 70 % dans un bain marie pour une heure, le filtrat est évaporé à sec sous vide , le résidu est dissous dans l'éthanol aqueux à 70%, transféré dans un ballon jaugé, et dilué. La solution témoin est centrifugée à 3000 *tours* pendant 10 minutes.[27]
- e) La poudre des racines *de koreana de P* est pesée exactement et extraite au moyen du méthanol de 50% pour 2 h à 90°C, en utilisant un reflux. Cet extrait est filtré, évaporé sous vide, puis suspendu dans 100 ml de méthanol à 50% dans une fiole jaugée. Cette solution est filtrée à l'aide d'une membrane de 0.45 µm (millipore, nylon, 170 millimètres).[28]
- f) Les pousses *des officinalis de A* sont extraites par percolation avec 2.5 L d'éthanol aqueux (70%) à la température ambiante pour 24 h, puis soniquées trois fois à pH 5.0 (3 x 2.5 L), les solutions combinées d'extraction sont transférées dans la centrifugeuse et centrifugées à 5000 tr/mn pour 10min, de sorte que l'extrait de saponines soit obtenu (Huang et Kong, 2006 ;Mandal *et autres.*, 2006). Cet extrait est alors concentré à sec en chassant le solvant dans l'évaporateur rotatif sous pression réduite.[29]
- g) Quelques méthodes nouvelles employées pour l'extraction des saponines.[30]

Méthodes	Plantes extraites
Micro-ondes et ultrasons	Ginseng (ginsenosides)
Micro-ondes et ultrasons	Pois chiches
Micro-ondes et ultrasons	Racines licorice l'acide glycyrrhizique
Extraction accélérée par solvant	châtaignées
	Panax ginseng ginsenosides
Micro-onde	Saponines de <i>Notoginseng</i> , <i>Panax Notoginseng</i>

CHAPITRE 3

LES SAPONINES

Les saponosides ou saponines sont un groupe de métabolites secondaires fréquemment rencontrés chez les végétaux. Ils tirent leur nom du latin *sapo* signifiant savon en raison de leur propriété à former des solutions moussantes en présence d'eau.[31]

3.1. Les sources des saponines :

La présence des saponines a été reportée dans plus de 100 familles de plantes.

3.1.1. Les saponines dans le règne végétal :

Les sources des saponines consommables sont les légumes (pois, pois chiche, haricot, les arachides, lentille, avoine, l'ail (gallique) asperges, thé, épinards, betteraves, et igname [32]. Les majeures sources des saponines non alimentaires mais utilisées dans la santé et l'industrie sont : l'arbre de savon *Quillaya saponaria*, fenugrec, *alfafa*, marronnier, licorice, saponaire (saponine officinaux), *Mojave yucca*, *Sarsaparilla* et Ginseng (*Panax*) [33] comme elles ont été trouvées dans les sécrétions défensives de certaines insectes. (Appendice B)

Les espèces d'une même plante peuvent contenir un mélange complexe de saponines. La composition en saponines d'une partie de la plante est affectée par: l'espèce de la plante, l'origine génétique, la partie de la plante examinée, les facteurs environnementaux et agronomiques associés à la croissance de la plante, par le traitement comme le stockage et le proceeding [34].

3.1.2. Les saponines dans le règne animal :

Dans le règne animal, on n'a retrouvé ces produits que chez les échinodermes. Ainsi, de grandes quantités de ceux-ci ont été retrouvées dans

les tissus d'étoiles de mer et de concombres de mer, tandis que chez les ophiures, les échinides et les crinoïdes, ces substances ont été retrouvées 'en traces.[35]

3.2. La structure des saponines :

Au niveau structural, les saponines sont classées en deux groupes en fonction de la nature de leur génine pouvant être de type stéroïdique ou triterpénique. Les unités saccharides qui constituent les saponines sont communes: glucose, galactose, arabinose, rhamnose, xylose, fucose et acide glucuronique. La partie sucre de la molécule peut compter jusqu'à 11 oses liés à la génine par une liaison de type acétal. Habituellement, la liaison glycosidique s'effectue entre une seule section saccharidique et le groupement hydroxyle en position 3 de la génine monodesmoside. Toutefois, un deuxième chaînon peut s'ajouter par une liaison ester avec le carboxyle en position 28 pour donner une bidesmoside. Ces bidesmosides facilement converties en monodesmosides par hydrolyse chimique ou enzymatique, sont de loin les saponines les plus fréquentes de la pharmacopée végétale. [19]

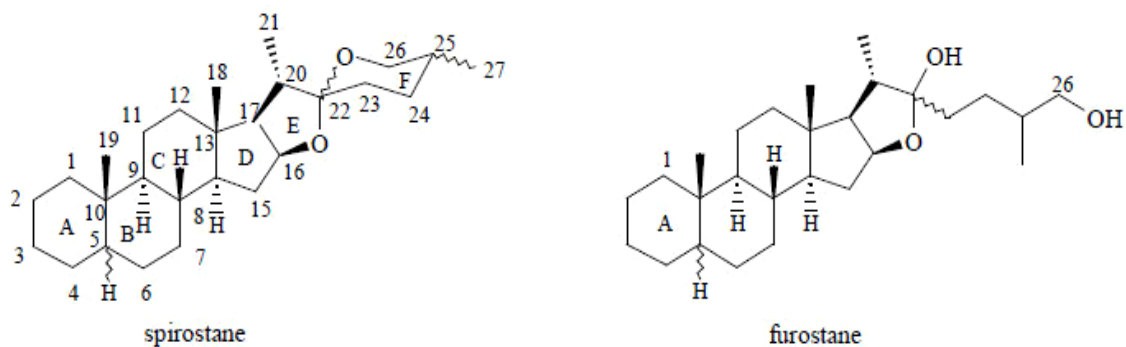


Figure 3.1 :Les principaux squelettes stéroïdiques [36]

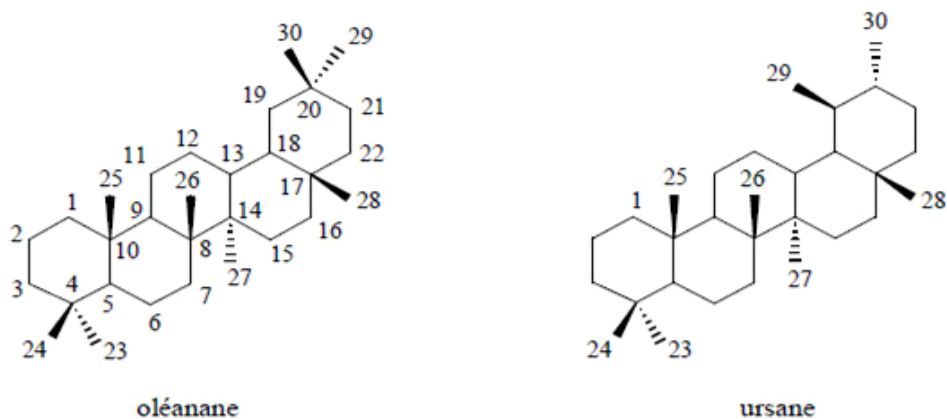


Figure 3.2 : Les principaux squelettes triterpéniques[36]

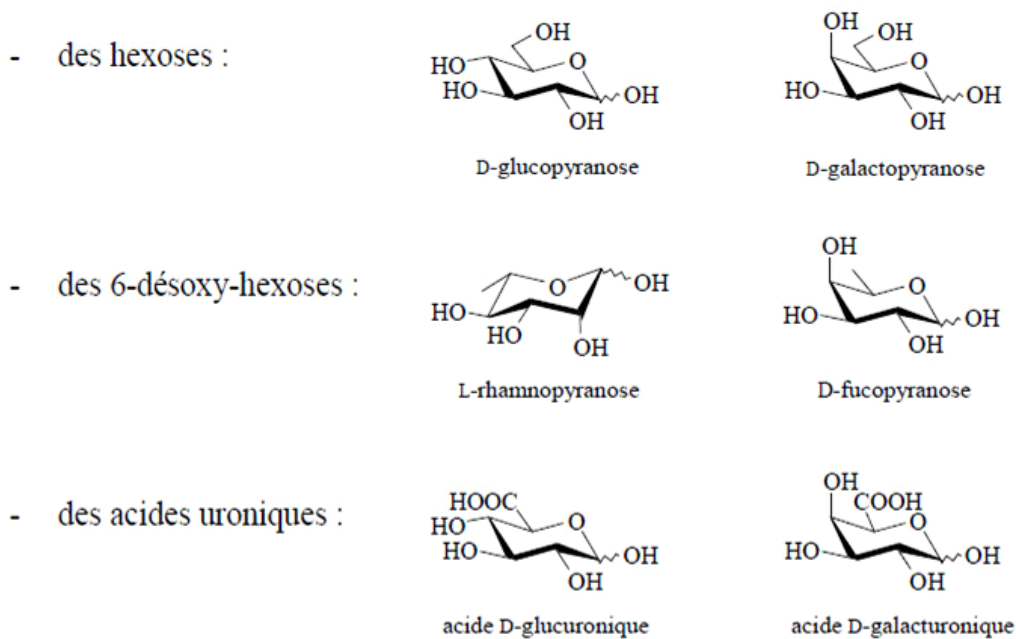


Figure 3.3 : Les sucres les plus courants au niveau des saponosides [36]

3.3. La biosynthèse des saponines :

Les métabolites secondaires jouent un rôle dans la défense de la plante. Les animaux et les oiseaux peuvent s'évader à une prédation par un mouvement rapide, les plantes n'ont pas cette capacité, alors elles ont développé des mécanismes de protection contre les herbivores phytophages,

les microorganismes phytopathogéniques (bactérie, champignon, virus) les plantes compétitives de nutriments et de lumière et contre les dommages de la lumière UV.[37]

3.3.1. Sites de biosynthèse et de stockages de métabolites secondaires dans la cellule végétale :

La biosynthèse des métabolites secondaires se fait dans les vésicules cellulaires. Le site initial de leur synthèse se trouve dans un seul organe comme les racines, les fruits ou les feuilles, puis ils sont transportés autour de la plante via le phloème ou le xylème par transport symplectique ou apoplectique puis emmagasinés dans différents tissus. (Appendice C)

Le site de stockage dépend souvent de la polarité des métabolites secondaires: les composés hydrophiles comme les alcaloïdes glucosinolates et les tannins sont stockés dans les vacuoles ou les idioblastes, et les composés hydrophobes (lipophiliques) comme les huiles essentielles à base de terpènes sont stockés dans les trichomes, les poils glandulaires, la membrane thylacoïdale ou les cuticules. [37] (Appendice D)

Cependant les métabolites secondaires performant d'autres rôles incluant l'action entant qu'attractant volatil pour promouvoir la pollinisation par les oiseaux et les insectes, agent colorant pour des raisons de camouflage ou d'attraction, lancer des signaux pour bénéficier de la colonisation par des microorganismes bénéfiques symbiotiques comme le champignon mycorhize et le rhizobée fixateur de N.

Paradoxalement, l'évolution des composés bioactifs de défense dans les plantes a produit des substances qui peuvent avoir d'autres effets bénéfiques dans le domaine de la biotechnologie, dans la pharmacie, dans la médecine et dans l'industrie agricole. [38]

3.3.2. Biosynthèse de triterpénoides :

La diversité au niveau structural des triterpènes résulte des nombreuses conformations que peut adopter le substrat acyclique. Pour une réaction de cyclisation donnée, c'est l'enzyme qui impose cette conformation via ses interactions enzymes / substrat au sein du site actif. [39]

Par exemple, les enzymes prényl-transférase et terpène synthase sont responsables de la diversification des triterpènes par deux réactions opérées sur des différents substrats : L'une de l'addition répétitive d'unité C₅, l'autre de la cyclisation.[40]

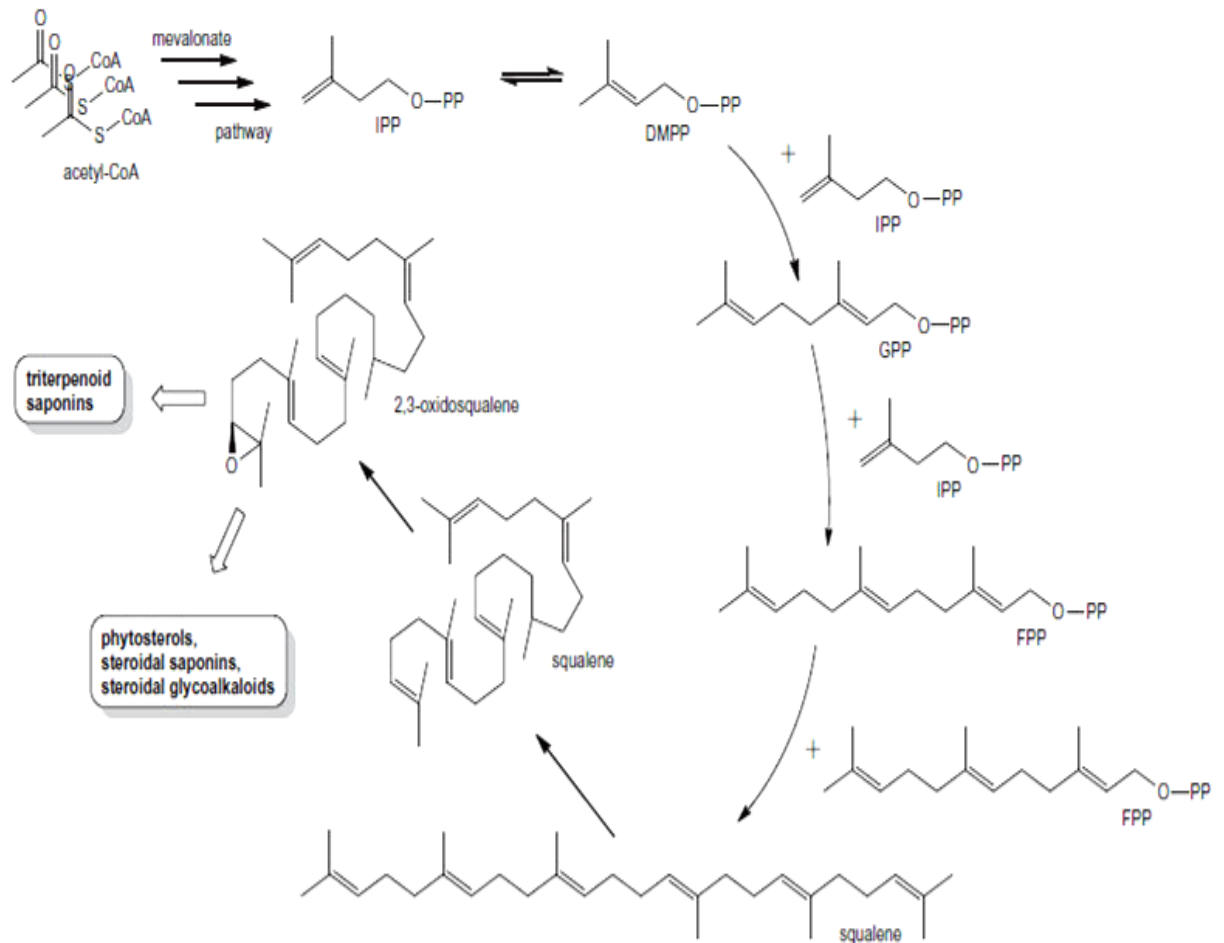


Figure 3.4: Les étapes de biosynthèse de phytostérols et des saponines triterpanoïdes [41]

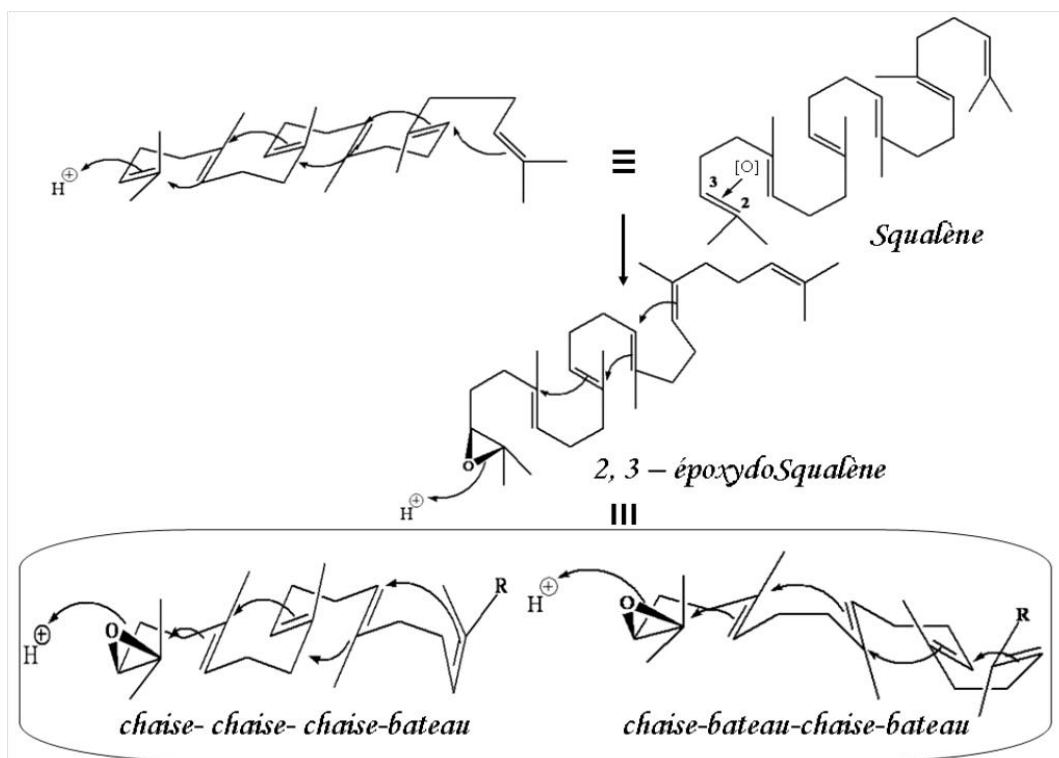


Figure 3.5 : Oxydation du squalène.[40]

C'est de la conformation initiale de l'époxysqualène sur la surface de l'enzyme que dépend l'orientation de la biosynthèse vers les stéroïdes et les triterpènes d'autre part.

1 – si l'époxysqualène est maintenu dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostane précurseur immédiat, par une suite de migration 1, 2 de protons et de méthyles, des cycloartanes et des cucurbitanes (ces migration sont rendues possibles par la disposition trans-antiparallèle des protons et méthyles en C-17, C-13, C-14 et C-8).

2 – si l'époxysqualène est maintenu dans une conformation chaise-chaise- chaise-bateau, la cyclisation conduite à un cation dammarane, qui peut aussi se réarranger :

– soit par des migrations concertées conduisant au tirucallol et à l'euphol, précurseurs des limonoïdes et quassinoïdes.

– soit, et c'est le cas le plus fréquent, par formation d'un cycle supplémentaire ce qui conduit aux triterpènes pentacycliques : oléananes, ursanes, lupanes, friedelanes et taraxastanes, etc.[19]

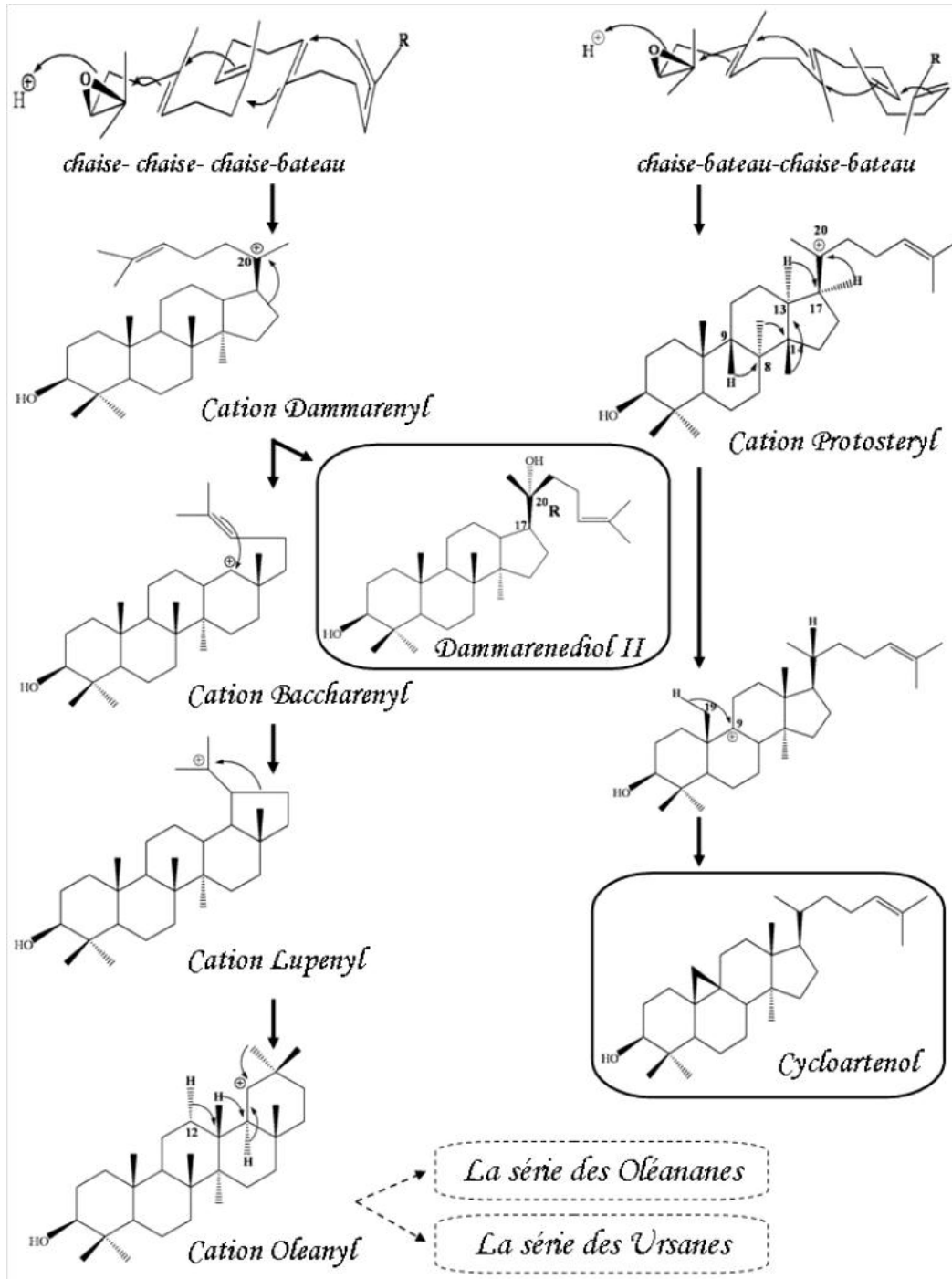


Figure 3.6 : Les principaux cations dans la biosynthèse.[40]

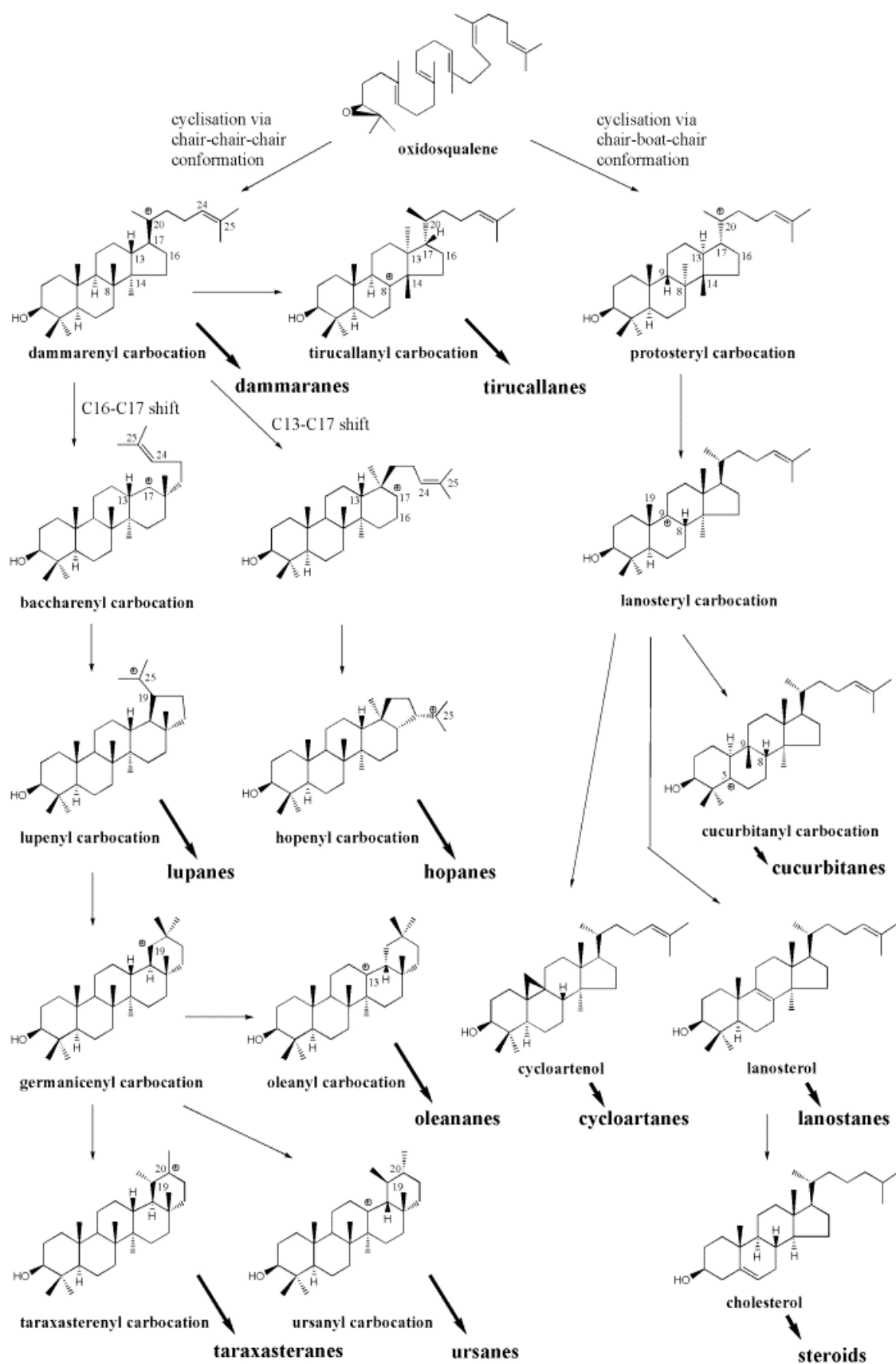


Figure 3.7: La cyclisation de l'oxidosqualene pour donner différentes saponines [42]

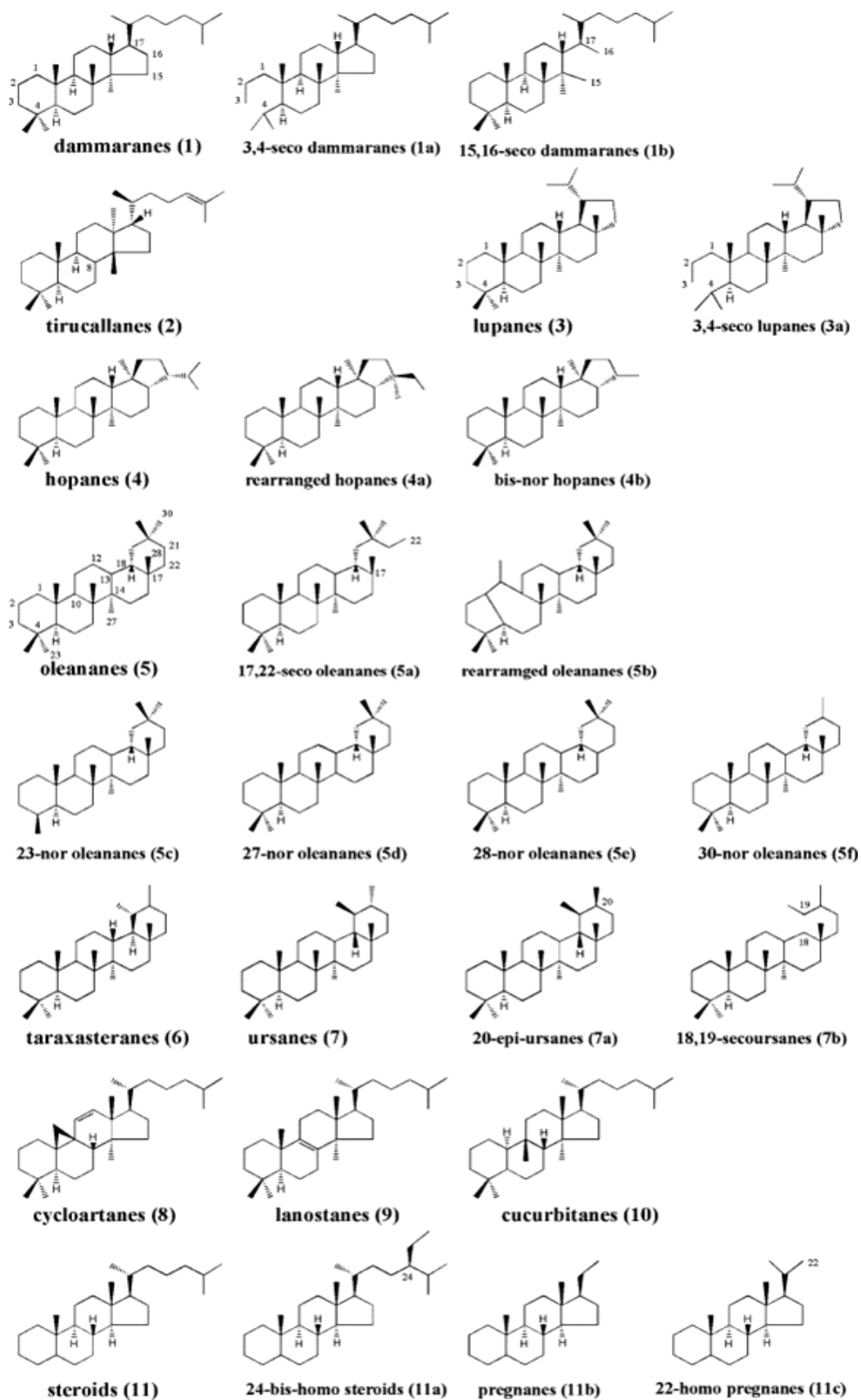


Figure 3.8 : Les structures des 11 classes importantes de saponines après cyclisation, et leurs différents dérivés.[42]

3.4. La synthèse de saponines :

Dès le début des années 1980, la communauté scientifique a montré un intérêt marqué envers la synthèse de saponines monodesmosidiques.

3.4.1. Synthèse de monodesmosides :

Les méthodes de synthèse utilisées impliquaient pour la plupart des sucres peracétylés et activés en position anomérique par des halogènes tels que le brome et le fluor [43]. Un groupe de chercheurs chinois dirigé par le Dr. Biao Yu publia un article dans « le *Journal of Organic Chemistry* » relatant la glycosylation à hauts rendements de génines triterpéniques et stéroïdiques[44]. Ces travaux ont montré que l'utilisation de sucres perbenzoylés activés par la fonction trichloroacétimide selon la méthode de Schmidt [1994] permettait l'obtention de produits glycosyliés dans des rendements quasi-quantitatifs lorsque la réaction se déroulait en présence du promoteur trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf).

L'emploi des sucres perbenzoylés activés par les trichloroacétimides est devenu monnaie courante dans le domaine de la synthèse des saponines et de leurs analogues. [45]

Exemple : Le trichloroacétimide cible a été préparé par la déprotection du groupement MPM et l'activation subséquente de la position anomérique à l'aide de CCl_3CN et DBU (81%, deux étapes).

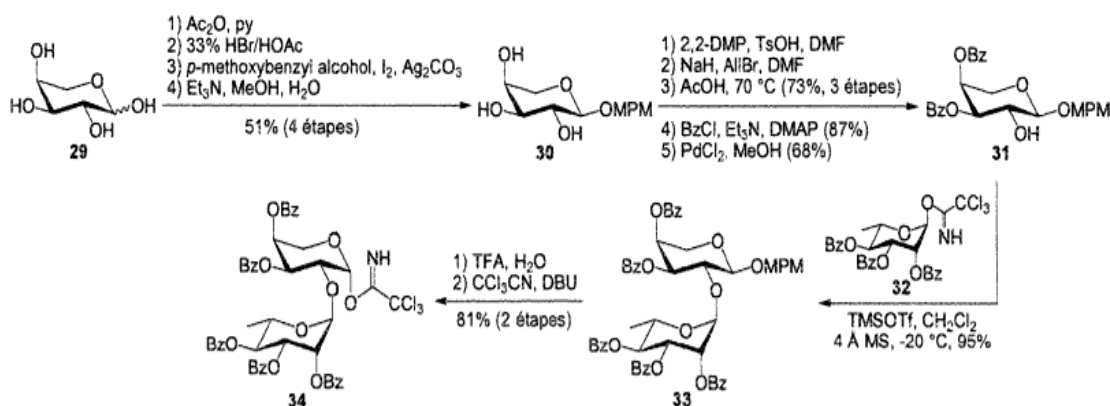


Figure 3.9 : Synthèse du 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-di-*O*-benzoyl- α -L-arabinopyranosyl trichloroacétimide [45]

3.4.2. Synthèse de bidesmosides

Les bidesmosides, saponines contenant deux sections osidiques, sont reconnus pour exercer une activité hémolytique plus faible que les monodesmosides correspondants, ce qui les rend très attrayants d'un point de vue pharmacologique. La première synthèse d'une saponine bidesmosidique à génine triterpénique (Figure 3.10) a été rapportée par Yu et ses collaborateurs à la fin des années 90 dans « le *Journal of the American Chemical Society* » [45]. Toutefois, la posladine, un bidesmoside à génine stéroïdique et certains bidesmosides de type lupane ont été synthétisés bien avant cette date par des groupes japonais et russes, respectivement. [46]

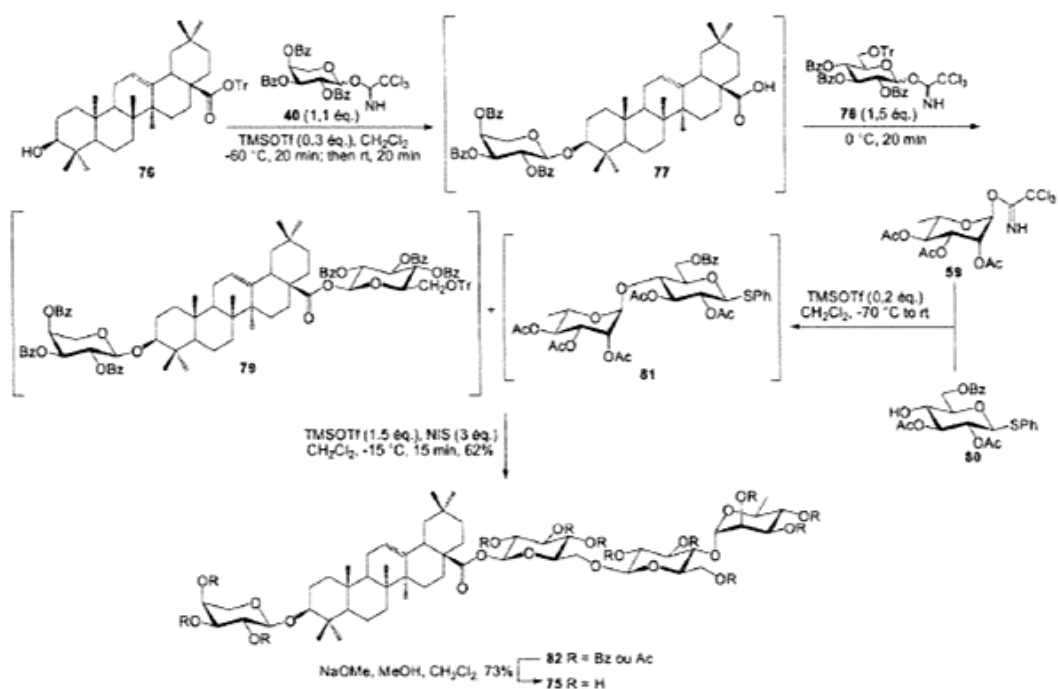


Figure 3.10 : Synthèse d'une saponine bidesmosidique par glycosylations successives

3.5. Les Propriétés des saponines :

La complexité structurale des saponines implique différentes propriétés physiques, chimiques et biologiques et quelques-unes seulement sont communes avec tous les membres de ce groupe divers.

3.5.1. Les propriétés physicochimiques :

Leur nature amphiphile leur confère les propriétés d'agents de surface, détergent, mouillant, émulsifiant, moussant. Ils forment des micelles dans les solutions aqueuses dont la taille et la structure dépendent du type de saponines.

Les propriétés des micelles formées telles que la CMC et le nombre d'agrégation sont affectées par la température, la concentration du sel et le pH. L'incorporation du cholestérol dans les micelles de saponines augmente leur CMC, leur taille, leur viscosité et leur nombre d'agrégations ce qui entraîne l'augmentation de la solubilité du cholestérol d'un facteur de 10^3 à la température ambiante. Elles peuvent solubiliser le phénanthrène et le fluoranthène. Les saponines extraites du *Sapindus mukorossi* ont solubilisé l'hexachlorobenzène et le naphthalène. La solubilité du jaune OB et de la progestérone en présence de saponines bidesmosides du *Sapindus mukorossi* a augmenté.

Les saponines purifiées ou les mélanges de saponines peuvent avoir un effet de solubilisation sur d'autres saponines. L'augmentation de la solubilité des monodesmosides (comme celle du *Sapindus mukorossi*) qui ont une faible solubilité dans l'eau, en présence de saponines bidesmosides a été bien documentée.

La solubilité des monodesmosides du *Sapindus Mukorossi* a augmenté en présence de saponines bidesmosides du *Sapindus mukorossi* contenant l'hederagenine (Y1,Y2,X), cependant les bidesmosides du *mukorossi* n'affectent pas la solubilité des saikosaponines. Les composés comme les oligoglycosides sesquiterpenes acycliques ont montré un effet de solubilisation sur les monodesmosides du *Sapindus mukorossi*

L'interaction des stérols, des minéraux et des protéines avec les saponines conduit à des modifications des propriétés physicochimiques et de l'activité biologique de ces composés. La nature et l'effet de l'interaction type protéine-saponine dépendent du type de protéine, du mélange de saponines et de la température. L'ajout de saponines réduit la capacité de former les

émulsions et la mousse des protéines mais augmentent la stabilité de leurs mousses et émulsions. [20]

3.5.2. Les Activités biologiques des saponines :

La littérature scientifique rapporte des propriétés médicinales très variées: anticarcinogénique, anti-inflammatoire, antitumorale, antivirale, antifongique, antithrombique, cardiovasculaire, cytotoxique, immunomodulatoire, spermicide et molluscicide. [47]

- Activité hémolytique : les saponines varient considérablement dans leur capacité de lyser les erythrocytes. Les bisdesmosides sont généralement moins hémolytiques que les monodesmosides.
- La capacité de complexation des stéroïdiques : les saponines forment des complexes insolubles avec le cholestérol et autres stérols. Cette affinité est plus prononcée avec les saponines stéroïdes et glycoalcaloïdes qu'avec les terpénoides .
- Activité biocide : les monodesmosides montrent une bonne activité fongitoxique ou fongistatique et une faible activité antimicrobienne [20] .

3.5.3. Les saponines en tant que biosurfactants :

La consommation annuelle mondiale de tensioactifs représente aujourd'hui 12 millions de tonnes, dont environ 3 millions pour l'Europe, ce qui représente un chiffre d'affaire mondial de 13 milliards d'euros. 75 à 80% de ces composés amphiphiles sont issus de la pétrochimie.

Il s'avère que dans un contexte de développement durable et en réponse à la mise en place actuelle de la réglementation REACH, de nouveaux tensioactifs sont à développer à partir de matières premières naturelles renouvelables. Les prévisions de leur consommation incitent un accroissement significatif de leur production. Pour satisfaire cette demande, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules amphiphiles répondant aux nouveaux besoins et exigences des industriels, produits performants à coût réduit, et des consommateurs, produits écocompatibles ayant un impact réduit sur l'environnement. les procédés mis en œuvre pour fonctionnaliser les matières premières végétales respectent au mieux les principes de la chimie verte :

(1)réduction des déchets,(2)conception de produits non toxiques, (3)utilisation de voies de synthèse moins nocives, (4)utilisation de ressources renouvelables, (5)utilisation d'un processus catalytique à la place de réactifs en proportion stœchiométrique, (6)réduction des dérivés chimiques, (7)respect de l'économie d'atomes, (8)utilisation de conditions opératoires et des solvants à impact sanitaire réduit, (9)amélioration des rendements énergétiques, (10)conception de produits biodégradables, (11)analyse des émissions en temps réel pour lutter contre la pollution et (12)réduction des risques d'accidents.

3.5.3.1. Les tensioactifs naturels :

En 2005, la consommation française de biotensioactifs est de l'ordre de 100 000 à 120 000 tonnes par an, avec une part de marché des biotensioactifs de 25 à 30%. Deux secteurs consomment plus de 70% des biotensioactifs : le secteur de la détergence ménagère avec 42 000 tonnes, ce qui représente un taux de pénétration de 20 à 25% et celui des cosmétiques avec 35 000 tonnes, soit un taux de pénétration de 60 à 80%.[48]

3.5.3.1.1. Définition :

Un tensioactif naturel est issu des ressources naturelles d'origine animale ou végétale. Ainsi un tensioactif dont l'une de ses parties, hydrophobe ou hydrophile, est obtenue à partir d'une source naturelle est appelé tensioactif naturel ou biotensioactif.

Les tensioactifs naturels doivent être obtenus par des procédés de séparation tels que l'extraction, la précipitation ou la distillation qui n'introduisent pas de pollution.

Ils sont groupés en trois catégories selon leur origine : microbienne, animale (lécithine, la gélatine, caséine) ou végétale (les saponines). La plus part des biosurfactants sont anioniques ou non ioniques, rare sont les cationiques (comme ceux qui contiennent un groupe amine). [49]

3.5.3.1.2. Application des biosurfactants :

Les biosurfactants offrent des avantages sur les surfactants synthétiques en terme de leur dérivation de ressources naturelles renouvelables, faible ou non toxicité, biodégradabilité, excellente activité de surface, possibilité de réutilisation par régénération, spécificité élevée, efficacité sous conditions de pH et de température extrêmes. Les principales fonctions des biosurfactants incluent la solubilisation, l'émulsification, la dispersion, leur capacité d'agent moussant, mouillant et détersif, et dans certains cas antimicrobien bactéricide, fongicide, molluscicide, larvicide et désodorisant. Par conséquent l'intérêt apporté aux biosurfactants est en hausse continuellement, ils sont utilisés dans l'industrie seuls ou mélangés avec d'autres biosurfactants ou surfactants synthétiques pour offrir les caractéristiques de performance désirées. Dans l'industrie alimentaire, les biosurfactants agissent comme agent émulsifiant, moussant, stabilisant, antioxydant et antiadhésif. Les applications agricoles et environnementales sont les domaines majeurs d'utilisation des biosurfactants où ils jouent un rôle important dans la remédiation des sols et la production du pétrole (huile), l'élimination des plantes pathogènes, comme ils ont trouvé l'application dans les détergents, la peinture et la cosmétique.[49]

3.5.3.1.3. Les saponines sont des biosurfactants nonioniques :

Les tensioactifs non ioniques (NI) ont les propriétés suivantes :

- Ils sont Compatibles avec toutes les autres classes de tensioactifs.
- Ils sont plus solubles dans les solvants polaires et non polaires que les tensioactifs ioniques.
- Ils ont de bonnes propriétés toxicologiques
- Ils ne possèdent pas de charge électrique
- Ils forment un film interfacial plus compact et un rayon de courbure plus grand des gouttelettes de la phase dispersée
- Ils ne sont pas affectés par les ions bivalents et solubilisent les sels de ces ions en présence de tensioactifs anioniques, ils sont ajoutés dans toutes formulations susceptibles d'être utilisées dans des eaux calcaires comme :

- les détergents domestiques ;
 - les liquides pour la vaisselle ;
 - les shampooings ;
 - les formulations phytosanitaires ;
 - les produits pour le travail des métaux.
- Ils sont moins moussants mais les mousses sont plus stables et résistantes au rinçage.
 - Ils ont en général une toxicité aiguë moins forte (irritation de la peau et sensibilisation) et, pour cette raison, sont particulièrement appréciés par l'industrie cosmétique et pharmaceutique.[50]

3.6. Les biotensioactifs du fruit du *Sapindus mukorossi*

Les saponines brutes obtenues des péricarpes du *Sapindus mukorossi* qui se développent en Chine et au Japon ont été utilisées comme détergent naturel, comme stabilisateur des mousses dans les extincteurs chimiques au Japon. L'extrait de saponines de cette plante est listé parmi les ingrédients cosmétiques et est autorisé par le ministère de la santé comme ingrédient de cosmétiques. Ces saponines ne peuvent pas être utilisées comme ingrédients alimentaires parce qu'elles contiennent des glycosides hederagenines et les oligoglycosides sesquiterpènes qui peuvent être toxiques. Pour leur activité antidermatophyte, elles sont des matières premières dans le domaine cosmétique. Les tests de toxicité dermique n'ont pas montré des effets, d'irritation dermique primaire, de sensibilisation, de phytotoxicité, et de photosensitisation.[51]

La longueur de la chaîne de sucre et son branchement est en corrélation avec l'accroissement du pouvoir surfactant, aussi les bisdesmosides triterpéniques sont plus actives que les monodesmosides.

Quetin-Leclercq et al ont montré l'activité cytotoxique des saponines isolées du *S. mukorossi* sur les cellules mélanomes B16 et sur les cellules tumorales humaines HeL.[52]

3.7. Toxicologie :

La toxicité des saponines aux espèces homéothermiques par voie orale est de (50-100 mg/kg). Les saponines montrent différents spectres de toxicité des applications parentérales ou intraveineuses (LD_{50} 0.7—50 mg/kg). L'action hémolytique de certaines saponines empêche leur administration intraveineuse. La détoxification par formation de complexes avec le sérum de cholestérol, l'albumine et autres constituants du plasma, réduit cet effet. Les saponines membranolytiques se combinent irréversiblement avec les membranes cellulaires et produisent des lésions avec un diamètre des pores d'environ 8nm.

Différentes saponines ont réagi suivant plusieurs méthodes avec les érythrocytes et les membranes liposomiques tout en respectant le cholestérol, la phosphatidylcholine et la distéaroyllecithine.

La toxicité des saponines aux animaux à sang froid dépend du mode d'administration, de la source, de la composition et de la concentration des saponines. Suite aux résultats des études in vivo sur les rats et les souris, Gestetner suggère que les saponines ne sont pas absorbées avec la chaîne alimentaire mais elles sont hydrolysées en sapogénines par action enzymatique.

La sécurité de consommation des saponines en tant qu'additifs alimentaires est discutée dans plusieurs revues comme « JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES ». Pour les saponines de Quillaja, la dose prise acceptée quotidiennement (ADI) (Acceptable Daily intake) est basée sur le contenu des extraits de saponines (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2005 b). [52]

CHAPITRE 4

LES BIOPESTICIDES

4.1. Définition :

Les pesticides sont des substances dont la terminaison du nom en « cide » indique qu'ils ont pour fonction de tuer des êtres vivants, Ils sont composés d'un principe actif d'origine naturelle ou synthétique.

« Les biopesticides » = terme générique qui englobe les différentes méthodes de contrôle des ravageurs de cultures:

- Microorganismes (virus, bactéries, champignons)
- Métabolites bactériens (antibiotiques)
- Pesticides naturels dérivés de plantes
- Phéromones d'insectes
- OGM pour transformer les plantes et la résistance aux champignons, aux virus et aux insectes ou pour les rendre résistantes aux herbicides
- Nématodes entomophages.[53]

4.2. Les biomolluscicides :

Un produit molluscicide est une substance active ou une préparation ayant la propriété de tuer les mollusques. Les biomolluscicides sont des molluscicides naturels d'origine végétale.

En protection des cultures, les biomolluscicides sont employés principalement pour tuer les limaces et les escargots. Ils sont aussi utilisés pour des raisons sanitaires en zone tropicale, pour lutter contre certaines parasitoses telles que les Schistosomiasis pour lesquelles l'escargot est un hôte intermédiaire obligatoire.[54]

4.2.1. Les limaces phytophages et vecteurs de maladie:

Les limaces sont généralement grégaires et peuvent causer de sérieux dommages lorsque les populations sont importantes. Dans plusieurs sites, les

limaces ont causé autant de dommages que les insectes ravageurs (Anonyme, 1998). L'éradication et le contrôle des limaces sont difficiles et onéreux.

Elles sont très polyphages et s'attaquent particulièrement aux céréales, légumes (bettes, pois, carottes, endives, laitue), avocats, maïs, fraises, tomates, pommes de terre, tabac, crucifères, tournesols, orchidées. [55]

Les limaces se nourrissent principalement des feuilles (limbe surtout) mais s'attaquent également aux semences, tubercules (pomme de terre) et fruits (fraises). Les dégâts qu'elles engendrent ne sont pas négligeables. Les pertes sont dues à la consommation et aux souillures qui rendent les fruits, légumes et fleurs invendables. De plus, elles véhiculent avec leur mucus et leurs crottes des agents pathogènes envers les plantes (virus de la mosaïque, bactéries, moisissures) et envers les hommes (nématodes, douve du foie) [55]. En France et en Angleterre, le marché des molluscicides représentait, en 1993, \$44 et \$26 millions CN respectivement.

4.2.2. Epidémiologie de la bilharziose :

La bilharziose ou schistosomiase, sous ses diverses formes, est une maladie parasitaire, transmise à l'homme par des vers trématodes. Connue depuis l'Antiquité, elle se place aujourd'hui dans les statistiques de l'OMS comme la seconde maladie après la malaria [56]. On estime à 200 millions, le nombre de personnes atteintes dans le monde tandis que 500-600 millions encourent le risque d'être infestés par les schistosomoses. [57]

4.2.3. La lutte contre la bilharziose :

Au cours des dix dernières années, de nombreux projets de lutte contre la schistosomiase réalisés au Brésil, en Egypte, au Ghana, à Madagascar, aux Philippines, en République-Unie de Tanzanie, au Venezuela, au Zimbabwe (Rhodésie du Sud) et ailleurs ont montré que la destruction des mollusques au moyen de molluscicides, seule ou associée à d'autres méthodes (chimiothérapie, modification de l'environnement, éducation pour la santé.) peut être un moyen rapide et efficace de réduire ou d'éliminer la transmission. [58]

4.2.4. Les foyers de la bilharziose en Algérie :

En Algérie, il existe trois foyers actifs dans les oasis sahariennes des régions de Djanet, de Béni Abbés et de Biskra et au nord dans la région d'Alger (plaine de la Mitidja, foyers de Reghaia et du Gué de Constantine) enfin près d'Oran (foyer de Jdioua).

En 1965, l'Organisation mondiale de la santé a apporté son soutien à la préparation et à la publication de directives pour la sélection et l'évaluation de molluscicides. Les méthodes établies et les recommandations formulées à ce moment restent valables jusqu'à nos jours. [59]

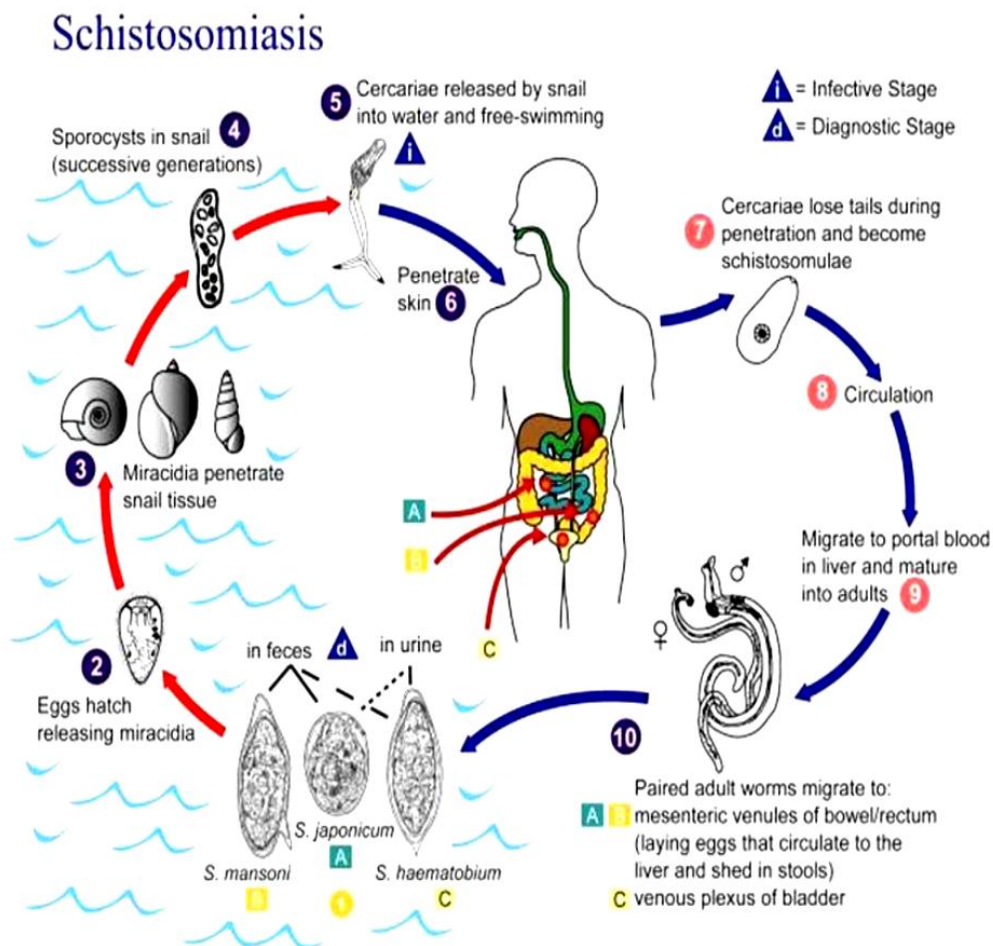


Figure 4.1: Cycle évolutif des schistosomes.[59]

Récemment il y a eu un regain d'intérêt pour l' étude de molluscicides végétaux d'origine locale. Cet attrait est fondé en grande partie sur le principe

de l'autosuffisance, et la possibilité d'économiser des monnaies convertibles n'est pas non plus la moindre des préoccupations. Il a été fait état dans la littérature de nombreux molluscicides végétaux.

4.2.5. Plantes à visée molluscicide :

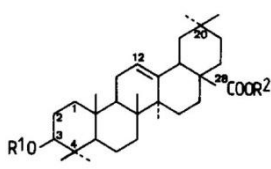
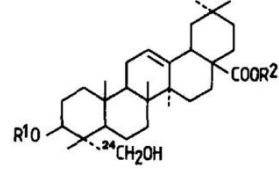
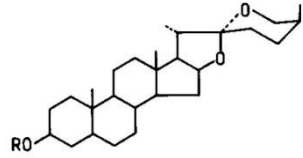
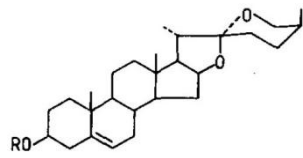
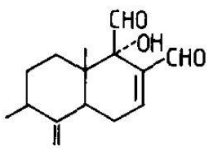
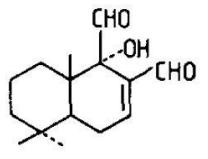
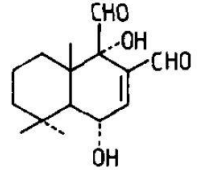
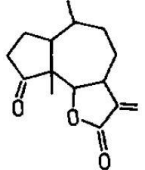
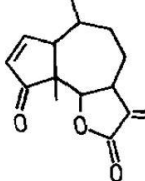
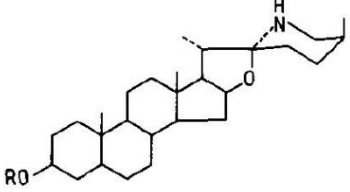
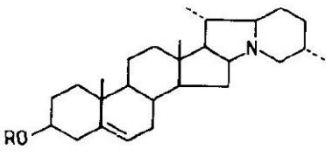
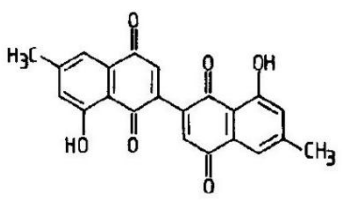
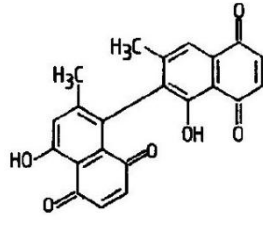
Les critères prévalant dans le choix de la plante molluscicide ont été fixés par spécifications de l'OMS (OMS., 1965) et puis modifiés pour les besoins de criblage des substances naturelles [60] Selon cet auteur :

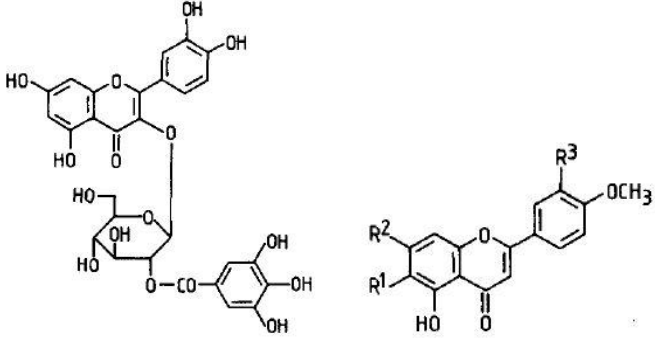
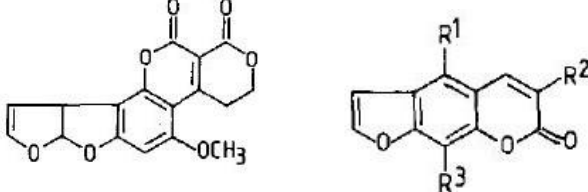
- l'extrait brut est considéré doué d'activité molluscicide, quand la dose létale 90 (DL90) de 100 µg/ml ;
- les fractions enrichies et substances pures 20 µg/ml ;
- la plante en question doit croître abondamment en zone d'endémie, ou peut être facilement cultivée. Les parties employées devraient être régénératives (fruits, feuilles, fleurs) et non pas les racines.
- l'extraction des constituants devrait se faire à l'eau.
- la procédure d'application devrait être simple et non nocive pour l'opérateur.
- la plante employée doit avoir une faible toxicité vis-à-vis des organismes non ciblés y compris l'homme.
- le coût d'exploitation doit être faible.

Tableau 4.1: Les classes majeures de produits naturels avec une activité molluscicides reconnues d'après A. MARSTON et K. HOSTETWANN [60]

Classes des composés	plantes	Familles
saponines Triterpenoides	Phytolacca dodecandra Hedera helix Lonicera nigra	Phytokcacées Araliacées Caprifoliacées
saponines Spirostanols	Cornusjorida Balanites aegyptiaca Asparagus curillus	Comacées Balanitacées Liliacées
glycoalcaloïdes Stéroïdes	Solanum mammosum	Solanacées
Diterpènes	Wedelta scaberrima Baccharis trimera	Compositées Compositées
Sesquiterpènes	Warburgia ugandensis Warburgia stuhlmannii Ambrosia maritima Podachaenium eminens	Canellacées Canellacées Compositées Compositées
Monoterpènes	Genre Lippia	Verbenacées
Iridoides	Olea europaea	Oleacées
Naphthoquinones	Diospyros usambarensis	Ebenacées
phénols Alcenyles	Anacardium occidentale	Anacardiacees
Chalcones	Polygonum senegalense	Polygonacées
Flavonoïdes	Baccharis trimera Polygonum senegalense Polygonum nodosum	Compositées Polygonaées Polygonacées
Tannins	Acacia nilotica Autres espèces	Leguminosées
Furanocoumarines	Ruta chalepensis	Rutacées
Isobutylamides	Heliopsis longipes Fagara macrophylla	Compositées Rutacées
Alcaloïdes	Culturnia aurea	Leguminosées

Tableau 4.2: Structures des quelques molécules molluscicides [60]

Classes de familles	Structures chimiques
glycosides triterpènes	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Oleanolic acid: $R^1=R^2=H$</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Hederagenin: $R^1=R^2=H$</p> </div> </div>
saponines spirostanoles	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Sarsapogenin: $R=H$</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Yamogenin: $R=H$</p> </div> </div>
sesquiterpènes simples	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">    </div>
lactones sesquitérpenes	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div>
glycoalcaloides steroides	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Tomatidine: $R=H$</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Solanidine: $R=H$</p> </div> </div>
naphthoquinones	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div>

flavonoïdes	 <p>The image shows two chemical structures. The left structure is a flavonoid glycoside, specifically a flavone with a glucose moiety attached to the C-7 position. The right structure is a substituted flavone with a methoxy group (OCH₃) and an R³ group on the C-6 position, and R¹ and R² groups on the A-ring.</p>
Molluscicides furanocoumarines	 <p>The image shows two chemical structures of furanocoumarin derivatives. The left structure is a furanocoumarin with a methoxy group (OCH₃) and a furan ring fused to the coumarin core. The right structure is a furanocoumarin with R¹, R², and R³ substituents on the coumarin ring and a furan ring fused to the coumarin core.</p>

4.3. Les saponines en tant que biomolluscicides :

Les saponines sont hautement toxiques pour les mollusques, et ont été investiguées comme molluscicides pour le contrôle de la Schistosomiase. Les espèces de *Bilinus* et les *Biomphalarias*, en particulier, agissent comme hôtes intermédiaires dans le cycle de vie des schistosomes qui causent la bilharzia urinaire. Dans une étude, six saponines terpenoïdes du type Oleanana isolées de la plante *Maesa lanceolata* ont été testées pour une activité molluscicide contre *Biomphalaria glabrata* et le mélange a montré une toxicité élevée avec des valeurs de DL₉₅ et DL₅₀ de 4.1 et 2.3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement. Les plantes *Phytolacca dodecandra* (Phytolaccaceae) et *Phytolacca icosandra* [61] contiennent des saponines avec une activité molluscicide potentielle. Une solution aqueuse ($25\mu\text{g.M}^{-1}$) de la plante *Phytolacca icosandra* possède une activité molluscicide très élevée contre les mollusques de *Biomphalaria glabrata*, l'activité peut être attribuée à la présence de saponines monodesmosidiques des acides serjanique et spergulagenique[62]

La biodégradabilité des saponines molluscicides extraites par l'eau de la plante *Phytolacca dodecandra* a été investiguée, les résultats ont montré que les saponines sont biodégradées instantanément ($t_{1/2} = 15.8\text{h}$). Les saponines ont été consommées complètement durant 10 jours [63]. Les saponines

triterpenoides hederagenines isolées du *Sapindus mukorossi* (Sapindacée) ont un effet contre le mollusque *Pomacea canaliculata*, qui est devenu l'ennemi majeur du riz en Taiwan et autres parties de l'Asie [64]. Sept saponines hederagenines, isolées incluant une nouvelle saponine hederagenine, hederagenine 3-O-(2,4-O-di-acetyl - α -L -arabinopyranoside)-(1 \rightarrow 3)- α -L -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L -arabinopyranoside, conduit à une mortalité de 70–100% à 10 ppm, des mollusques. 50 plantes soudanaises utilisées en médecine traditionnelle sont testées pour leur activité molluscicide contre 2 hôtes intermédiaires locaux: *Bulinus truncatus* et *Biomphalaria pfeifferi*. A des concentrations différentes, 62% de ces plantes s'avèrent létales pour l'une ou les 2 espèces de gastéropodes. 56% sont léthales pour B.p. et 44% pour B.t. 38% tuent les 2 espèces. 4 des plantes présentent de la saponine[65]

4.4. Les bioinsecticides

4.4.1. Définition :

Les bioinsecticides peuvent se définir au sens large comme des pesticides d'origine biologique, c'est-à-dire, organismes vivants ou substances d'origine naturelle synthétisée par ces derniers, et plus généralement tout produit de protection des plantes qui n'est pas issu de la chimie. Sous ce vocable, les biopesticides comprennent les agents de contrôle des insectes (auxiliaires) comme les arthropodes entomophages (ex.trichrogammes), les champignons hyphomycètes pathogènes pour les lépidoptères ou coléoptères (ex. *Beauvaria*), les baculovirus responsables des polyédroses nucléaires (NPV) ou des granuloses (GV) chez les lépidoptères, les bactéries (*Bacillus*). Les insecticides d'origine végétale et les molécules de synthèse biologique (phéromones, molécules allélochimiques). Par contre la majorité des entomologistes exclut systématiquement ces derniers [66]

4.4.2. Les insecticides d'origine botanique :

Plus de 2000 espèces végétales dotées de propriétés insecticides ont été répertoriées.

La Seconde Guerre mondiale reléguait en arrière plan les produits phytosanitaires d'origine végétale et les pesticides chimiques de synthèse firent

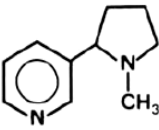
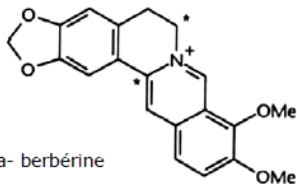
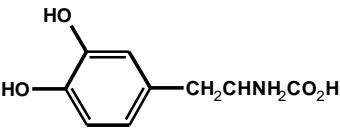
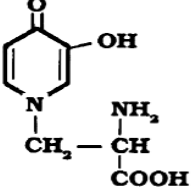
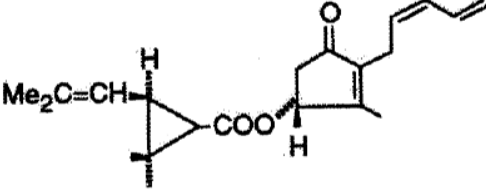
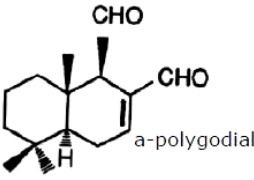
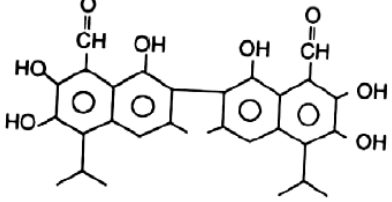
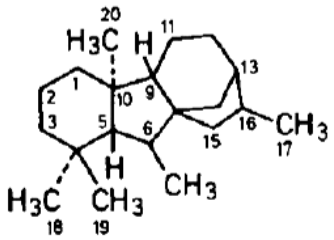
leur apparition. Les problèmes de contamination de l'environnement, de résistance des populations de ravageurs et des effets nocifs sur les organismes non visés ont contribué au renouveau d'intérêt pour les molécules présentes dans les végétaux et les agents de contrôle des insectes.

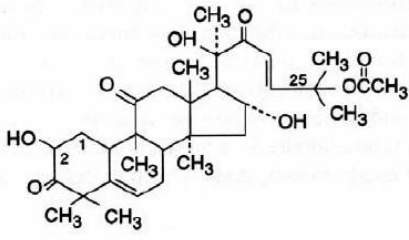
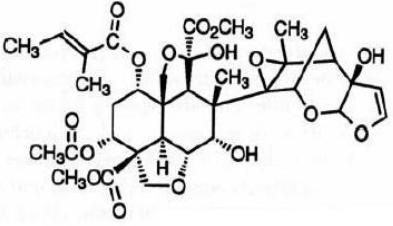
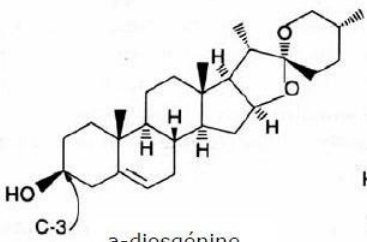
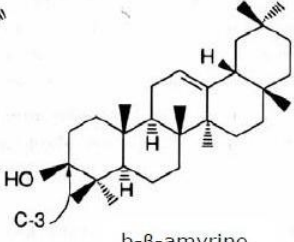
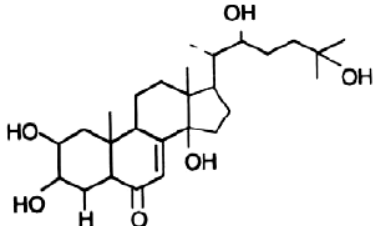
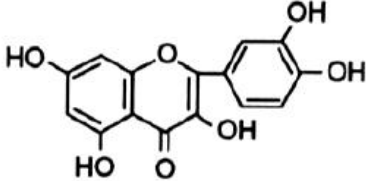
Selon Hall et Menn (1999) le marché mondial des pesticides était évalué en 1995 à environ \$29 milliards USD dont \$388 millions pour les biopesticides. Toutefois, le taux de croissance du marché prévu pour les biopesticides serait de 10-15% contre 2% pour les pesticides de synthèse, même si les pesticides chimiques de synthèse dominant actuellement largement les marchés mondiaux (89% des matières actives) [67]

Tableau 4.3 : Les principales classes de métabolites secondaires impliqués dans la défense des végétaux face aux insectes et autres ravageurs. [68]

<i>Classe</i>	<i>Origine, biosynthèse</i>	<i>Nombre de structures</i>	<i>Distribution et activité</i>
Alcanes, aldéhydes, cires	Acétate-malonate	nd	Feuilles : cires cuticulaires
Lignines, tannins	Acide shikimique	nd	Paroi cellulaire Précipitent les protéines
Terpenoïdes Monoterpènes	Acétate-mevalonate	1300	Huiles essentielles (conifères), forte odeur, repoussants
Sesquiterpènes		6500	Répandus, amers, toxiques
Diterpènes		2900	Latex et résine, parfois toxiques
Triterpènes		3600	Répandus, amers, toxiques, colorés
Stéroïdes Phytoecdysones	Acétate-mevalonate et autres	70	+ de 100 familles végétales Antihormones
Polyphénols Simples	Shikimate	1000	Universels (feuilles)
Coumarines	Shikimate-chorismate	800	70 familles Dicotylédones, toxiques, repoussants
Flavonoïdes	Shikimate- malonate	4000	Universels, colorés, toxiques
Quinones	Shikimate- mevalonate	800	Répandus, colorés
Alcaloïdes	hétérogène	10000	Angiospermes, toxiques, amers
Acides aminés non protéiques	Acides aminés	600	Graines de Légumineuses, répandus, toxiques
Cyanogènes	Acides aminés	60	2500 espèces de 130 familles, toxiques
Glucosinolates	Acides aminés	100	Crucifères, amers, âcres
Amines		100	Angiospermes, repoussants, hallucinogènes

Tableau 4.4 : Structures de quelques molécules insecticides[69]

classe	Quelques structures moléculaires
Alcaloïdes de défense des plantes	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>la nicotine, un alcaloïde insecticide connu depuis le 17^{ème} siècle.</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>a- berbérine</p> </div> </div>
Acides aminés non protéiques	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>3,4-dihydroxyphenylalanine (L-dopa)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>la mimosine, un AANP de Mimosoideae.</p> </div> </div>
monoterpènes	<div style="text-align: center;">  <p>la pyréthrine, un insecticide monoterpénique.</p> </div>
sesquiterpènes	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>a-polygodial</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>b-gossypol</p> </div> </div> <p>Sesquiterpènes cycliques insecticides.</p>
diterpènes	<div style="text-align: center;">  <p>structure <i>ent</i>-gibbérellane</p> </div>

<p>triterpènes</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p>Cucurbitacine B, un triterpène antiappétant.</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Azadirachtine, un puissant insecticide triterpène.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>α-diosgénine</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>β-amyrine</p> </div> </div>
<p>phytostérols</p>	<div style="text-align: center;">  <p>l'ecdysone, un phytostérol à effets anti-insectes.</p> </div>
<p>flavonoïdes</p>	<div style="text-align: center;">  <p>la quercétine, un flavonol insecticide.</p> </div>

4.5. Les Saponines en tant que bioinsecticides :

Quelques substances synthétisées par les plantes sont nécessaires pour leurs activités fondamentales alors que les métabolites secondaires sont impliqués dans le processus de coévolution entre les plantes et les autres organismes. Les plantes utilisent les métabolites secondaires pour deux raisons ; la première est une coopération avec les autres espèces pour attirer les insectes pollinisateurs ou les auxiliaires des insectes phytophages ou les

champignons antagonistes. La seconde consiste en la synthèse de substances dissuasives pour résister aux organismes (pestes) tels que les insectes, les microorganismes pathogéniques et les plantes compétitives.

Parmi les substances impliquées dans la défense de la plante, on rapporte les saponines pour la première fois par Appelbaum en 1969. Il s'intéresse à l'effet insecticide des saponines. [70]

4.5.1. Les trois modes d'action des saponines sur les insectes :

Les recherches concernant les interactions entre les plantes et les insectes phytophages sont multiples particulièrement celles focalisées sur la toxicité de certaines substances envers les insectes. Cette toxicité apparaît sous trois formes.

4.5.1.1. L'interférence avec le comportement alimentaire

Quelques saponines possèdent une activité antinutritionnelle comme c'est le cas pour *Ilex apocea* qui inhibe la prise d'aliments par *Limantria dispar*. Ces saponines sont antinutritionnelles aussi pour *Esoligonichus illius*. Les plantes dioscoréacées montrent une activité antinutritionnelle pour les fourmis acronymes *Octospinosus*. Les variétés riches en saponines de l'espèce *Alfafa* appliquées sur les larves des vers de farines (*Tenebriomolitor*) causent une diminution des quantités d'aliments métabolisés par ces insectes.[71]

L'incorporation des saponines d'alfafa dans le régime artificiel de *Ostrinia nubilalis* augmente la perte de poids des larves. Agrell et al a noté que les larves de *Stittoralis* consommaient une quantité moindre de feuilles d'*Alfafa* endommagées que celle de contrôle : ce phénomène a été expliqué par la synthèse de deux triterpéniques saponines par les plantes soumises à un stress biotique.

L'addition de saponines de certaines légumes (pochiches, lentilles, haricots, petits pois, fèves et arachides), dans l'alimentation artificielle de *Callosruchus chinensis* inhibe sa prise d'aliments.[72]

Une saponine spirostannique isolée de l'espèce solanacée : *Solanum taxums* et ajoutée dans l'alimentation artificielle a montré une activité antinutritionnelle contre les pucerons *Schizaphis graminum*.

Les glycoalcaloïdes extraits de l'espèce de *Solanum* inhibent la prise de poids du *Tribolium castaneum* et *Manduca sexta*. [73]

4.5.1.2. Regulation de la croissance :

Plusieurs recherches montrent que les saponines sont capables de régler la croissance de quelques espèces d'insectes.

4.5.1.3. Entomotoxicité :

Les saponines extraites de *Cestrum parqui* injectées à la dose de L_5 aux larves *Schistocerca gregaria* augmentent la mortalité de l'insecte [74], la vaporisation (spray) des feuilles de Tomate avec 0.1 → 0.2% d'une solution aqueuse de saponines d'*Alfafa* réduit le nombre de mites de *Tetranychus urticae* et les pucerons de *Pharodon sp* de 85 et 90% respectivement comme elles montrent une variable toxicité sur plusieurs insectes testées *Schistocera gregaria*, *S.tittoralis* et *Tribolium confusum*. Mais la toxicité la plus significative a été observée sur les larves de moustiques de l'espèce *Culex pipiens*, elles causent la perturbation de la mue et ont une activité cytotoxique. Certains auteurs évoquent une activité inhibitrice des protéases digestives. Un autre travail concernant des aliments traités par les feuilles du *Cestrum parqui* sur les larves du *S.littoralis* montre un déficit dans la digestion des protéines et une diminution dans le taux de protéines dans le cuticule et l'hémolymphe. [75]

4.5.2. Les limites d'utilisation des saponines dans la phytoprotection :

- Les problèmes de stabilité : les saponines sont des molécules de grosse taille qui contiennent certains sucres dont la dégradation est facile sous certaines conditions (pH, présence d'enzymes d'hydrolyse). Cette dégradation entraîne la perte d'activité qui dépend des chaînes de sucres solubles dans l'eau. La modification de la structure des saponines par acétylation des hydroxyles des sucres ou la séparation de l'aglycone par hydrolyse entraîne la perte de l'activité insecticide de la molécule. La molécule a besoin de la chaîne de sucres pour sa solubilité dans l'hémolymphe et pour son activité. Certains auteurs rapportent la perte de l'activité biologique des saponines par modification de leur structure, par exemple le phénomène de complexations des saponines avec le

cholestérol s'accroît lorsque le nombre de sucres associés augmente puis ont prouvé que la nature du sucre influe sur l'activité de la molécule.[71]

- Antiappétence :c'est un autre problème qui rend délicat l'application pratique des saponines en tant qu'insecticides ; les saponines ont une activité à effet répulsif à l'encontre de plusieurs insectes. On note que les saponines réduisent très appréciablement la quantité d'aliments consommée : ce phénomène paraît une réaction de défense de l'insecte contre ces substances toxiques. Ceci diminue la quantité de molécules actives prises par ingestion ce qui entraîne une réduction de l'activité insecticide.[71]
- Problèmes d'applications : les résultats expérimentaux sont pratiquement inapplicables. Il est nécessaire de développer des techniques simples et plus efficaces (associer la saponine avec un insecticide abrasif).[71]
- Difficulté de synthèse : le poids moléculaire élevé et l'importante complexité de leur structure, réduisent la chance des saponines d'être des modèles de molécules insecticides synthétisées.[76]
- Toxicité : les saponines sont cytotoxiques, hémolytiques et des inhibiteurs de l'activité des protéases, ceci représente une contrainte si on utilise les saponines comme produits d'agriculture. Les saponines présentent, en effet, une forte toxicité à l'égard des mammifères.[77]

CHAPITRE 5

LA METHODOLOGIE EXPERIMENTALE

5.1. L'objectif de l'étude

5.1.1. L'objectif général :

Contribuer à la valorisation d'une plante de l'Algérie : *Sapindus mukorossi* dans l'optique de la découverte de nouvelles molécules et /ou de nouvelles voies d'application cosmétique ou agricole.

5.1.2. Les objectifs spécifiques :

- Effectuer une étude chimique du fruit de *Sapindus mukorossi* en vue d'établir une relation entre les substances chimiques trouvés dans la plante et certaines propriétés intéressantes qui lui sont attribuées.
- Etudier l'activité insecticide et molluscicide des extraits après les différents processus d'extractions.

5.2. Matériels :

5.2.1. Matériel végétal:

Les fruits du *Sapindus mukorossi* en Sanskrit ; Phenila et Arishta en Anglais ; Soapnut en Français ; la noix de lavage chez les musulmans en Pakistan ; Banduk ou Findak-i-Hinda en Punjab ; Doden sont utilisés comme savon une fois mélangé avec de l'eau .

- L'utilisation du fruit de la plante :

D'après les enquêtes ethnobotaniques, les fruits de cette plante sont utilisés par les Hindous depuis longtemps comme détergents. Les Hindous et les Musulmans les utilisent pour des fins médicinales, ils sont employés comme émétiques à la dose de 1 à 2 draches, comme purgatifs aux larges doses comme nausants et expectorants aux doses de 10 à 20 de péricarpes, 4 péricarpes pour les coliques sont donnés avec une sharbert, pour l'excès de salivation, l'épilepsie et le choléra. La pulpe est donnée en petites doses

comme anthelminthique et pour les gens mordus par les reptiles venimeux et ceux qui souffrent d'une diarrhée sévère ou de choléra [78]. De nos jours les saponines extraites de cette plante sont très utilisées en industrie des colorants, comme agent émulsifiant dans la préparation des insecticides, comme stabilisateurs de mousse pour les shampooings, comme germicide et agent désodorisant.[79]

- La distribution géographique de la plante

Le *Sapindus mukorossi* est une espèce rencontrée dans les forêts humides sempervirentes près des côtes, elle pousse principalement dans la région de la Metidja

- Date et lieu de récolte :

La plante est récoltée dans la zone de Bousmail, dans un village appelé « haouch Essaboun » au nord de l'Algérie, en Décembre 2010. Elle était au stade végétatif.

5.2.2. Les produits chimiques

Les produits chimiques ainsi que les solvants utilisés sont de qualité pour l'analyse et de marque MERCK ou PROLABO.

5.2.3. Les appareils utilisés

Appareil FT/IR TRANSFORMATION DE FOURIER4100	JASCO JAPON
Flame Photometer	Corning
Spectrophotomètre d'absorption atomique	SP9 PHILIP PYE.UNICAM(flamme air/acetylene)
Turbidité	HACH 2100N (U.S.A)
Centrifugeuse	ROTINA35 HETTICH ZENTRIFUGEN
Microscope électronique	XSP-103B

5.3. La méthode de préparation et de conservation du fruit :

Les fruits sont séchés à l'abri du soleil (à l'intérieur) pendant 2 semaines puis réduits en poudre par une série de broyages à l'aide d'un mixeur de marque BLENDER (Robot coupe GT₅₅₀). La poudre du fruit ainsi obtenue est conservée dans un bocal hermétique à la température ambiante.

5.4. Les méthodes de caractérisation de la matière végétale :

5.4.1. L'histologie végétale :

L'histologie végétale est la partie de la biologie végétale qui étudie la structure microscopique des tissus végétaux. Cette science s'est constituée au XIX^e siècle, avec le perfectionnement du microscope. Elle s'appuie sur la cytologie, qui est l'étude de la cellule vivante. L'hypochlorite de sodium a la propriété de dissoudre complètement le contenu des cellules (en pratique, on l'utilise surtout en histologie végétale lorsqu'on souhaite ne garder que les parois des tissus.)

Un microscope à haute précision assisté avec micro est utilisé pour prendre des photos de coupe histologique effectuée sur le fruit immature ; après traitement avec une solution d'hypochlorite de sodium, une solution de l'acide acétique et la coloration avec le vert de méthylène et le rouge Congo et le fruit mur sans aucun traitement. [80]

Les photos sont prises à un agrandissement (x 300) et (x 600).

5.4.2. Détermination de la matière sèche, minérale et organique :

5.4.2.1. La matière sèche :

La matière sèche est déterminée selon la norme NF B 51- 004, à partir d'une masse E=3g de matière végétale introduite dans un creuset taré, puis séchée dans une étuve à 105°C jusqu'à poids constant. Après refroidissement dans un dessiccateur, le creuset est pesé. Le taux de matière sèche est : [81]

$$M S (\%) = (S : E) \times 100$$

M.S.= taux de matière sèche

S = masse du creuset sorti dessiccateur moins la tare

5.4.2.2. La matière minérale : les cendres :

La matière minérale est déterminée selon la norme T 211 om-93, à partir du creuset contenant la matière sèche (hémicelluloses extraites). Celle-ci est introduite dans un four à 550°C durant 3 heures. Le creuset est pesé après refroidissement dans un dessiccateur. La fraction de matière minérale est donnée par la relation:[81]

M.M. (% matière initiale) = $(m : E) \times 100$

M.M. (% matière sèche) = $(m:S) \times 100$

M.M. = matière minérale

m = masse du creuset après refroidissement tare

S = masse du creuset sorti du dessiccateur moins la tare

E = masse de la matière végétale

- Cendres solubles et insolubles dans l'eau :

Les cendres solubles et insolubles dans l'eau peuvent être utiles dans certains aliments. Par exemple, elles servent à évaluer le contenu en fruits des confitures, ou la quantité des corps étrangers (ajout de sable) dans les épices

- Principe de la méthode :

Pour déterminer les cendres insolubles dans l'eau, on dissout la partie soluble des cendres totales dans l'eau chaude qu'on filtre sur un papier filtre. Le résidu insoluble sur le papier filtre est incinéré de nouveau pour brûler le papier filtre. On pèse les cendres insolubles. Le pourcentage de cendres solubles est déduit par calcul. [82]

- Calculs par rapport à l'échantillon sec ou humide

$$\% \text{ cendres insolubles} = \frac{M(\text{cendres insolubles}) \times 100}{M(\text{écha.sec ou humide})}$$

$$\% \text{ cendres solubles} = \% \text{ cendres totales} - \% \text{ cendres insolubles}$$

- Calculs par rapport aux cendres totales

$$\% \text{ cendres insolubles} = \frac{M(\text{cendres insolubles}) \times 100}{M(\text{cendres totales})}$$

$$\% \text{ cendres solubles} = \frac{M(\text{cendres solubles}) \times 100}{M(\text{cendres totales})}$$

5.4.2.3. La matière organique

La matière organique est déterminée par différence entre la matière sèche et la matière minérale.

$$M.O. (\% \text{ matière initiale}) = (S-m)/E \times 100$$

$$M.O. (\% \text{ matière sèche}) = (S-m)/S \times 100$$

M.O. = matière organique

m = masse du creuset après refroidissement moins la tare

S = masse du creuset sorti du dessiccateur moins la tare

E = masse de la matière végétale [82]

5.4.3. L'analyse des métaux lourds

5.4.3.1. La spectroscopie d'absorption atomique :

La spectroscopie d'absorption atomique est essentiellement une méthode d'analyse quantitative qui convient beaucoup mieux à la détermination des traces qu'à celle des composants majeurs. Elle présente de nombreux avantages : haute sensibilité, grande spécificité, influence négligeable de la composition du milieu analysé, rapidité, faible quantité de substance nécessaire (1ml de la solution peut suffir) et facilité de préparation des solutions étalons.

La loi d'absorption en absorption atomique :

L'intensité de l'absorption dépend directement du nombre de particules absorbant la lumière selon la loi de Beer- Lambert selon laquelle l'absorbance est proportionnelle au coefficient d'absorption spécifique a , au trajet optique b et à la concentration c .

$$A = a.b.c \quad \text{où } A = \log I_0/I$$

5.4.3.2. La méthode d'analyse des métaux lourds :

Un gramme de la poudre est pesée correctement, est mise dans creuset en porcelaine puis calcinée dans un four à moufle à 500° jusqu'à obtention du carbone libre. Les cendres sont refroidies puis dissoutes dans 5 ml d'un mélange d'acide HCl-HNO₃ (9-1 V/V) pour 15 min jusqu'à dissolution complète, la solution est diluée avec l'eau distillée puis filtrée dans une fiole de 50 ml, le papier filtre est lavé avec l'eau distillée. L'analyse se fait sur les ions comme Ca²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Al³⁺, Fe³⁺, Na⁺, K⁺ en utilisant un spectrophotomètre d'absorption.[83]

5.5. Les méthodes d'extraction et de purification de saponines :

5.5.1. La méthode d'extraction à froid et à chaud

Dans un premier temps, le matériel végétal à été séché sous ombre , afin d'éviter toute dégradation thermique. Ainsi, la drogue pulvérisée présentera une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, ce qui permettra d'améliorer le rendement d'extraction.

- La méthode d'extraction de routine employée est la macération successive par des solvants de polarité différente: l'eau, l'acétate d'éthyle et le méthanol. La quantité de solvant doit être appropriée à la quantité de matière végétale dont nous disposons (dans notre cas, 1,5 l de solvant pour 250 g de poudre). L'extraction est effectuée trois fois pour chaque solvant sous agitation continue et à température ambiante durant 72 heures. Après filtration, évaporation du solvant et séchage dans l'étuve à 40°, on obtient les extraits bruts.

- La poudre du fruit est mise en suspension dans le solvant d'extraction (eau distillée ou mélange hydrométhanolique 75%) selon le rapport 1/10 (P/V) (10 ml de solvant pour 1g de poudre). Le mélange est soumis à une agitation magnétique durant 3 h à la température ambiante, puis laissé macérer à température ambiante pendant 72h. Le macérat est ensuite filtré, Le culot est écarté et le volume du surnageant est réduit jusqu'au rapport 1/1 (P/V) (1 ml d'extrait pour 1 g de poudre de fruit) par évaporation du solvant d'extraction.[84]

5.5.2. La méthode de purification de saponines

Mode opératoire :

La matière végétale extraite est dissoute dans 50 ml d'eau distillée puis mise dans une ampoule à décanter ensuite on ajoute 50ml de diéthyl éther on agite fortement, on laisse les deux phases se séparer, la phase aqueuse est séparée de la phase organique (diethyl éther), cette opération est répétée trois fois ,la phase éthérique est mise à coté ,la phase aqueuse est reprise avec 50mL de solution saturée de n-butanol(100ml eau+100ml butanol) 4 fois on laisse décanter ,on garde la phase butanolique. La phase de butanol est lavée

deux fois avec 30 ml d'eau distillée, on garde la phase du butanol qui sera séchée à température ne dépassant pas 40° et on récupère la saponine.[85]

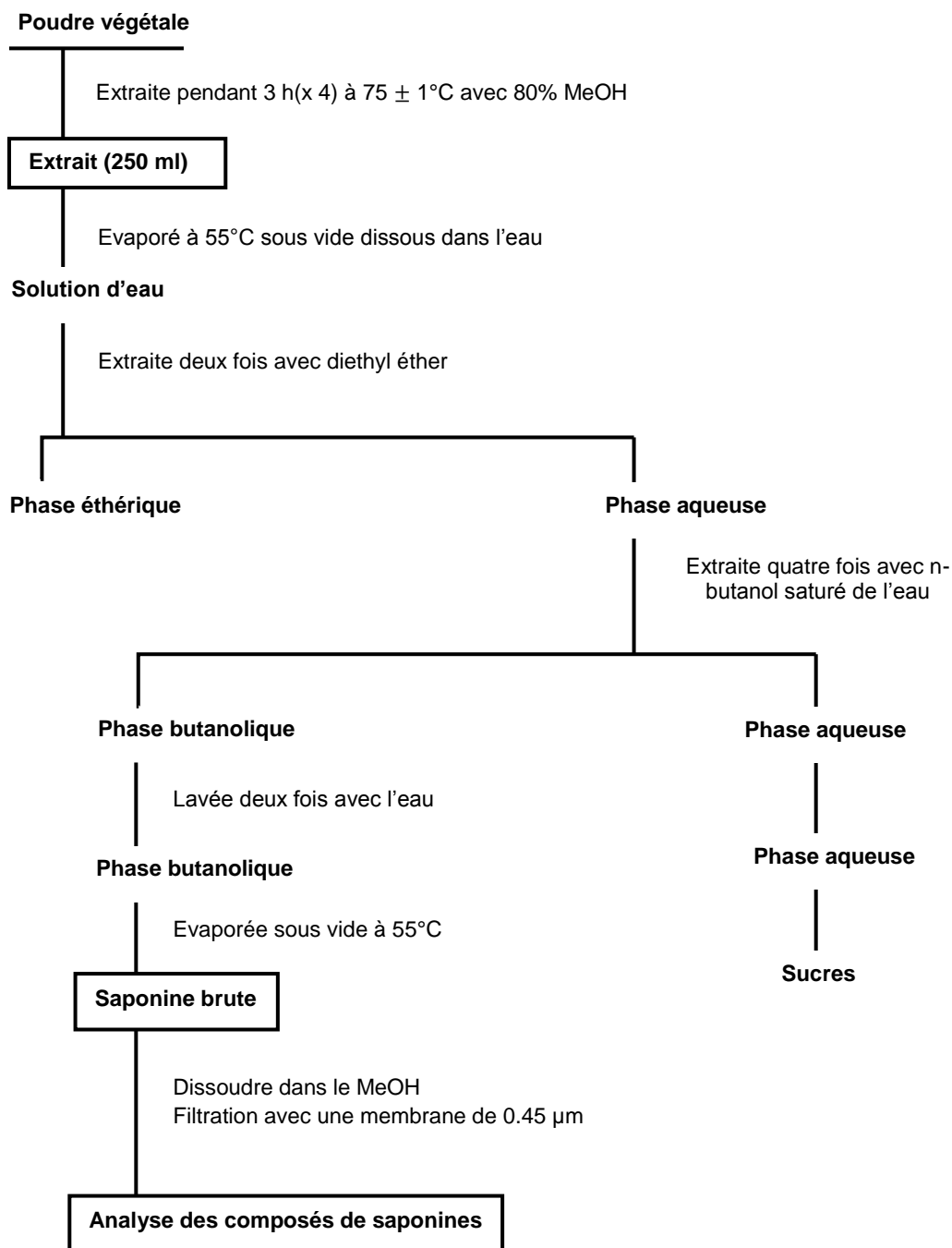


Figure 5.1: Procédure pour l'extraction et la séparation de saponines à partir de la poudre végétale

5.5.3. La méthode de calcul du rendement :

Après chaque étape de purification, l'extrait est évaporé à sec et le résidu obtenu est pesé. Le rendement, exprimé en pourcentage par rapport au poids du matériel de départ, est déterminé par la relation suivante :

$$R = \frac{(P_c - P_v) \times 100}{Q}$$

Avec R : rendement (en %)

P_c : poids du ballon avec le contenu (en g)

P_v : poids du ballon vide (en g)

Q : poids du matériel végétal de départ (en g)

5.5.4. L'extraction à l'hexane de la matière végétale par sonication :

Les lipides résiduels sont extraits à l'hexane à l'aide d'un appareil de Soxhlet. Cette détermination suit la norme NF ISO 734-1.

Avant d'être utilisés, les ballons (250 mL) et les cartouches de cellulose (125 mL) sont séchés à l'étuve à 103°C. 5 g de la poudre sont introduits dans la cartouche en cellulose et 150 mL d'hexane sont déposés dans le ballon. L'hexane est chauffé à reflux pendant 5 h. La quantité de lipides (triglycérides) est évaluée par pesée après évaporation à l'évaporateur rotatif et séchage de l'échantillon à l'étuve à 50°C pendant 24 h.[82]

Notre laboratoire a opté pour une nouvelle méthode d'extraction des matières bioactives à partir des plantes végétales.

- Extraction avec les ondes ultrasonores :

L'extraction par solvant assistée aux ultrasons consiste à traiter sous ultrasons un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant comme l'hexane ou l'éthanol. Les ultrasons permettent d'accélérer l'extraction et de réduire le ratio solvant/charge. Un paramétrage adapté (puissance, cavitation, température, agitation) conduit, pour des durées d'extraction sous ultrasons de l'ordre de quelques minutes, à des rendements obtenus en quelques heures par des protocoles conventionnels. Au-delà de 20 kHz, les ondes sonores

gènèrent des vibrations mécaniques dans un solide, un liquide ou un gaz. À la différence des ondes électromagnétiques, les ondes sonores peuvent se propager dans une matière et elles impliquent des cycles d'expansion et de compression lors de la propagation dans le milieu. L'expansion peut créer des bulles qui se forment, se développent et s'effondrent dans un liquide. Près d'une surface solide, l'effondrement de cavité est asymétrique et produit un jet de liquide à grande vitesse. Le jet liquide a un fort impact sur la surface solide.[86]

L'extraction des produits naturels en utilisant les ultra-sons a été envisagée afin d'améliorer le rendement et ou la vitesse de cette étape.

Dans un bécher de 250mL, 5g de la matière végétale a été mise en contact avec 25mL d'Hexane. La cuve à ultrason de marque Elmasonic ; modèle X-tra 30H, a été réglée en mode continu à la fréquence de 20kHz. Le mélange est maintenu pendant une durée sous ultrason puis filtré et le solvant est chassé par le rotavap sous vide. L'extrait est séché à l'étuve à 40° puis pesé pour calculer le rendement.

La fréquence de la cuve ultrasonique est toujours maintenue à 20KHz. La sonication est précédée par une macération de la matière végétale dans le solvant pendant une nuit.

5.6. Les méthodes d'analyses chimiques des extraits :

5.6.1. Les réactions de détection des familles chimiques :

5.6.1.1. Préparation des réactifs :

Réactif de Dragendorff : utiliser pour la détection des alcaloïdes.

Faire bouillir 14g d'iodure de sodium avec 5.2 g de carbonate de bismuth basique dans 50mL d'acide acétique glacial pour quelques minutes. Laisser reposer durant une nuit .séparer le précipité d'acétate de sodium du filtrat à 40mL du filtrat rouge-marron ,ajouter 160mL et 1Ml d'eau .stoker cette solution à l'ombre. En cas de besoin, ajouter 20mL d'acide acétique à 10mL de cette solution puis remplir jusqu'à 100ml avec de l'eau.

Réactif d'Hager : une solution aqueuse standard d'acide picrique est utilisée pour la détection des alcaloïdes.

Chlorure ferrique alcoolique: une solution à 5% M/V de chlorure ferrique dans 90% d'alcool est utilisée pour la détection des phénols.

Réactif de Mayer: il est utilisé pour la détection des alcaloïdes.

Dissoudre 1.36g de chlorure mercurique dans 60ml d'eau(A). Dissoudre 5g d'iodure de potassium dans 20ml d'eau distillée(B), mélanger ((A) avec (B) et ajuster le volume à 100ml avec de l'eau distillée.

Réactif de Molisch: Il est utilisé pour la détection de carbohydrates.

Dissoudre 10g d'alpha-naphthol dans 100 ml d'alcool à 95%.

Réactif de Wagener: Il est utilisé pour la détection des alcaloïdes. Dissoudre 1.27g d'iode et 2g d'iodure de potassium dans 5 ml d'eau distillée et compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée.[87]

5.6.1.2. Les tests pour la détection des constituants chimiques:

- Tests pour les alcaloïdes: mélanger une petite quantité d'extraits aqueux ou alcoolique séparément avec quelques gouttes de HCl dilué puis filtrer. Le filtrat est testé grâce à plusieurs réactifs des alcaloïdes. Le réactif de Mayer (précipité crème), le réactif de Dragendorff (précipité marron-orange), le réactif de Hager (précipité jaune), le réactif de Wagener (précipité marron-rougeâtre
- Test pour les carbohydrates: Dissoudre une quantité (200mg) de l'extrait aqueux et alcoolique séparément dans 5mL d'eau distillée puis filtrer, le filtrat est testé avec le réactif de Millon.
- Test de Millon: à 2-3 ml d'extrait aqueux, Ajouter quelques gouttes d'alpha-naphthol en solution alcoolique, mélanger, Ajouter H₂SO₄ conc sur les côtés du tube. Un anneau violet se forme à la jonction des deux liquides.
- Test de Fehling: Mélanger 1 ml de Fehling A et 1 ml de Fehling B, faire bouillir pendant 1 minute. Ajouter un volume égal de solution d'essai. Faites bouillir dans un bain-marie pour 5-10 minutes. Une précipitation d'abord jaune, brique, puis rouge sera observée.

- Tests pour les glycosides: Hydrolyser une petite portion de l'extrait avec l'acide chloridrique pour quelques heures dans un bain marie, faire les tests de Liebermann- Burchard's, Legal et de Borntrager sur l'hydrolysât.
- Test de Liebermann- Burchard: mélanger 2 mL d'extrait avec 2mL de chloroforme, ajouter 2mL d'anhydride acétique et 2 gouttes de H₂SO₄ sur les côtés du tube à essai. Une couleur d'abord rouge, bleue puis verte apparaît.
- Test de Legal': ajouter à l'extrait aqueux ou alcoolique, 1 ml de pyridine et 1 ml de nitroprussiate de sodium. Une couleur rose ou rouge apparaît.
- Test de Borntrager: Pour 3ml d'extrait aqueux, ajouter H₂SO₄ dil. Faire bouillir et filtrer. ajouter un volume égal de benzène ou le chloroforme. Agitez bien. Séparez le solvant organique, ajouter de l'ammoniaque. La couche ammoniacale devient rose ou rouge.
- Test pour les composés phénoliques et les tanins: à 2ml de l'extrait aqueux ou alcoolique ajouter quelques gouttes de réactifs suivants
 - a) solution de FeCl₃ à 5%: couleur bleue-noire foncée.
 - c) solution de Gélatine: ppt blanc.
 - e) solution d'acide Acétique: solution de couleur rouge.
 - f) dichromate de Potassium: ppt rouge
 - g) solution dil d'iode: couleur rouge transitoire.
 - h) une goutte de NH₄OH, un excès de solution de AgNO₃ à 10%. Chauffer pour 20min dans un bain–marie bouillant :ppt blanc puis observer une miroir d'argent sur les cotés du tube à essai
- Tests pour les saponines: test de mousse. [88]

5.7. Les méthodes d'analyses physiques :

Les triterpènes ont fait l'objet de plusieurs études consacrées à l'analyse structurale des triterpènes.

5.7.1. L'analyse par Infrarouge (IR) : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF, en anglais Fourier transform infrared spectroscopy ; FTIR) est une technique de mesure

pour l'acquisition de spectres infrarouges. La lumière infrarouge passe au travers d'un interféromètre. Après avoir traversé l'échantillon, le signal mesuré est un interférogramme. Après que le signal a subi une transformée de Fourier, on obtient un spectre identique à celui obtenu par une spectroscopie infrarouge conventionnelle (dispersive).

Le spectre Infrarouge permet de repérer les fonctions chimiques présentes comme les groupements cétones, alcool, acide carboxylique acétate, qui caractérisent la plupart des triterpènes [89]

Les spectres sont enregistrés à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre piloté par un ordinateur grâce à un logiciel spécial

5.7.2. L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est, comme toutes les techniques de chromatographie, une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Elle est de plus en plus utilisée dans les principaux domaines de la chimie.

5.7.3. L'analyse par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-SM) :

En spectroscopie de masse, les fragments des triterpènes sont caractéristiques, comme les pics de fragmentation caractéristiques du mécanisme de « Rétro-Diels-Alder » par clivage du cycle D / E et C / D des triterpènes pentacycliques. Le spectre de masse ne permet pas de confirmer le pic moléculaire de 528 (absence de spectre par ionisation chimique), mais on distingue nettement la présence de pics de fragmentation caractéristiques des triterpènes pentacycliques[90]

Les Conditions de travail de la GC-MS

Le produit de dérivation v:TMS=TMCS+BSTFA

BSTFA=N,O-bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide=CF₃-C=N-Si(CH₃)₃-O Si(CH₃)₃

Appareillage et conditions opératoires:

Gas chromatograph Clarus500/PerkinElmer

Mass spectrometer Clarus500/PerkinElmer

Colonne RTx-5MS15mx0.25mmIDx0.25 μ m

Température de l'injecteur 250°C

Modé d'injection splitless

Température du four ; gradient de température:

température, initiale 50°C, température finale 325°C

La durée d'élution est de 60mn

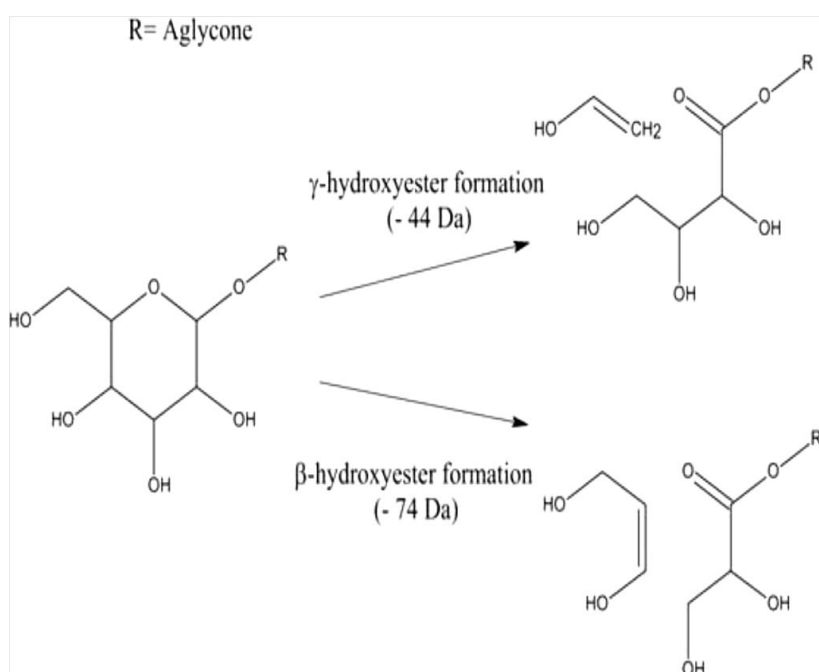


Figure 5.2: Typical HPLC/ESI/MS decomposition reactions generating β - and hydroxyesters from sugar moieties in sodium adducts.[91]

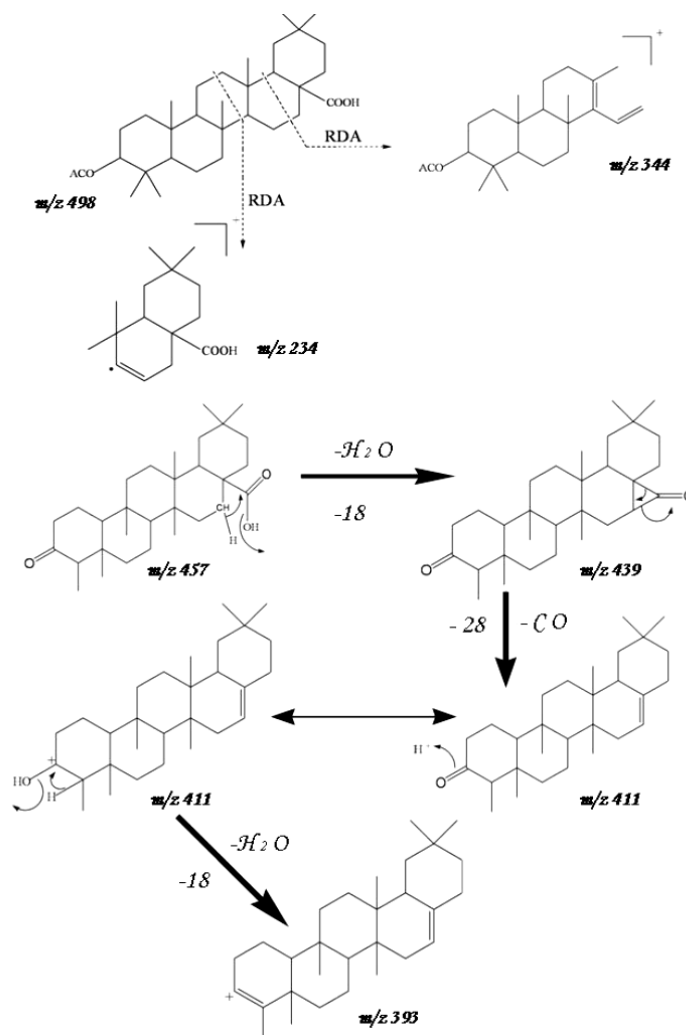


Figure 5.3: Exemples des fragmentations en spectrométrie de masse des triterpènes [91]

5.8. Les méthodes de caractérisation de l'extrait du fruit en tant que biosurfactant :

5.8.1. L'étude de la stabilité de la mousse

La présence des saponines est déterminée qualitativement par le calcul de l'indice de mousse. Deux grammes de matière végétale sèche broyée à tester est utilisée pour préparer une décoction avec 100ml d'eau. On porte à l'ébullition pendant 30min, après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100ml à partir de cette solution mère, on remplit 10 tubes (1,3 cm de diamètre interne) avec 1, 2,3...10 ml, le volume final étant réajusté à 10ml avec l'eau distillée. Chacun de ces tubes est agité avec énergie pendant 15

secondes. Après le 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 me Xe tube, alors l'indice de mousse est calculé par la formule suivante :[92]

$$I = \frac{h \times 5}{0.0x}$$

I : indices de mousse.

h : hauteur de mousse (en cm) dans le Xe tube

x : le volume de la solution mère dans le Xe tube

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

La Méthode de Ross-Miles

Différentes méthodes existent pour déterminer la quantité de mousse formée par un tensioactif, ainsi que la stabilité de la mousse obtenue. Parmi elles, on peut noter la méthode Ross-Miles qui est une méthode de mesure classique : elle consiste à faire tomber 200 ml de solution de tensioactifs contenue dans une ampoule sur 50 ml de cette même solution contenue dans une éprouvette cylindrique maintenu à une certaine température (souvent 60°C), d'une hauteur de 90 cm (de l'embout de l'ampoule au fond de l'éprouvette). Le diamètre de l'embout de l'ampoule est de 2,9 mm. La hauteur de mousse est ensuite relevée dans l'éprouvette, après un temps précis (figure II.5), cette dernière augmente avec la concentration de la solution en tensioactifs, celle-ci devant être inférieure ou égale à la CMC. Le volume de mousse est d'autant plus important que la tension de surface est petite. [92]

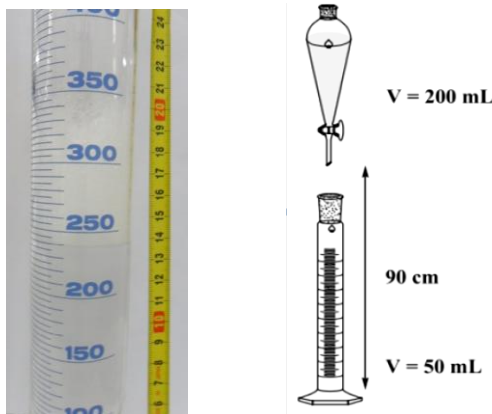


Figure 5.4 : montage de Ross-Miles

5.8.2. La détermination de la concentration micellaire critique (CMC):

Le principe de travail :

Les molécules tensioactives possèdent la propriété d'abaisser la tension de surface de l'eau pure (72.8mN/m).

La micellisation, observée à la CMC, correspond à une variation brutale des propriétés physicochimique de la solution. Cela ne concerne pas seulement la tension de surface mais aussi bien d'autres propriétés de la solution (pression osmotique, turbidité, self diffusion, conductivité pour les tensioactifs chargés, ect...). Cette variation se traduit par la « cassure » sur les courbes expérimentales de l'évolution de la tension de surface en fonction de la concentration en tensioactif.

Graphiquement, on détermine le logarithme de la CMC au point de discontinuité de la courbe ce qui permet d'aboutir à la concentration micellaire critique CMC.

Procédé expérimental :

A partir des extraits obtenus et des saponines pures, on prépare une solution mère de concentration connue. De cette solution mère, on prépare plusieurs solutions filles de concentrations différentes.

Ces solutions sont analysées par un turbidimètre afin de quantifier la turbidité des solutions tensioactives (eau/surfactant) de différentes concentrations.

5.9. Tests hémolytiques :

Préparation des solutions :

PBS :NaCl 145 Mm (8500 mg.L⁻¹), KCl 5 Mm (373 mg.mL⁻¹), Na₂HPO₄.12 H₂O 4 Mm (1433 g.L⁻¹), NaH₂PO₄.2H₂O 1 Mm (156mg.L⁻¹).

Les solutions mère d'extrait methanolique et de saponines sont préparés dans un mélange DMSO/ PBS (5 :1) à partir de 500µg/mL.

Les tests d'hémolyse ont été pratiqués au laboratoire du centre de transfusion sanguin.

Du sang humain frais sain citraté, lavé quatre fois avec l'eau physiologique est centrifugé à 3000 tours/min après chaque lavage dans une centrifugeuse, le culot est séparé.

Un test préalable a été fait sur un culot de globules rouges avec le mélange DMSO+PBS pour voir l'effet non hémolytique de ce mélange sur le culot.

Des tubes sont remplis avec 0.5 mL de culot de globules rouges + 0.5 mL de chacun des solutions préparées. Après incubation pendant un jour, ils sont centrifugés pendant 7 min à 3000 tours/min. [93]

5.10. L'application en tant que biopesticides

5.10.1. La méthode d'évaluation de l'activité insecticide (bioinsecticide):

5.10.1.1. Le traitement des arbres des oliviers infestés par le psylle

Le psylle de l'olivier est un Homoptère de forme trapue et massive environ 2,4 à 2,8 mm pour le mâle. Les larves sucent la sève des bourgeons, des jeunes pousses, des boutons floraux et des jeunes fruits, altérant ainsi leur développement normal. En outre les larves excrètent un abondant miellat, favorisant ainsi l'installation de la fumagine. Lorsque la densité larvaire est de 17,3/grappe florale, les pertes sont de 50%, cependant si cette densité dépasse 30, 100% de la production est compromise.

Le traitement a été fait par une solution obtenue par décoction de 10 g de poudre de fruit dans 1L d'eau. [94]



Figure 5.5: Psylle d'olivier (adulte)

Figure 5.6: Dégâts de psylle sur fleurs d'olivier (Soies cireuses)

5.10.1.2. Le traitement des jeunes arbres des orangers infestés par le puceron :

On désigne sous le nom de puceron, différents genres d'insectes hémiptères de très petite taille (longueur 0m,0005 à 0m,005, vivant en quantités parfois innombrables sur toutes sortes de plantes potagères, fruitières, ornementales ou forestières, dont ils aspirent la sève à l'aide de leur long suçoir délié ou rostre. Les pucerons ou aphidiens sont extrêmement nuisibles; il en existe un nombre considérable d'espèces; la plupart sont aériennes et attaquent les feuilles et les jeunes pousses, mais certaines vivent sur les racines (radicicoles).[95]



Figure 5.7 : le puceron

Une fois caractérisé, nous avons tenté d'utiliser le produit extrait purifié comme un biopesticide des pucerons des jeunes arbres des agrumes et des oliviers.

Pour se faire, des arbres au nombre de 36 contaminés par des larves et des pucerons ont été arrosés par le décocté dans l'eau de 10 g de poudre du fruit dans un litre d'eau. Des arbres témoins ont permis de comparer les résultats.



Figure 5.8 : les arbustes mis sous serre pour l'étude

5.10.2. La méthode d'évaluation de l'activité molluscicide (Biomolluscicides) :

La méthode utilisée dans cette étude pour la mesure de l'effet molluscicide d'une substance est celle recommandée par l'OMS (OMS., 1965) et modifiée par Marston pour les besoins du criblage des produits naturels.[96]

- Montage expérimental :

Le test utilisé des conteneurs d'eau distillée contenant des mollusques (minimum de 40 ml par mollusque) et observer la mortalité de ces derniers quant ils sont exposés à la substance étudiée (extrait, fraction, molécule).

- Collecte et préparation des mollusques :

Des spécimens de bulins récoltés dans leur gîte naturel à Boumedfaa



Figure 5.9: le type d'escargot traité

Les bulins sont maintenus dans des conditions suivantes avant le test d'évaluation :

Tableau 5.1 : Conditions de culture des mollusques

paramètres	désignation
Température	26-28°C
Luminosité	Eclairage naturel diurne
Alimentation	Salade verte
Milieu	Eau filtrée

Les bulins sont conditionnés par suppression seul de la nourriture 24 heures avant d'être exposés aux extraits végétaux et substances pures.

- Mesure de l'activité molluscicide :

L'expérience d'évaluation de l'activité molluscicide a été réalisée selon la méthode standard de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS., 1965), modifiée pour les besoins du criblage

Les critères d'activité molluscicide (Doses létales ou mortelles DL50 ou DL90) ont été définis par Mott [97]

- les extraits sont considérés actifs pour une concentration égale ou inférieure à 100 µg/ml pouvant être mortelle à 90 % de la population de mollusques ;

- les composés isolés sont actifs pour une concentration égale ou inférieure à 20 µg/ml pouvant être mortelle à 90 % de la population de mollusques ;

Pour le criblage préliminaire des extraits bruts, une concentration minimale de 20µg/ml a été utilisée pour les détecter les substances potentiellement actives qui pourraient être présents dans les extraits à faible dose, et non détecter à seuil de concentration plus important à 100µg/ml.

La détermination des mollusques morts est effectuée comme suit :

Les spécimens morts sont placés dans une boîte pétri et examinés à l'aide d'une loupe et une lumière pour confirmer la mortalité (immobilité, absence de contraction, décoloration). Les spécimens morts sont éliminés rapidement pour éviter d'éventuelle contamination [98]

- Protocole utilisé dans cette étude :

Les préparations végétales suivantes ont été utilisées pour le test d'activité molluscicide. Il s'agit d'extraits bruts à l'eau, au méthanol et de molécules de saponines. Le protocole standard a été modifié et adapté comme suit pour le besoin des criblages.

- Criblage des extraits bruts :

L'évaluation de l'activité molluscicide des extraits bruts a été effectuée utilisant 10 mollusques de taille uniforme (\emptyset moyen de la coquille 8-9.5cm) par flacon, exposés aux extraits végétaux à des concentrations différentes pour une période de 24 h.

La quantité requise de chaque extrait est d'abord dissoute dans de l'eau (on peut utiliser l'eau additionnée de 0,1% de diméthyl sulfoxyde ou DMSO comme agent homogénéisant)

Les tests sont confrontés au contrôle sans traitement (mollusque avec H₂O et 0,1% DMSO). Des observations de la mortalité des spécimens sont effectuées après 24 h.

Les extraits bruts provoquant au moins 90% de mortalité des mollusques dans les 24 heures seront d'office retenus comme source potentielle de substances molluscicides.

Les lots de mollusques sont répartis en deux groupes :

- le premier groupe contrôle (ne recevant aucun traitement à l'exception de l'eau + 0,1% DMSO) ;

- le deuxième groupe traité par les solutions de produit isolé, avec des concentrations variables: 0.2, 0.097, 0.0585, 0.024 g/L[99]

Les extraits des fruits ont été testés contre *Biomphalaria glabrata*, un des escargots vecteur de la schistosomiase (ou bilharziose). La mort de l'escargot a été établie par la contraction de l'organe au sein de la coquille; la non-réponse aux piqures par l'aiguille sonde a été considérée comme une preuve de décès.

CHAPITRE 6

RESULTATS ET DISCUSSIONS

6.1. Résultats de caractérisation du fruit de *Sapindus mukorossi* :



Figure 6.1: le fruit immature (à gauche), le fruit mature (à droite).

6.1.1. L'histologie :

Utilisation d'un microscope à haute précision assisté avec micro pour prendre des photos de coupe histologique effectuée sur le fruit mur et immature après coloration avec le vert de méthylène et le rouge Congo.

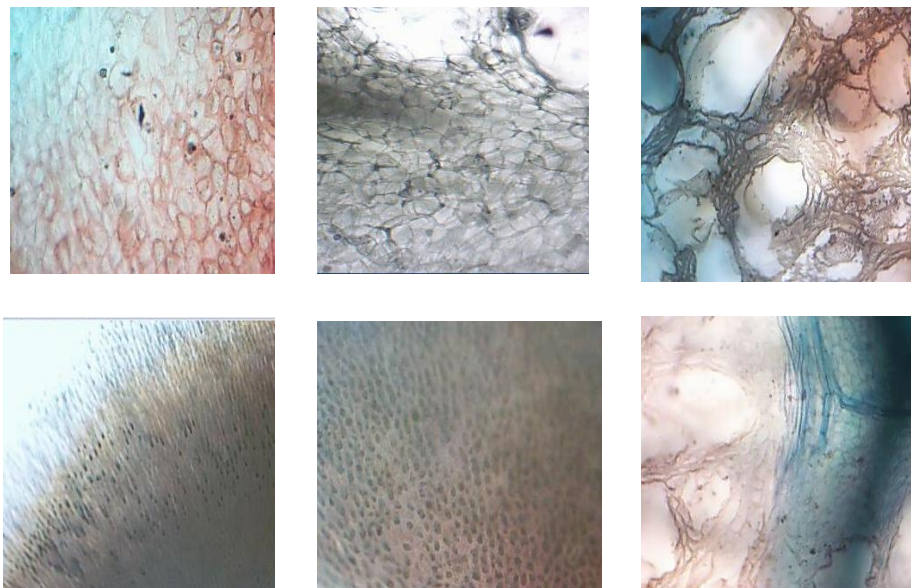


Figure 6.2 : Coupe histologique colorée du fruit immature

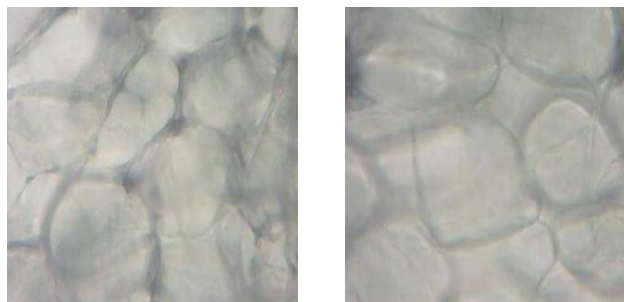


Figure 6.3 : Coupe histologique du fruit mur montrant les poches de saponines sans aucun réactif de révélation

6.1.2. Les résultats de caractérisation phytochimique de la matière végétale :

6.1.2.1. Détermination des taux de matière sèche, d'humidité et de matière organique :

Tableau 6.1 : la composition massique moyenne du fruit

Matière végétale	Masse (g)	Pourcentage massique
fruit	203.61	100%
péricarpes	128.27	62.99%
Graines (noyaux)	71.21	34.97%

Les résultats montrent que la quantité du péricarpe est prédominante par rapport à celle des graines d'où l'intérêt économique en cas d'utilisation de cette plante.

Tableau 6.2: les taux de matière sèche, d'humidité et de matière organique

Taux de matière sèche	Taux d'humidité	Taux de matière organique
91.87%	8.12%	83.75%

6.1.2.2. Détermination des valeurs des cendres des fruits :

Tableau 6.3: les valeurs des cendres

Type de cendres	Pourcentage de cendres
Cendre totale	6.56%
Cendre insoluble dans l'acide	2.4 %
Cendre insoluble dans l'eau bouillante	1.24%

6.1.3. Les résultats des analyses qualitatives des métaux lourds :

Tableau 6.4 : Composition minérale de la poudre végétale

Minéraux	Présence
Na ⁺	+
K ⁺	+
Mg ²⁺	+
Cu ²⁺	-
Fe ³⁺	+
Mn ²⁺	-
Zn ²⁺	+
Ca ²⁺	+
Cd ²⁺	En trace
Ni ²⁺	En trace

Les minéraux les plus intéressants chez le fruit sont le calcium, le magnésium, le sodium et le potassium. Les oligo-éléments présentant le plus d'intérêts dans le fruit sont le fer et le zinc. Le fer cet oligo-élément, présent dans l'hémoglobine, permet le transport de l'oxygène depuis les poumons vers les tissus irrigués. Les résultats montrent aussi que notre plante n'est pas polluée par les métaux lourds.

6.2. Les résultats d'extraction et de purification:

6.2.1. Les résultats d'extraction à froid et à chaud :

Tableau 6.5 : Caractéristiques des différents extraits bruts préparés à partir des fruits de *Sapindus mukorossi*

Extraction	Aqueuse à froid	Hydrométhanolique à froid	Aqueuse à chaud	Hydrométhanolique à chaud
Aspect	Limpide	Limpide	Limpide	limpide
Couleur	orange foncé	orange foncé	orange foncé	orange foncé
Goût	Amer	Amer	Amer	amer

6.2.2. Les valeurs d'extractive des fruits :

Tableau 6.6 : les valeurs d'extractive des fruits (rendement).

Solvant	Pourcentage massique d'extractif
éther de Pétrole	1.2 %
acétate d'éthyle	31.62%
éthanol	72 %
Méthanol	73,75 %
Hexane	4.6%
Eau	62.69%

Les valeurs des extractives solubles dans les solvants comme l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle, l'eau, l'éthanol, le méthanol et de l'hexane (1.2%,31.62%,62.69%,72%,73.75%, 4.6%) respectivement indiquent la nature des constituants présents dans le fruit et montrent que la présence de métabolites polaires et moyennement polaires est dominante.

6.2.3. Les résultats d'extraction et de séparation de saponines à partir de la poudre végétale :

Temps d'extraction par Soxhlet utilisant le méthanol comme solvant : 3 h

Calcul du rendement de l'extrait végétal et des saponines extraites :

- Masse de matière végétale brute utilisé = 3g
- Masse matière végétale = 0,58g
- Masse de la saponine = 0,42g

Le rendement de saponines extraite par rapport à l'extrait végétal =

$$\frac{0.42}{0.58} = 72,41\%$$

Le rendement de saponines par rapport a la matière végétale =

$$\frac{0.42}{3} = 14\%$$

Le rendement est de 14 % de saponine par rapport à la matière végétale initiale avec l'extraction par Soxhlet.

Le fruit est très riche en saponines avec un pourcentage de 14%, cette valeur est conforme avec celle trouvée dans la littérature.

Le produit que nous avons récupéré présente la couleur jaune, d'un aspect très visqueux avant séchage et sans odeur, la figure 6.4 donne l'aspect du produit après séchage.



Figure 6.4 : Aspect des saponines extraites

6.2.4. Extraction à l'hexane de la matière végétale par sonication :

Tableau 6.7 : les valeurs de la teneur en lipides extractibles à l'hexane par sonication

Teneur sans macération	Teneur avec macération
3.6%	4.6%

La macération de la matière active dans le solvant manifeste un effet positif sur le rendement d'extraction. La macération peut provoquer le gonflement puis l'éclatement des cellules, donc l'extraction sera plus favorisée et ainsi le rendement amélioré.

Les ultrasons dans l'extraction peuvent également perturber les parois cellulaires, facilitant la libération de leur contenu.[100]

Par conséquent, l'efficacité de rupture des cellules et du transfert de masse sont cités en tant que deux facteurs principaux menant aux bonnes performances de l'extraction avec la puissance ultrasonique.

D'autres part dans une étude ou 6kg de fruits sont séparés des grains puis sont homogénéisés puis extraites trois fois dans l'hexane (10L) pour l'obtention de 24g d'extrait.[79]. Les résultats ont montré la présence de six

nouveaux esters d'acides gras et une triterpénoïde tétracyclique dans l'extrait considéré.

6.3. Les résultats d'analyse chimique des extraits :

6.3.1 Les résultats des tests de détection des constituants chimiques :

Tableau 6.8 : résultats de criblage chimique

Interprétation :

	Tests	Extrait aqueux	Extrait méthanolique	Extrait d'acétate d'éthyle
1	<i>Alcaloïdes</i>			
	Test de Dragendorff	-	-	-
	Test de Mayer	-	-	-
	Test de Hager	-	-	-
	Test de Wagner	-	-	-
2	<i>Carbohydrates</i>			
	Test de Fehling	+	+	-
	Test de Molish	-	+	+
3	<i>Polyuronides</i> (Mucilage/gomme/pectine)			
		-	-	-
4	<i>Tannin et Composés phenoliques</i>			
	Solution FeCl ₃ 5%	-	-	-
	Solution de Gelatine	-	-	+
	Solution d'Acide Acétique	-	-	-
	Solution de Bichromate de Potassium	-	-	-
	Réactif de Tollens	+	+	+
	Solution diluée d'Iode	-	+	+
5	<i>Glycosides</i>			
	Test de Liebermann-Burchard	+	+	+
	Test de Legal	+	+	+
	Test de Borntrager	+	-	-
6	<i>Flavonoides</i>			
	Test de SHIBATA	+	-	-
	Test de Shinoda	-	-	-
8	<i>Saponines</i>			
	Test hémolytique	+	+	+
	Test de mousse	+	+	+
pH		4.71	4.24	2.76

Les tests photochimiques qualitatifs indiquent la présence de produits naturels usuels dans le fruit. Les extraits méthanoliques, aqueux et celui d'acétate d'éthyle montrent la présence de glycosides peut être (des saponines, des flavonoïdes ou de stéroïdes), aucun extrait n'a montré la présence d'alcaloïdes ni de tanins cependant quelques travaux indiquent leur présence mais n'ont pas été isolés et confirmés quantitativement. Zikova et al qui ont travaillé sur les sapindacées de Russie affirment l'absence des alcaloïdes dans les racines, les feuilles, les fruits et les tiges. Les analyses approximatives du fruit du Sapindus ont permis de donner le taux d'humidité (8.12%), le taux de matière sèche (91.87%) le taux de matière organique (83.75%) et le taux des cendres (6.56%). Ces cendres sont analysées pour leur composition minérale peuvent être utilisées dans le domaine cosmétique.[101]

Les processus simples d'isolation des saponines du Sapindus mukorossi comme décrit dans le journal coréen [102] avec un petit changement : préférer la macération pendant une période (72h) avec agitation à température ambiante pour éviter toutes dégradation ou la perte de certaines propriétés a permis d'obtenir des cristaux de saponines caractérisées et utilisées comme biopesticides.[103]

Le mélange de saponines obtenues est une substance cristalline blanche insoluble dans le chloroforme, le benzène et l'éther de pétrole mais soluble dans le méthanol et l'eau, n'a pas un point de fusion défini (c'est un mélange) de nature acide. Avec l'acide sulfurique concentré donne une couleur jaune rougeâtre , avec l'acide sulfurique concentré et l'anhydride acétique donne une couleur rouge foncée .Elle ne réduit pas la liqueur de Fehling.

6.4. Les résultats de caractérisation physique :

6.4.1. Les analyses des différents extraits et de saponines par l'infrarouge

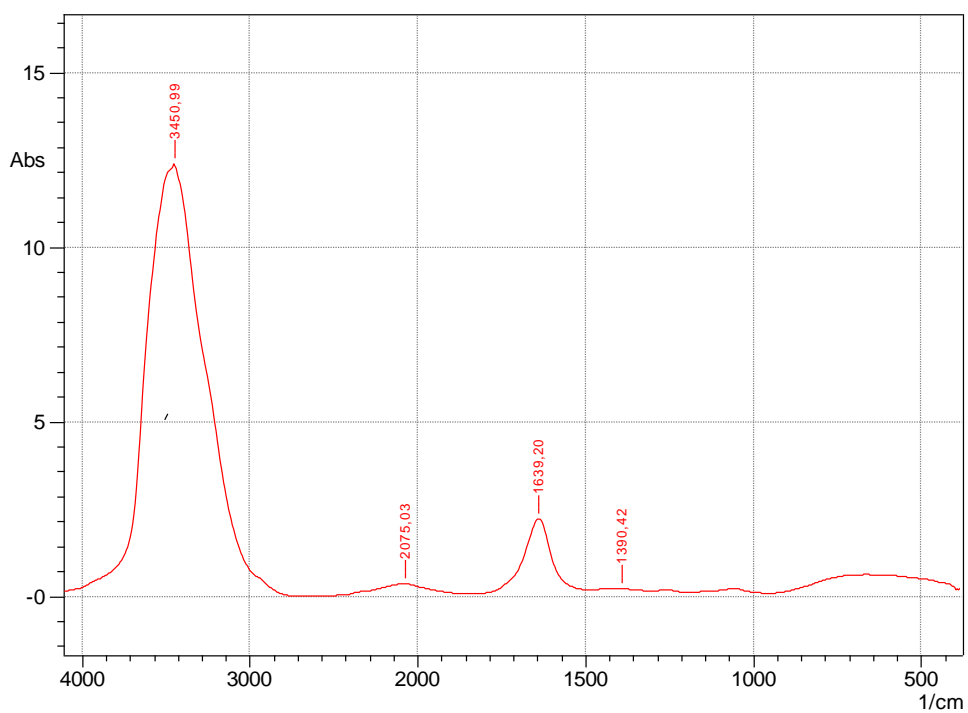


Figure 6.5 : le spectre infrarouge de l'extrait à l'eau

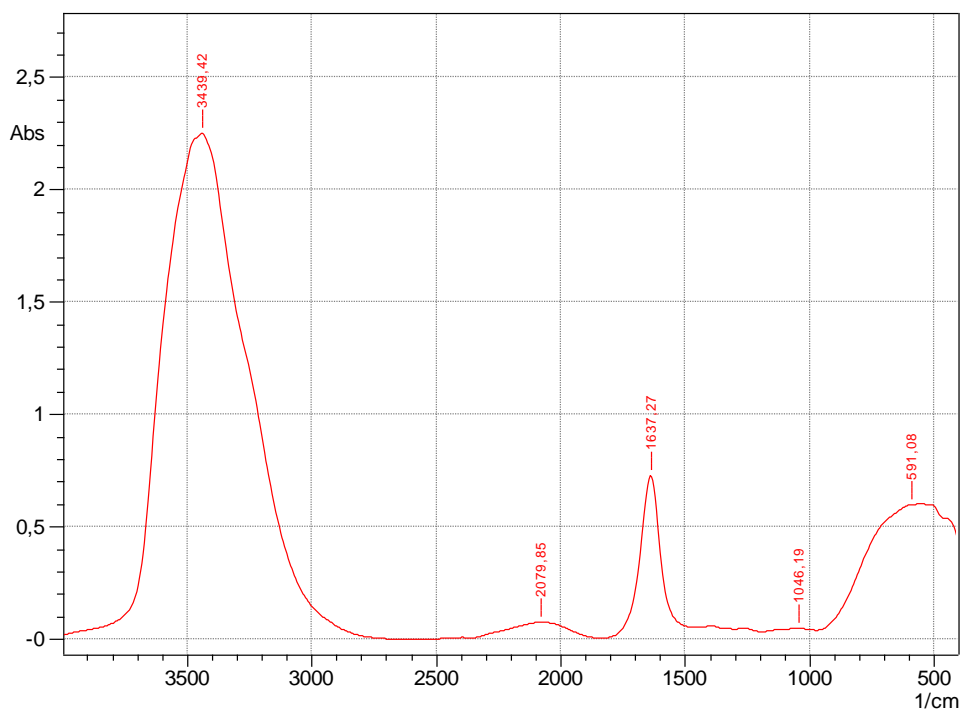


Figure 6.6 : le spectre infrarouge de l'extrait au méthanol

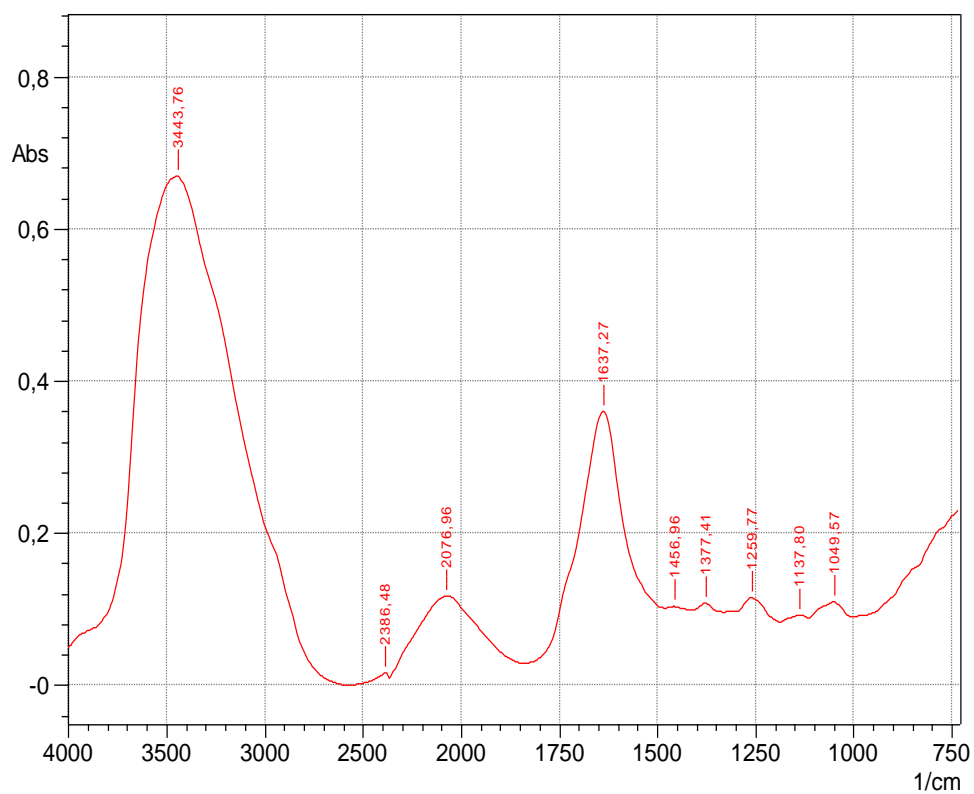


Figure 6.7: le spectre infrarouge de l'extrait à l'acétate d'éthyle

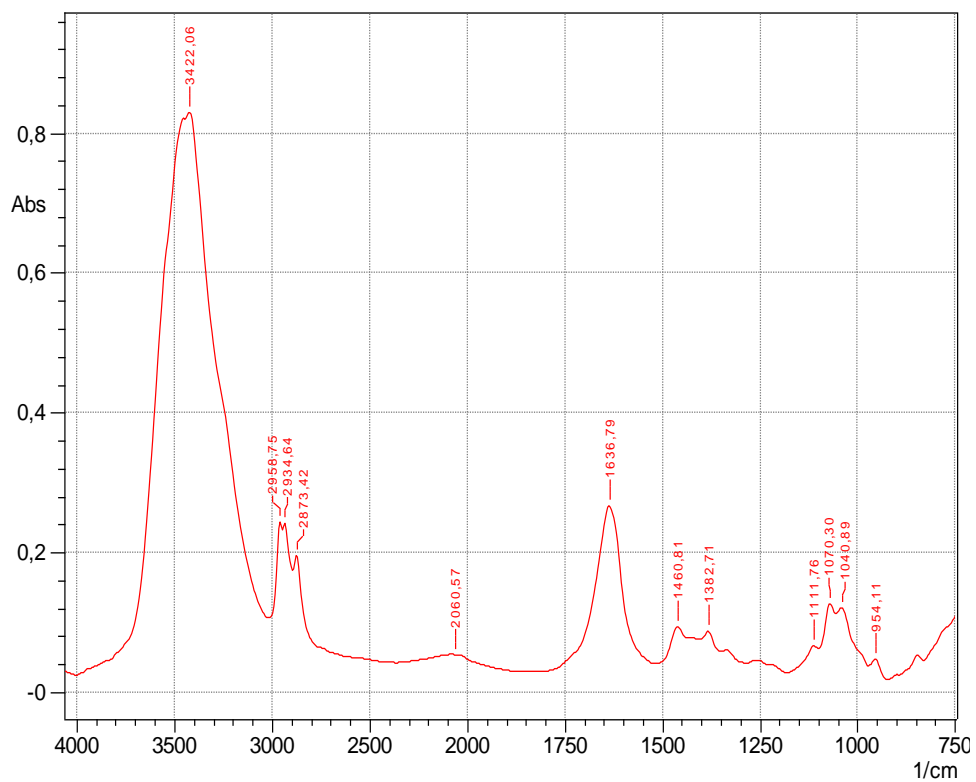
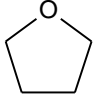


Figure 6.8 : le spectre infrarouge de saponines extraites au méthanol

L'examen des quatre spectres fait apparaître les bandes d'absorption mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau 6.9 : les bandes caractéristiques des spectres IR des extraits bruts et purifiés

Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Types de vibrations
3422.06 - 3450.99 (large)	O—H (lié)
2958.75, 2934.64	(C=C)= C—H
2873.42 (faible)	C—H δ
2076.96 (faible)	C=C (asymétrique)
1636.27- 1639.20	C=C (alcène)
1460,81	CH ₂ δ
1382,71	CH ₃ δ
1000-1200	O—O
800-1000	C—O—O
954,11 et 1070,30	

6.4.2. L'analyse de l'extrait à l'éther par CPG :

Les conditions opératoires : S_{E30} T°=80°C Flo=7ml/min P=60mpascal

Tinj=200°C Tdet=220°C

La chromatographie en phase gazeuse de l'extrait à l'éther de pétrole a été comparé à celui de l'éther de pétrole pur pour détecter de nouveaux produits extraits.

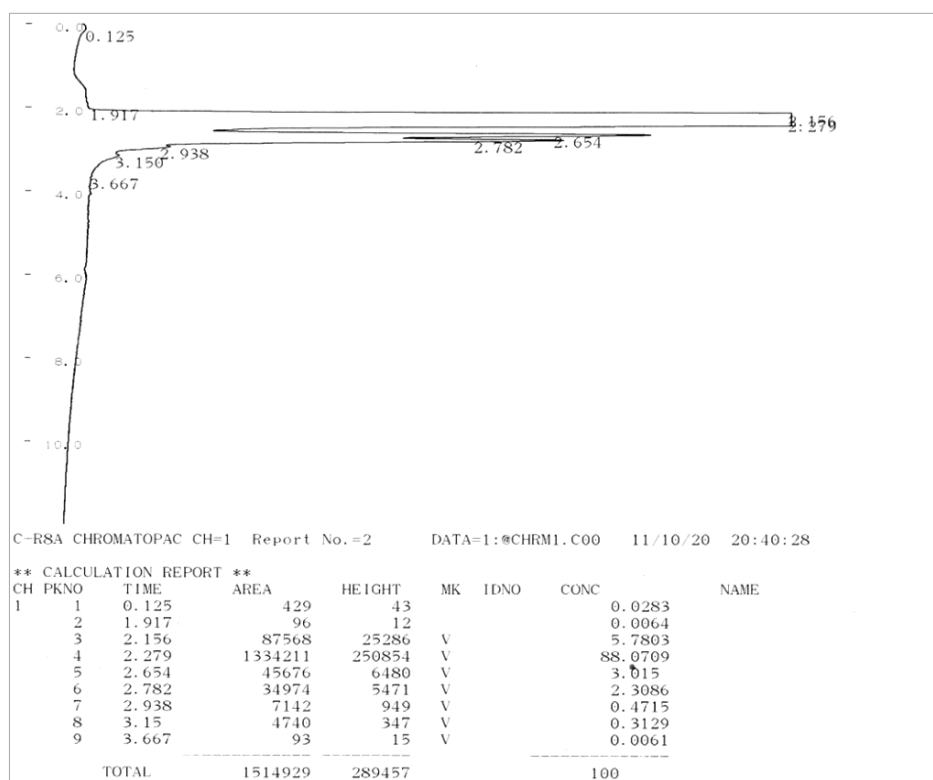


Figure 6.9 : chromatogramme de l'éther de pétrole pur

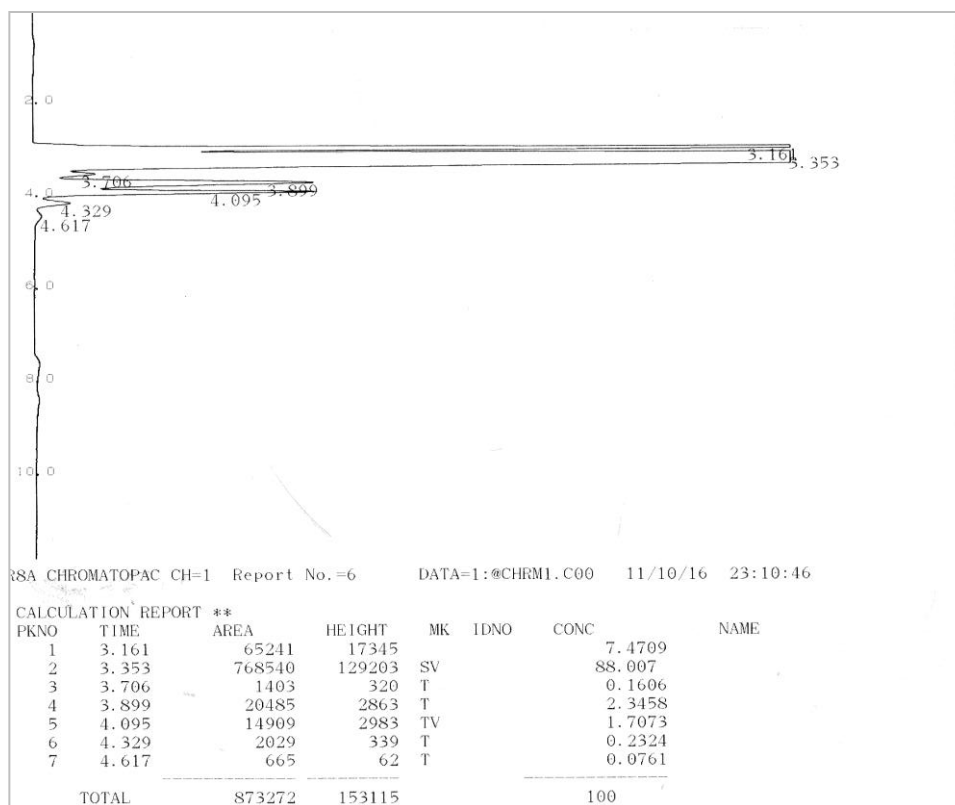


Figure 6.10 : chromatogramme de l'extrait à l'éther de pétrole

Par comparaison des deux chromatogrammes, on remarque la présence de quatre nouveaux produits dans l'extrait de l'éther de pétrole qui correspond au n°4 ($t_R=3.899\text{min}$), n°5 ($t_R= 4,095\text{min}$), n°6 ($t_R= 4.329\text{min}$) et n°7 ($t_R= 4.616\text{min}$)

6.4.3. Les spectres par GC-MS des saponines pures extraites avec de méthanol :

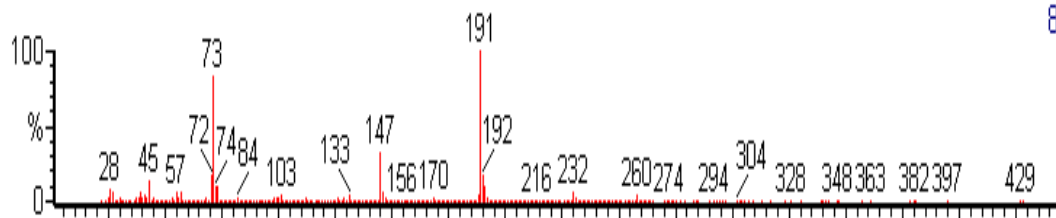
Pic Tr= 9.79 min

Saponine

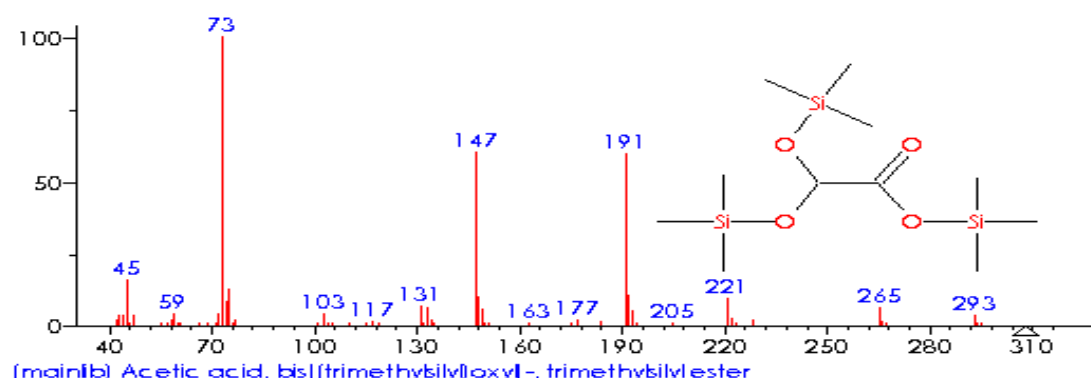
, 20-Apr-2011 + 11:40:55

etudiante 750 (9.795)

8.27e8



Identifier a 84,5%



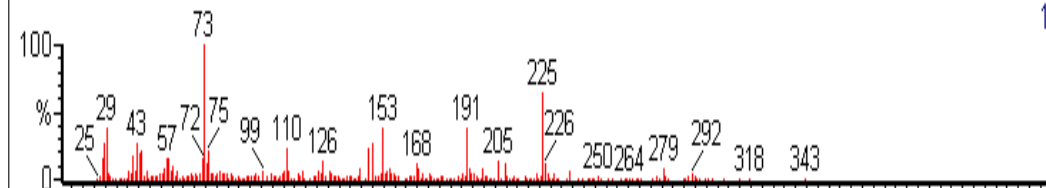
Pic Tr=10.16 min

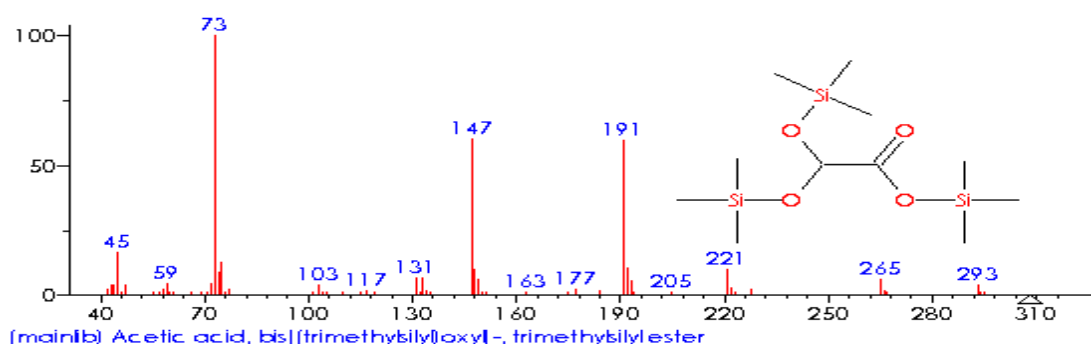
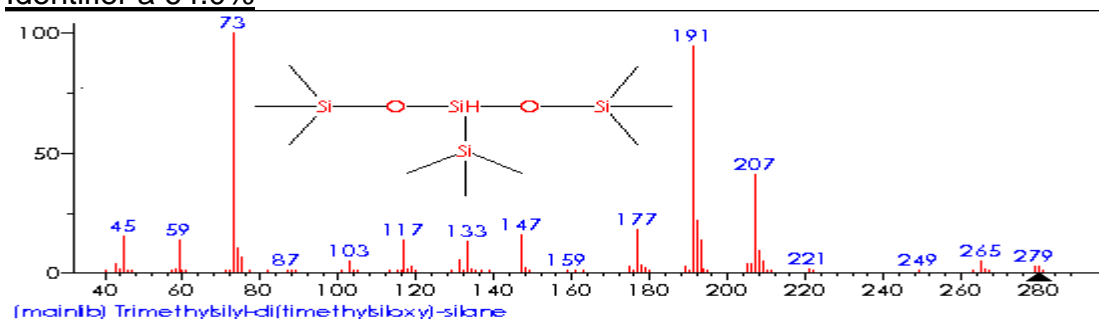
Saponine

, 20-Apr-2011 + 11:40:55

etudiante 823 (10.164) Cm (823-(842+805))

1.62e7



Identifier a 71,8%Identifier a 64.0%

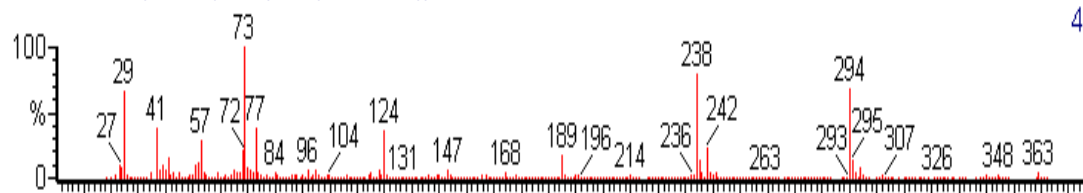
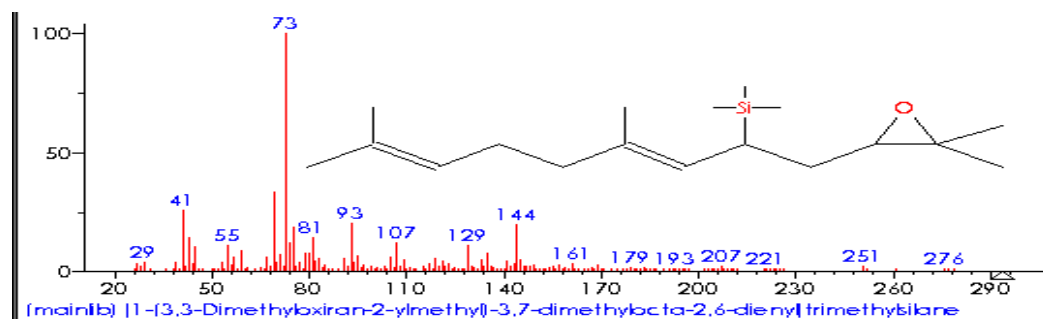
Pic Tr=10.93 min

Saponine

, 20-Apr-2011 + 11:40:55

etudiante 976 (10.938) Cm (976-(1006+884))

4.31e8

Identifier a 92.2%

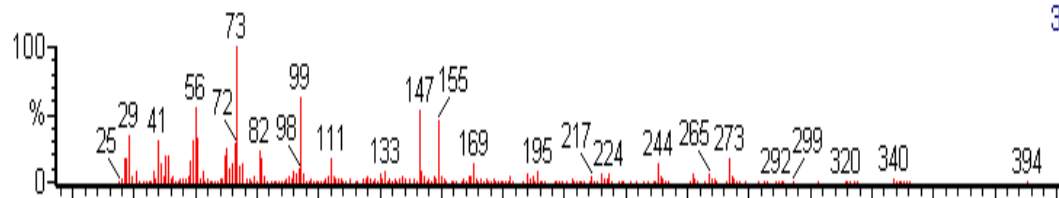
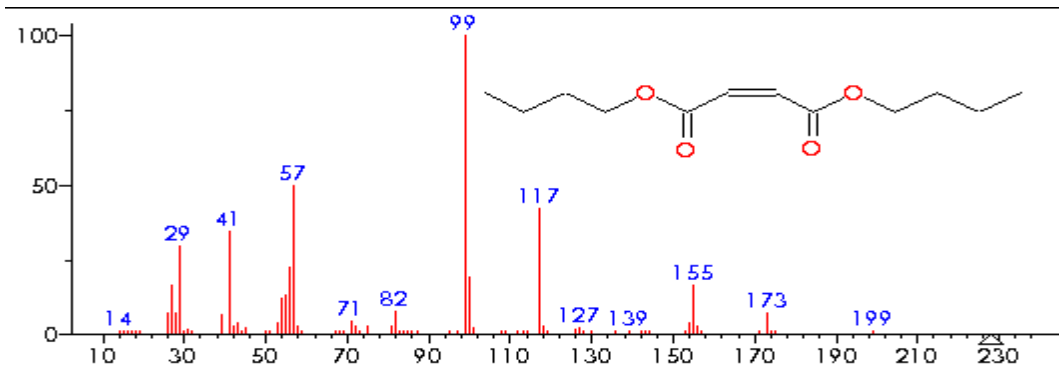
Pic Tr=11.72min

Saponine

, 20-Apr-2011 + 11:40:55

etudiante 1131 (11.722) Cm (1131-(1151+1107))

3.86e7

Identifier a 63.2%

[main]b) 2-Butenedioic acid (Z)-, dibutylester

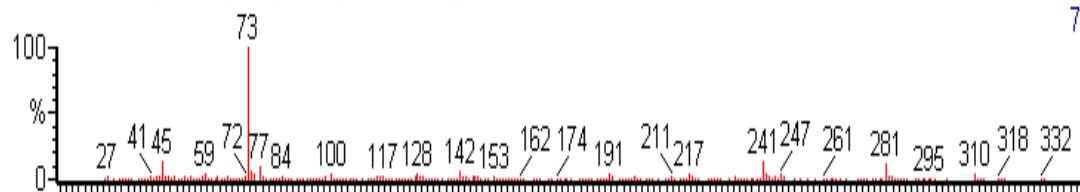
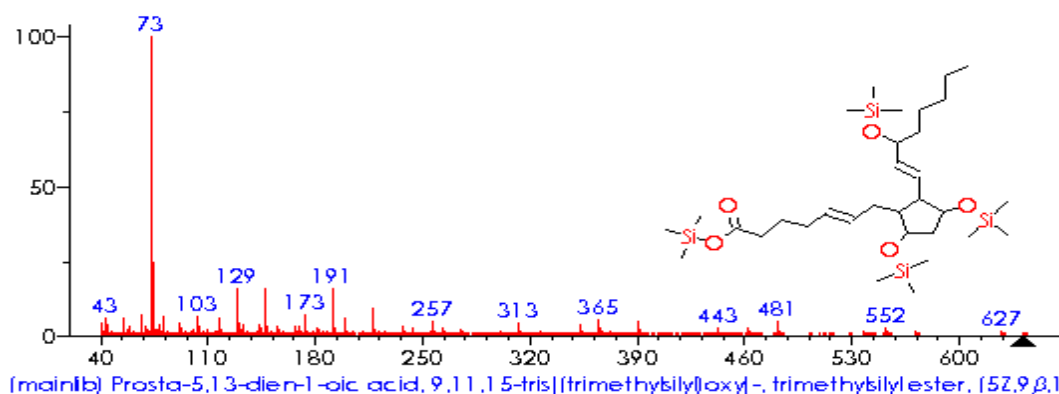
Pic Tr=11.95min

Saponine

, 20-Apr-2011 + 11:40:55

etudiante 1177 (11.955) Cm (1177-(1206+1151))

7.28e7

Identifier a 83.9%

[main]b) Prosta-5,13-dien-1- oic acid, 9,11,15-tris(trimethylsilyloxy)-, trimethylsilyl ester, [5Z,9Z]

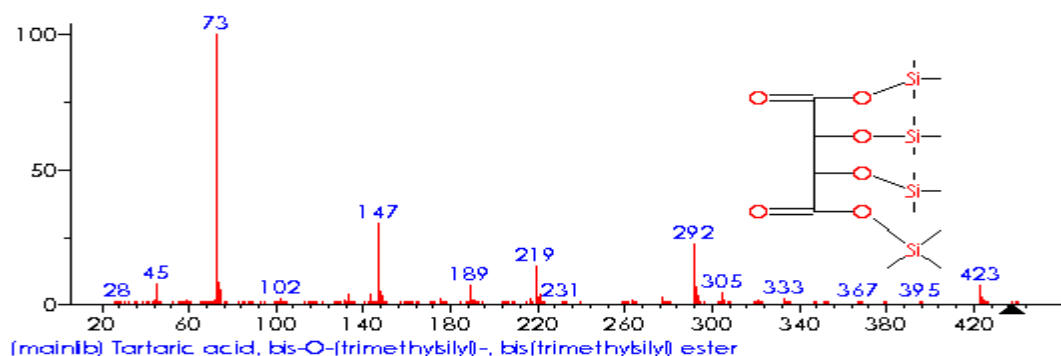
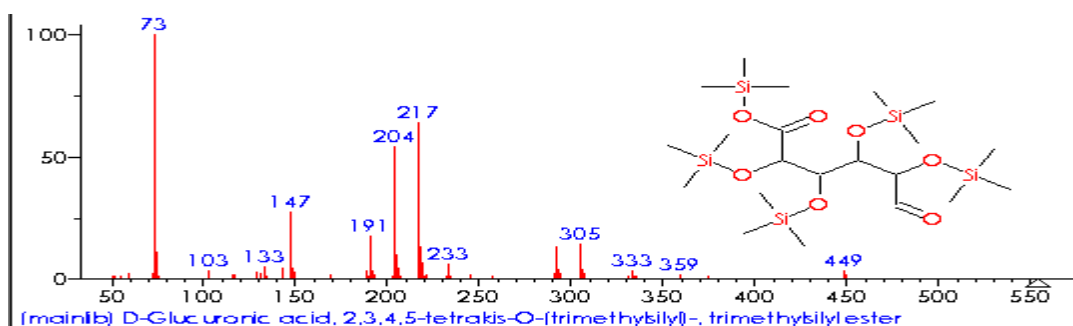
Identifier a 66.4%Identifier a 65.1%

Figure 6.11 : les spectres issus de GC-MS

6.5. Les résultats de caractérisation de l'extrait du fruit en tant que biosurfactant6.5.1. Le test de mousse :

Tableau 6.10 : résultats obtenus pour le test de mousse des saponosides.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
h(cm)	5,7	6,4	6,4	6	7,6	7,8	7,7	7,4	8	8,1
l	2850	1600	1066	750	760	500	550	462.5	500	405

La présence de saponine est bien confirmée selon l'indice de mousse qui est toujours supérieur à 100 pour le fruit du *Sapinudus mukorossi*

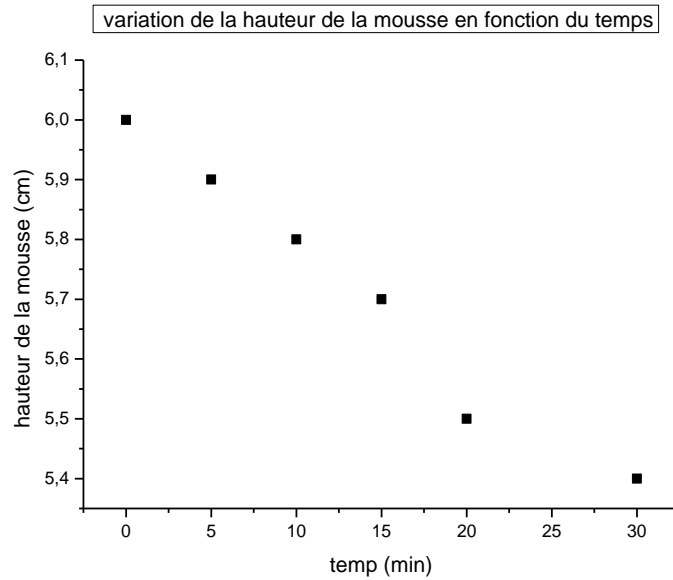


Figure 6.12 : courbe de variation de la hauteur de la mousse en fonction du temps.

$R5 = 98\%$ qui est le rapport de la hauteur de la mousse après 5 min à celle à 0 min représente une bonne stabilité de la mousse.

6.5.2. Détermination de la concentration micellaire critique des différents extraits bruts et saponines isolées.

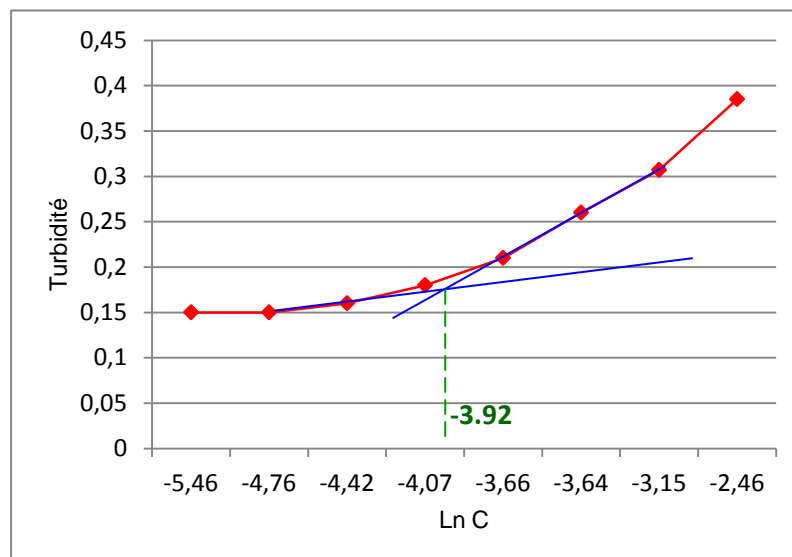


Figure 6.13 : L'évolution de la turbidité en fonction de la concentration de l'extrait à l'eau brut

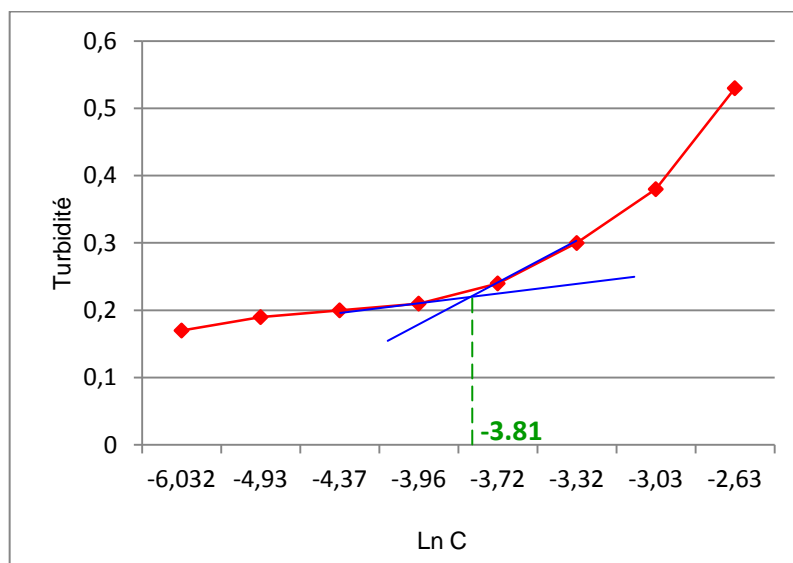


Figure 6.14 : L'évolution de la turbidité en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique brut

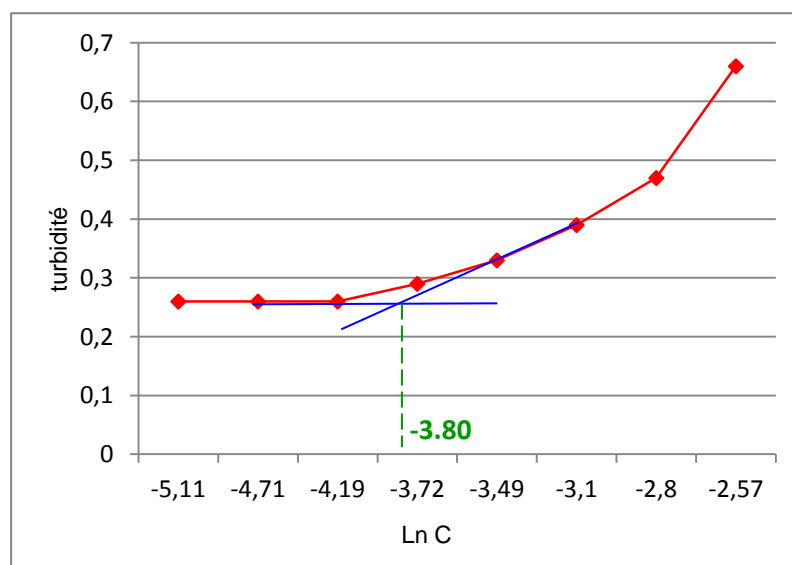


Figure 6.15 : variation de la turbidité en fonction de la concentration de saponines pures méthanoliques

Tableau 6.11 : les valeurs de CMC des différents extraits

Type d'extraits	l'extrait à l'eau brut	l'extrait méthanolique brut	saponines pures méthanoliques
CMC	0.0198 g/L	0.0221 g/L	0.0223g/L

La plupart des biosurfactants ont des CMC faibles et nombre d'agrégation supérieur aux surfactants synthétiques : leur efficacité est donc meilleure. Les CMC obtenues pour les biosurfactants varient en général de 1 à 200 mg/L

Cas des biotensioactifs du fruit du *Sapindus mukorossi*

Une solution aqueuse de 0.5% des saponines du fruit du *Sapindus mukorossi* diminue la tension superficielle de l'eau de 72mN/m jusqu'à 51.7 mN/m, les résultats ont montré que le pouvoir détersif de cette solution est de 60% (quantité de sébum chassée par une solution aqueuse à 0.5%) d'où un pouvoir détersif modéré en comparaison avec le SLS (90.4%) et le Tween (77.6%) et ont montré que la solution aqueuse à 0.5% possède un pouvoir moussant suffisant, la valeur de R5 (R5 représente le rapport des hauteurs de la mousse après 5min à celle à 0min) de la solution aqueuse à 0.5% est de 91.7% représentant ainsi une bonne stabilité de la mousse des saponines du *Sapindus mukorossi* , une mousse avec une valeur de R5 supérieure à 50% est considérée comme métastable.[104]

La valeur de la concentration critique micellaire trouvée est 0.017g/l (1.7%) et la valeur de la tension superficielle égale à 38mN/m reste constante. D'autres chercheurs ont trouvé une CMC de 0.047 g/l. l'augmentation de la température et de la concentration du sel entraînent la diminution de la CMC des solutions de saponines du sapindus. L'augmentation de la dureté de l'eau et du pH augmente la CMC.

Le nombre d'agrégation micellaire varie entre 13 et 21 et la solubilisation des huiles végétales obtenues avec les saponines est meilleure que celle obtenue avec les surfactants synthétiques comme le triton X100 et le SDS. [105].

6.6. Les résultats des tests hémolytiques

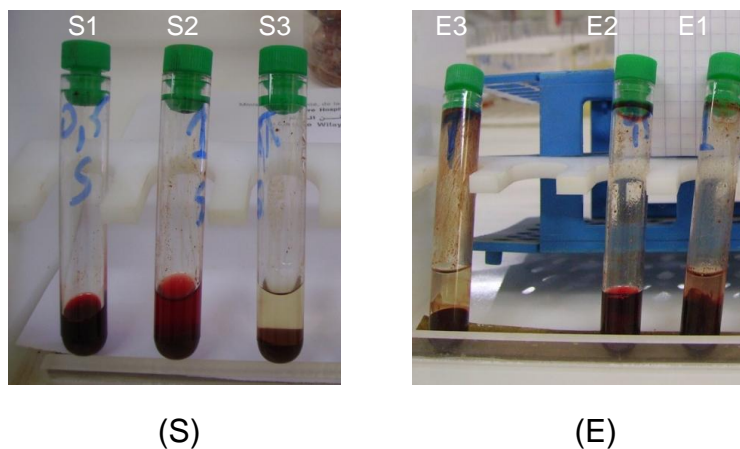


Figure 6.16 : l'activité hémolytique de l'extrait méthanolique (E) et les saponines méthanoliques (S)

L'activité hémolytique : l'extrait méthanolique et les saponines méthanoliques ont provoqué l'hémolyse des globules rouges du sang humain : apparition d'une solution rouge limpide. Les saponines ont la capacité de lyser les érythrocytes [106]. Cela a permis le développement d'essais hémolytiques pour détecter leur présence dans des médicaments ou dans les extraits de plantes. Un mélange de saponines oléanoliques a montré une activité hémolytique plus importante qu'un mélange dialysé de saponines [107] ce qui laisse suggérer la diversité des mécanismes impliqués.

Quelques études de relations entre l'activité et la structure ont conclu que dans le cas des maesa-saponines isolées de *Maesa lanceolata* les substitutions à la position C-22 semblent être une particularité structurale essentielle qui influe l'activité hémolytique.

Les propriétés hémolytiques sont généralement attribuées à l'interaction entre les saponines et les stérols de la membrane érythrocytaire [108]. Les recherches ont montré que les dégâts de saponines à la bicouche lipidique sont irréversibles.

6.7. Les résultats d'application des extraits bioactifs en tant que biopesticides

6.7.1. Les résultats d'application comme bioinsecticide :

6.7.1.1. Les résultats du traitement des arbres des oliviers infestés par le psylle

Tableau 6.12 : comptage le nombre de psylles trouvés sur les différentes parties des arbres avant le traitement

Date : 11/05/2011, Température : 13°C

	Bouton1	Bouton2	Bouton3	Pousse1	Pousse2	Pousse3
arbre n°1	2	1	0	1	1	1
Temoin1	1	0	1	1	0	1
arbre n°2	0	1	0	1	1	2
Temoin2	2	0	1	0	0	1

Tableau 6.13 : le nombre de psylles trouvés sur les différentes parties des arbres 24h après le traitement

Date : 12/05/2011, Température : 22°C

	Bouton1	Bouton2	Bouton3	Pousse1	Pousse2	Pousse3
arbre n°1 traité	0	0	0	0	0	0
Temoin1	1	0	1	1	1	1
arbre n°2 traité	2	1	0	2	1	0
Temoin2	7	3	4	2	1	4

Témoin 1 : arbre n°1 non traité

Témoin 2 : arbre n°2 non traité

Le comptage de population résiduelle figurant sur les tableaux ci-dessus grâce à une loupe binoculaire.

Après 24 h, le taux de mortalité des psylles sur l'arbre n°1 traité : M%= 100%

Après 24 h, le taux de mortalité des psylles sur l'arbre n°2 traité : M%= 71%

Les résultats consignés dans les tableaux 6.12 et 6.13 montrent que la dose utilisée du l'extrait du fruit (10g/L) est efficace.

6.7.1.2. Les résultats du traitement des jeunes arbres d'orangers infestés par le puceron :

Les figures suivantes illustrent les feuilles des arbres avant et après traitement.



Avant traitement



Après traitement

Figure 6.17 : les feuilles des agrumes avant et après traitement

Il est à noter que par observations visuelles, nous avons remarqué qu'au bout de 24 h, tous les pucerons volants ont quitté la plante et qu'au bout de 8 jours, il ne restait sur la plante aucune trace de cette espèce nuisible pour ces plantes, résultat qui confirme visiblement l'efficacité de notre traitement, néanmoins sur le plan agronomique, d'autres études seront indispensables pour donner de telles confirmations d'où la nécessité des travaux de collaborations entre différents spécialistes et chercheurs de la communauté scientifique. Les données relatives à l'efficacité des poudres des fruits des plantes insecticides sont souvent ambiguës et quant à leur rémanence ces données sont quasi inexistantes dans la littérature. Les formulations testées dans notre expérimentation ont pour intérêt d'être faciles à mettre en œuvre en milieu paysan et peu coûteuses. Toutefois, l'action des extraits permet d'éliminer tous les individus présents ; c'est donc une activité biologique intéressante à l'égard des pucerons et des psylles.

Les résultats des différents comptages sur 10 feuilles au bout de 48 h pour les jeunes arbres sous serre sont représentés en annexe

6.7.2. Les résultats d'application des extraits du *Sapindus mukorossi* en tant que biomolluscicides des mollusques

Tableau 6.14 : résultat du premier traitement avec la poudre sèche de la plante

Quantité de poudre g/L	1g/L	0.5g/L	0.25g/L	0.125g/L
Taux de mortalité	100%	100%	100%	100%
Taux de mortalité au contrôle	0%	0%	0%	0%

Le contrôle : les mollusques sont mis dans un récipient contenant de l'eau de robinet

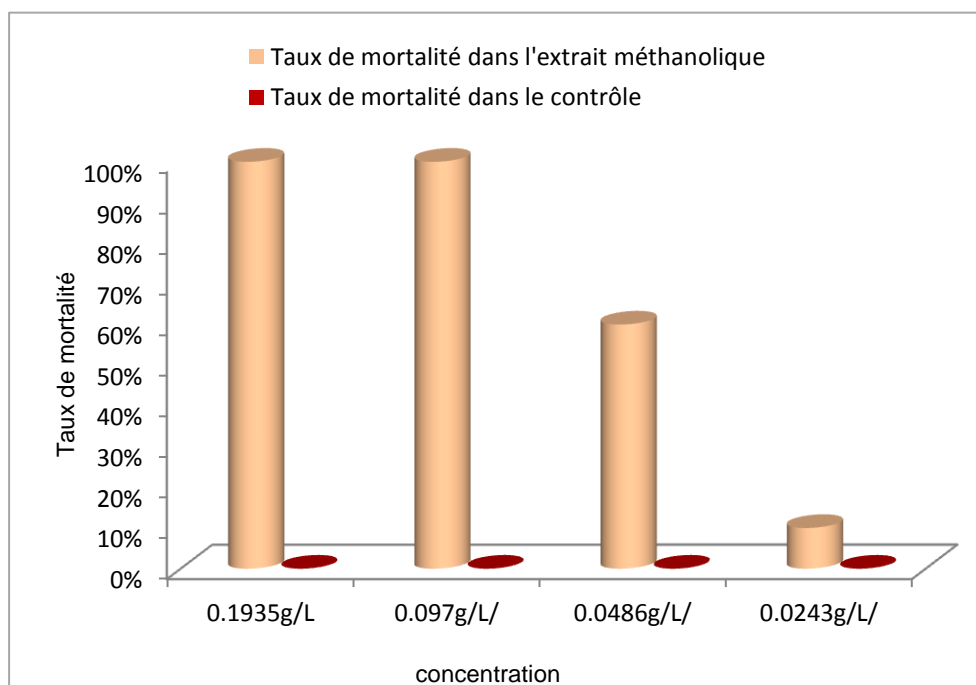


Figure 6.18 : le taux de mortalité des mollusques en fonction de la concentration d'extrait méthanolique brut

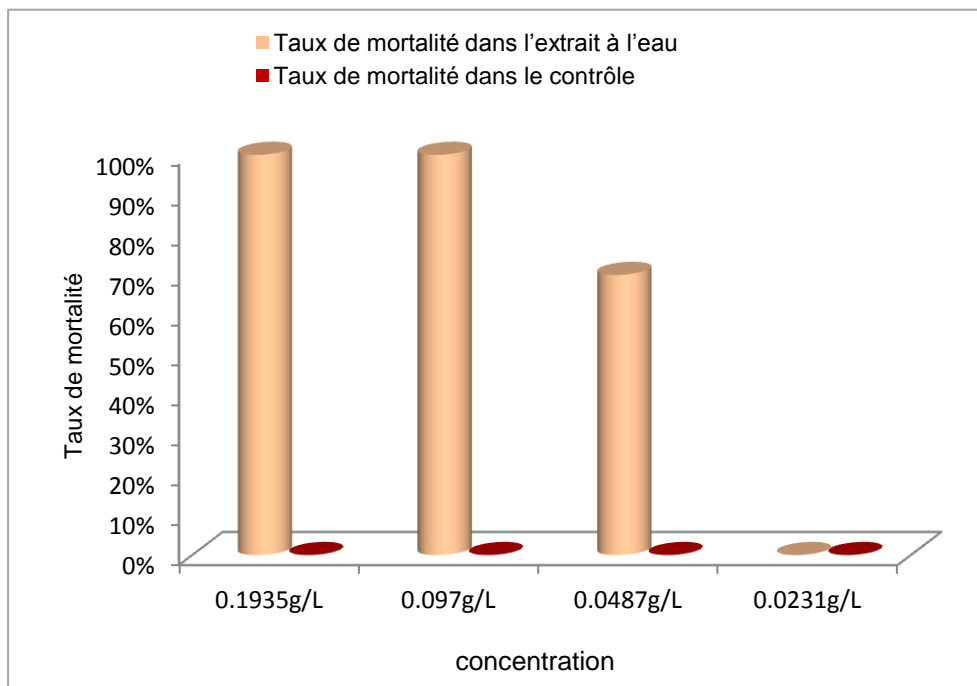


Figure 6.19 : le taux de mortalité des mollusques en fonction de la concentration d'extrait à l'eau brut

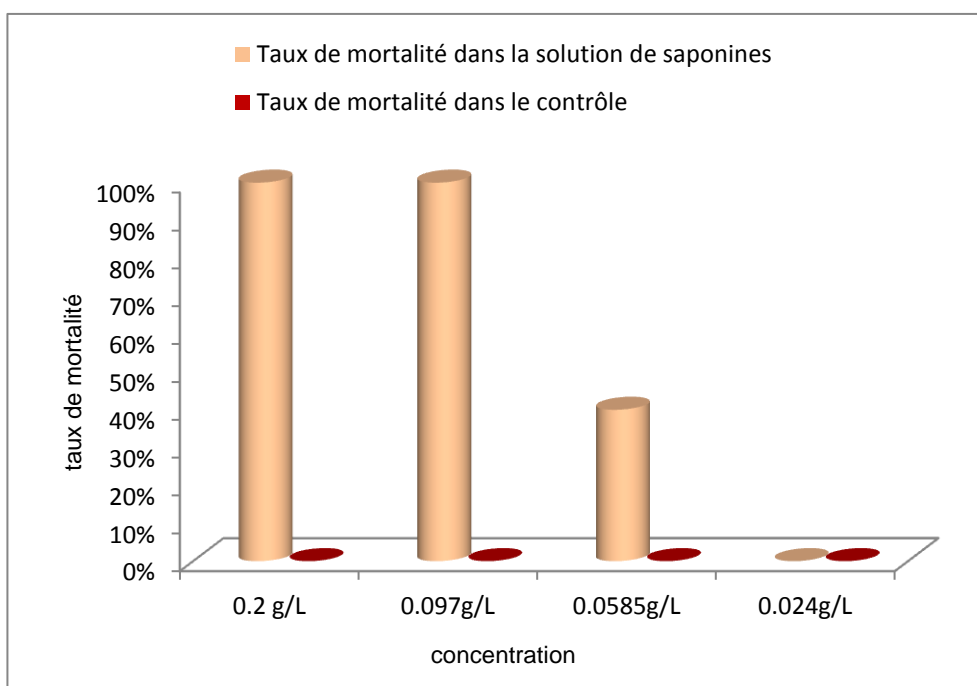


Figure 6.20 : le taux de mortalité des mollusques en fonction de la concentration de saponines pures méthanoliques

La lecture des résultats montre que tous les extraits bruts du fruit se sont révélés doués d'activité molluscicide à une concentration de 20 µg/ml. Les valeurs respectives de la mortalité des mollusques (exprimée en pourcentage) après 24 heures d'exposition à 20 µg/ml de chacun des extraits bruts, Selon les critères standards (OMS., 1965) : les résultats obtenus permettent de retenir en priorité les extraits du fruit comme sources potentielles de substances molluscicides.

Ces deux extraits actifs sont riches particulièrement en hétérosides qui sont les saponines. Ces substances sont notamment connues pour leur haute toxicité aux animaux à sang froid. Les saponines pures ont subi une évaluation de l'activité molluscicide, exprimée par les doses létales DL50 entre 0.058 et 0.097 µg/ml. L'effet de mortalité des populations des mollusques est positivement corrélé à l'augmentation des concentrations des extraits à la limite des doses utilisées et aussi qu'indépendamment des concentrations testées, la mortalité des mollusques augmente d'une façon significative en fonction de la période d'exposition. Cette observation est même valable à des faibles concentrations. A la limite de la période testée de 24h, il apparait une corrélation temps vs dose létale, qui indique que plus le temps d'exposition est important plus la dose létale diminue. Ce qui permet d'envisager d'utiliser les extraits à des concentrations toxiques plus faibles, en allongeant le temps d'exposition.[109]

CONCLUSION

Le présent travail s'insère dans un projet national de recherche visant à la découverte de nouveaux produits naturels. Il s'intéresse particulièrement à l'effet insecticide et molluscicide des substances extraites à partir du fruit du *Sapindus mukorossi*, comme moyen de lutte contre la bilharziose, cette maladie parasitaire, très peu connue dans notre pays mais qui risque de se développer à l'image de ce qui s'est produit en Égypte et les dégâts agricoles causés par les insectes phytophages. Depuis une décennie, l'Algérie poursuit une politique soutenue de développement des barrages. Les foyers de bilharziose, localisés au niveau de certaines régions, notamment dans le nord du pays, risquent de s'étendre à d'autres sites. Ceci aura une conséquence dramatique sur les riverains des sites infectés, en matière de contamination et par conséquent de prise en charge des malades par les pouvoirs publiques.

Les résultats de cette présente recherche ont permis d'apporter une contribution à la valorisation des extraits dans le secteur agricole particulièrement dans la lutte contre les mollusques ainsi que l'activité insecticide sur les ravageurs des agrumes et des oliviers. C'est ainsi que les fractions actives issues des extraits bruts ont présenté des activités molluscicide et insecticide notables au niveau des extraits à l'eau et au méthanol. Ces deux extraits contenant des phytoconstituants peu et moyennement polaires, ont exhibé des mortalités de 100 % de la population des mollusques peut être il y a un effet synergique des différents constituants chimiques des extraits. Nos résultats indiquent qu'une protection durable et à coût peu élevé contre *certaines pestes* est possible en utilisant les formulations à base de fruits secs du *Sapindus mukorossi*

Sur le plan chimique, cette étude a montré que :

- La méthode d'extraction des matières actives par macération est la plus recommandée pour la conservation de la structure et des

propriétés des constituants sensibles à la chaleur comme les saponines (dégradation des sucres).

- La caractérisation des produits par des méthodes spectroscopiques a mis en évidence la complexité du mélange extrait, cas de la RMN.

Suite à ces résultats, il conviendra de faire des études plus poussées, en utilisant des techniques de pointes pour l'identification des structures de nos composés tel que: Une CCM préparative suivie de l'H.P.L.C couplée à la spectroscopie de masse et la R.M.N des substances à isoler.

Ce travail soulève d'autres questions, notamment ceux de composés, autres que les triterpènes et présents en faible quantité dans les extraits et fractions enrichies, et leur possible implication dans l'activité observée (effet de synergie).

De façon globale, l'analyse des différents résultats soulève des questions qu'il serait souhaitable d'étudier dans l'avenir. Il s'agit de :

- reprendre les mêmes investigations en milieu réel et d'en déduire les impacts réels dans une zone écologiquement contrôlable..
- étendre cette étude au niveau de toutes les zones agro-écologiques où l'on produit les agrumes et les olives en vue de la mise au point d'une méthode de lutte efficace
- étudier la rentabilité de cette méthode de lutte.
- comparer l'efficacité des différents extraits et faire d'autres extractions avec d'autres solvants comme le chloroforme, le dichloromethane et l'acétone dans le milieu réel.
- étudier l'impact du biopesticide sur les vertébrés.
- effectuer la même étude de traitement sur d'autres insectes

Ce travail ouvre la voie à d'autres perspectives particulièrement :

- l'activité larvicide (surtout contre les larves des moustiques)
- l'activité de biosurfactant pour la remédiation du sol

- L'activité comme bioémulsifiant pour la formulation des crèmes et des pommades

A l'issue de cette étude, et vue les caractéristiques et l'efficacité exceptionnelle de l'extrait issu de cet arbre, il est de notre devoir d'encourager le reboisement de cet arbre dans d'autres régions de l'Algérie surtout près des rivières et des lacs.

APPENDICE A : Caractérisation des solvants

Solvant	Rohrschneider				Hildebrand			
	P'	p_e'	p_d'	p_n'	δ	δ_h	δ_i	δ_d
Tétrahydrofuranne	4,0	<u>1,52</u>	0,80	<u>1,68</u>	9,1	3,9	2,8	8,2
Dichlorométhane	3,1	0,90	0,56	<u>1,64</u>	9,7	3,0	3,1	8,9
Chloroforme	4,1	1,03	<u>1,68</u>	1,35	9,3	2,8	1,5	8,7
Acétonitrile	5,8	1,80	1,57	<u>2,44</u>	11,9	3,0	8,8	7,5
Méthanol	5,1	<u>2,45</u>	1,12	1,58	14,5	10,9	6,0	7,4
Acide acétique	6,0	<u>2,34</u>	<u>1,86</u>	1,80	10,1	6,6	3,9	7,1
Eau	10,2	3,77	3,77	2,55	23,4	20,7	7,8	7,6

P' : polarité des solvants selon Rohrschneider

p_e' : polarité correspondant au caractère accepteur de protons

p_d' : polarité correspondant au caractère donneur de protons

p_n' : polarité correspondant aux interactions dipôle-dipôle

δ : paramètre de solubilité selon Hildebrand ou énergie moléculaire de cohésion ($\text{cal}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$)

δ_h : énergie partielle due aux liaisons hydrogène

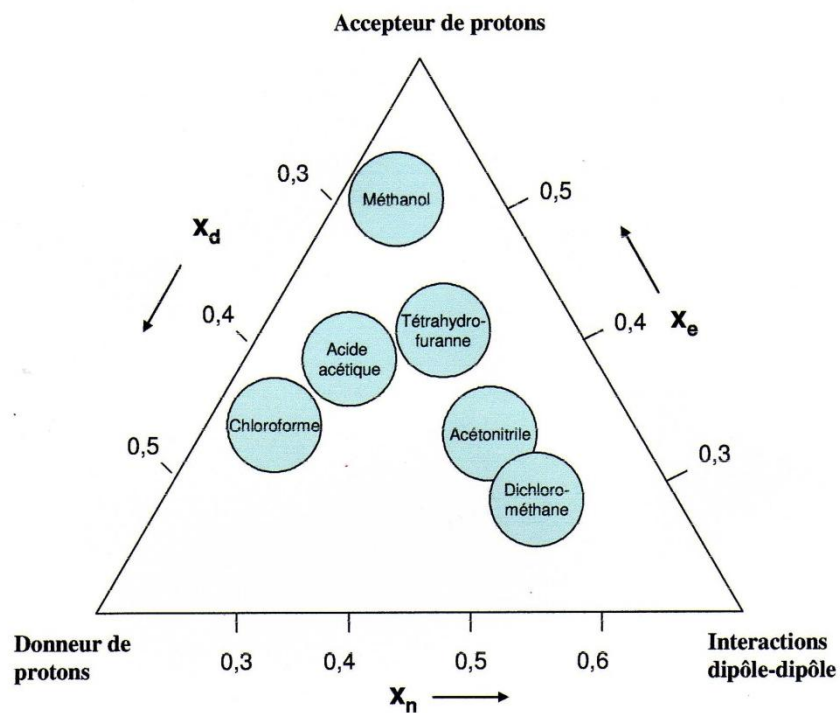
δ_i : énergie partielle due aux interactions dipôle-dipôle

δ_d : énergie partielle due aux interactions de dispersion

Solvant	Caractère prédominant
Tétrahydrofuranne	Interactions dipôle-dipôle
Dichlorométhane	Interactions dipôle-dipôle
Chloroforme	Donneur de liaison hydrogène
Acétonitrile	Interactions dipôle-dipôle
Méthanol	Accepteur de liaisons hydrogène
Acide acétique	Accepteur et donneur de liaisons hydrogène
Eau	Accepteur et donneur de liaisons hydrogène et interactions dipôle-dipôle

Constantes diélectriques à 20°C:

Solvant	CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	CH ₃ CN	CH ₃ OH	(C ₂ H ₅) ₂ O	AcOH	H ₂ O
ϵ_r	9,08	4,806	37,5	32,63	13	6,15	78



Réf : doctorat Berengère Claude (intérêt des polymères à empreintes moléculaires pour la préparation d'échantillons par extraction solides liquide)

APPENDICE B :

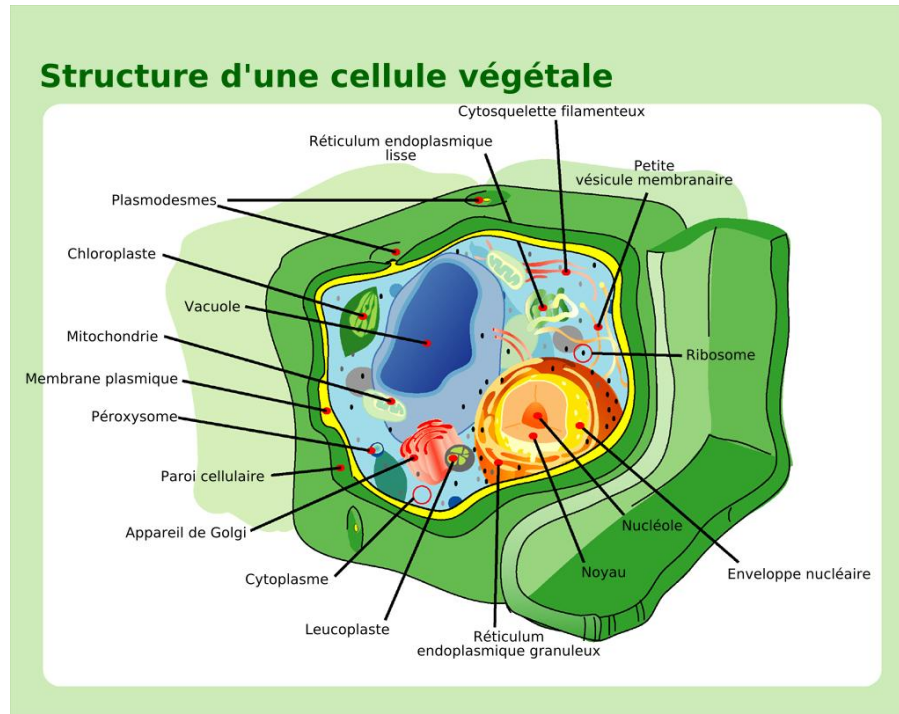
Liste des plantes pouvant contenir des saponines tritèrpniques

Acer campestre L., *Acer chienii* Hu et Cheng, *Acer chingii* Hu, *Acer davidii* Franch., *Acer laxiflorum* Pax, *Acer mandshuricum* Maxim., *Acer mono* Maxim., *Acer orientale* L., *Acer palmatum* Thunb., *Acer sinense* Pax, *Acer wilsonii* Redhd., *Acer yui* Fang, *Aesculus arguta*, *Aesculus assamica* Griff., *Aesculus californica* (Spach) Nutt., *Aesculus chinensis* Bunge, *Aesculus chinensis* var. *Chekiangensis* (Hu et Fang) Fang, *Aesculus chuniana* Hu et Fang, *Aesculus flava* (*A. octandra*), *Aesculus glabra* Willd., *Aesculus hippocastanum*, *Aesculus indica*, *Aesculus lantsangensis* Hu et Fang, *wangii Aesculus megaphylla* Hu et Fang, *chinensis Aesculus neglecta*, *Aesculus octandra* Marsh., *Aesculus parviflora*, *Aesculus pavia*, *Aesculus polyneura* Hu et Fang, *Aesculus tsianguui* Hu et Fang, *Aesculus sylvatica*, *Aesculus turbinata*, *Aesculus wangii* Hu, *Aesculus wangii* var. *ruticola* Hu et Fang, *Aesculus wilsonii*, *Allophylus caudatus* Radlk. [*A. racemosus auct.* Non(L.) Radlk], *Allophylus chartaceus* (Kurz.)Radlk., *Allophylus cobbe* (Linn.) Raeuch. var. *velutinus* Corner, *Allophylus dimorphus* Radlk., *Allophylus hirsutus* Radlk., *Allophylus longipes* Radlk., *Allophylus petelotii* Merr., *Allophylus repandifolius* Merr. et Chun, *Allophylus timomsis* (DC.) Bl., *Allophylus tricophyllus* Merr. et Chun, *Allophylus viridis* Radlk., *Amesiodendron chinense* (Merr.) Hu, *Amesiodendron integrifoliolatum* H. S. Lo, *Amesiodendron tienlinense* H. S. Lo, *Aphania oligophylla* (Merr. et Chun) H. S. Lo, *Aphania rubra* (Roxb.) Radlk., *Arytera littoralis* Bl., *Blighia sapida*, *Boniodendron minus* (Hemsl.) T. Chen, *Barringtonia*, *Camellia axillaris* Roxb. ex Ker, *Camellia cordifolia* (Mech.) Hakai, *Camellia éditthae* Hance, *Camellia irrawadiensis* Barua, *Camellia pitardii* Coh. Stuart, *Camellia reticulate* Lindl., *Camellia rosthomiana* Hand.-Mazz., *Camellia sinensis* O. Ktze., *Camellia tenii* Sealy, *Camellia tsaii* Hu, *Camellia wardii* Kobuski, *Camellia yunnanensis* Coh. Stuart, *Cardiospermum halicacabum* L., *Cupaniopsis anacardioides*, *Delavaya toxocarpa* Franch., *Dimocarpus confinis* (How et Ho) H. S. Lo, *Dimocarpus fumatus* (Bl.) Leenh. subsp. *cacicola* C. Y. Wu, *Dimocarpus longan* Lour.(*Euphoria longan* Lour.) Steud., *Dimocarpus yunanensis* (W. T. Wang) C. Y. Wu et T. Y. Ming, *Dipteronia dyerana* Henry, *Dipteronia sinensis* Oliv., *Dipteronia sinensis* Oliv. var. *taipeiensis* Fang et Fang f., *Dodonaea microzyga*, *Dodonaea viscosa* (L) Jacq.[*Ptelea viscosa* L.], *Erioglossum rubiginosum* (Roxb.) Bl., *Erythrophysa alata*, *Eurycorymbus austrosinensis* Hand.-Mazz., *Eurycorymbus cavaleriei* (Lévl.) Rehd. et Hand.-Mazz., *Handeliendron bodnieri* (Lévl.) Rehd., *Harpullia alata* F. Mueller, *Harpullia arborea* (Blanco) Rdlk., *Harpullia austro - calcdonica* Baillon, *Harpullia camptoneura* Radlk., *Harpullia cauliflora* K. Schum. & Lauterb., *Harpullia crustacea* Radlk., *Harpullia cupanoides* Roxb., *Harpullia frutescens* F. M. Bailey, *Harpullia giganteacapsula* M. Vente, *Harpullia hillii* F. Muell., *Harpullia hirsuta* Radlk., *Harpullia largifolia* Radlk., *Harpullia leptococca* Radlk., *Harpullia myrmecophila* Merr. & Perry, *Harpullia longipetala* Leench, *Harpullia peekeliana* Melch., *Harpullia pendula* Planch. ex F. muell., *Harpullia petiolaris* Radlk., *Harpullia ramiflora* Radlk., *Harpullia rhachiptera* Rdlk., *Harpullia rhyticarpa* C. T. White & Francis, *Harpullia solomenensis* M. Vente, *Harpullia vaga* Merr. & Perry, *Hypelate trifoliata*, *Koelreuteria apiculata* Rehd. et Wils., *Koelreuteria bipinnata* Franch., *Koelreuteria bipinnata* var. *integrifoliola* (Merr.) T. chen (*K. integrifoliola* Merr.), *Koelreutena elegans* (Seem.) A.

C. Smith susp. formosana (Hayata) Meye, *Koelreutena monor* Hemsl., *Koelreuteria paniculata* Laxm., *Lepisanthes basicardia* Radlk., *Lepisanthes browniana* Hiern, *Lepisanthes hainanensis* H. S. Lo, *Litchi chinensis* Sonn., *Maesa hupehensis* Rehl., *Maesa japonica* (Thunb.) Moritzi, *Maesa lanceolata*, *Maesa laxiflora*, *Maesa montana* A. DC., *Maesa perlarius* (Lour.) Merr. *Maesa tenera* Mez, *Melicoccus bijuatus*, *Mischocarpus hainanensis* H. S. Lo, *Mischocarpus pentapetalus* (Roxb.) Radlk., *Mischocarpus sundaicus* Bl., *Nephelium Chryseum* Bl., *Nephelium lappaceum*, *Nephelium topengii* (Merr.) H. S. Lo, *Otophora unilocularis* (Leenh.) H. S. Lo, *Paranephelium hainanensis* H. S. Lo, *Paranephelium hystrix* W. W. Smith, *Pavieasia kwangsiensis* H. S. Lo, *Pavieasia yunnanensis* H. S. Lo, *Pittosporum balancae* DC., *Pittosporum brevicalyx* (Oliv.) Gagnep., *Pittosporum crassifolium* A. Cunn., *Pittosporum crispulum* Gagnep., *Pittosporum daphyniphyllodes* Hayata, *Pittosporum elevaticostatum* H. T. Chang et Yan, *Pittosporum eugennioides* A. Cunn., *Pittosporum glabratum* Lindl., *Pittosporum glabratum* Lindl. var. *neriifolium* Rehd., *Pittosporum heterophyllum* Franch., *Pittosporum illicioides* Makino, *Pittosporum kerrii* Craib, *Pittosporum kunmingense* H. T. Chang et Yan, *Pittosporum leptosepalum* Gowda, *Pittosporum napaulense* (DC.) Rehd. et Wils., *Pittosporum omeiense* H. T. Chang et Yan, *Pittosporum ovoideum* Gowda, *Pittosporum parvicapsulare* H. T. Chang et Yan, *Pittosporum pauciflorum* Hook. et Arn., *Pittosporum pentandrum* var. *hainanense* (Gagnep.) H. L. Li, *Pittosporum perryanum* Gowda, *Pittosporum phillyraeoides* DC., *Pittosporum planilobum* H. T. Chang et Yan, *Pittosporum podocarpum* Gagnep., *Pittosporum podocarpum* Gagnep., *Pittosporum pulchrum* Gagnep., *Pittosporum rehderianum* Gowda, *Pittosporum rhombifolium* A. Cunn. ex Hook., *Pittosporum sahnianum* Gowda, *Pittosporum subulisepalum* Hu et Wang, *Pittosporum tenuifolium* Gaertn., *Pittosporum tobira* (Thunb.) Ait., *Pittosporum tobira* (Thunb.) Ait., var. *calvescens* Ohwi, *Pittosporum tonkenese* Gagnep., *Pittosporum trigonocarpum* Lévl., *Pittosporum truncatum* Pritz., *Pittosporum undulatifolium* H. T. Chan et Yan, *Pittosporum undulatum* Venten., *Pittosporum viridiflorum*, *Pittosporum xylocarpum* Hu et Wang, *Pometia pinnata* J. R. et G. Forst., *Ptelea trifoliata*, *Ptelea viscosa* Linn., *Sapindus abruptus* Lour., *Sapindus Chinesis* Murray, *Sapindus delavayi* (Franch.) Radlk. [*Pancovia delavayi* Franch.], *Sapindus mukorossi* Gaertn., *Sapindus rarak* DC., *Sapindus rarak* DC., var. *velutinus* C. Y. Wu, *Sapindus saponaria* var. *drummondii*, *Sapindus tomentosus* Kurz, *Ungnadia speciosa*, *Xanthoceras sorbifolia* Bunge. *Xeropspermum bonii* (Lecomte) Radlk.

Ref: Chan, P., Mak, M., Wang, Y., "Composition comprising triterpene saponins and compounds with angeloyl functional group, methods for preparing same and uses thereof" (2009)

APPENDICE C : Structure d'une cellule végétale



Cellule végétale: la cellule est un système hautement complexe qui est le siège d'intenses échanges d'énergie et qui présente de vastes surfaces d'interphase. Comme tout être vivant, elle se nourrit, grandit, se multiplie, et meurt.

Plasmodesme: pont intercellulaire.

Dictyosome: organelle cellulaire élaborant des sucres et des protéines.

Chromatine: substance du noyau de la cellule qui donne la couleur.

Nucléole: petit corps sphérique présent dans le noyau de la cellule.

Enveloppe nucléaire: membloppant le nucléole.

Réticulum endoplasmique: formation dans le cytoplasme qui joue un rôle dans la production de substances diverses.

Peroxyosome: organelle du cytoplasme contenant des enzymes.

Chloroplaste: grain de chlorophylle assurant la photosynthèse.

Mitochondrie: granule jouant un rôle important dans la respiration et les réactions énergétiques de la cellule vivante.

Cytosol: partie liquide du cytoplasme.

Ribosome libre: organe du cytoplasme qui assure la synthèse des protéines.

Tonoplaste: membrane vacuolaire.

Vacuole: cavité du cytoplasme d'une cellule contenant diverses substances.

Paroi cellulosique: bord de la cellule.

Thylakoïdes: structure moléculaire membraneuse qui assure la photosynthèse.

Grain d'amidon: granule de féculé.

Appareil de Golgi: Empilement de sacs aplatis (sacculés) limités par une membrane.

Fonction : Sert à l'entreposage et à la modification des protéines et des lipides venant du réticulum endoplasmique. L'appareil de Golgi est abondant dans les cellules sécrétoires, comme les cellules du pancréas.

Lysosome: Sac membraneux contenant des enzymes hydrolytiques.

Fonction: Digestion des substances étrangères et des organites endommagés

Membrane plasmique: La membrane vivante qui enveloppe le cytoplasme de toutes les cellules animales et végétales.

Fonction: Elle agit comme barrière contrôlant le mouvement des matériaux entrant dans la cellule et en sortant.

Réf : <http://fr.wikipedia.org/wiki/cellule-végétale>

APPENDICE D :

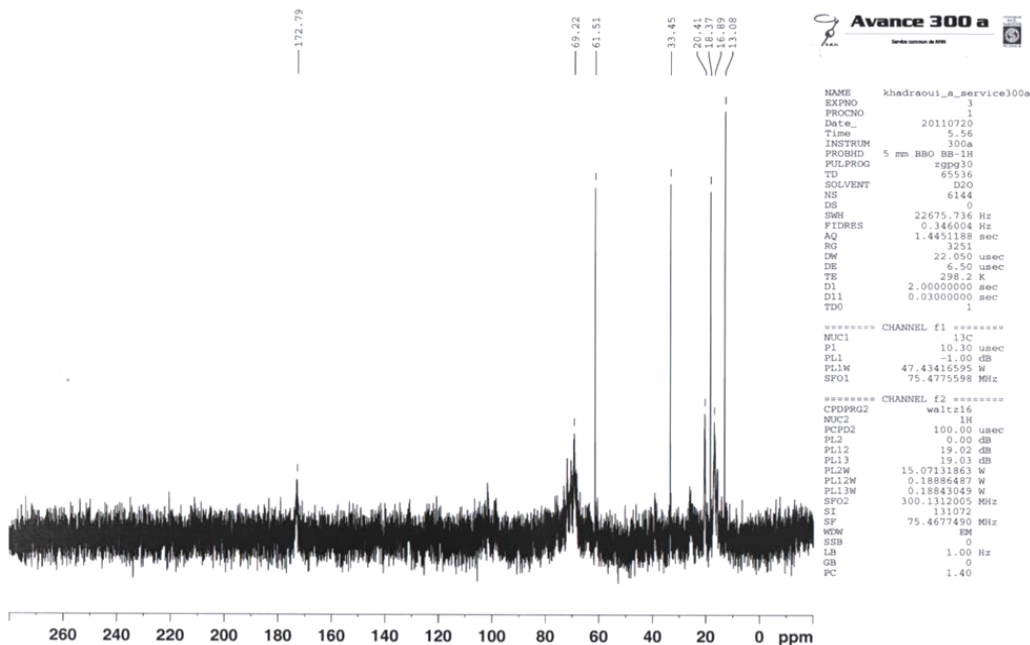
Répartition des métabolites secondaires dans les plantes

Tissu	Famille de molécules
Trichome	Monoterpène
Trichome	Sesquiterpènes
Trichome	Flavonoïdes
Cire	Triterpènes
Cire	Phénols
Epiderme	Alcaloïdes
Paroi cellulaire	Tannins
Cellules morte	Tannins
Vacuole	Glycosides cyanogéniques
Vacuole	Alcaloïdes
Glande à huile	Furanocoumarines
Glande à huile	Sesquiterpènes
Latex	Di-et Triterpènes
Latex	Sesquiterpènes
Latex	Alcaloïdes
Canaux résinifères	Diterpènes
Semence	Amino-acides non protéiques
Paroi des semences	Furanocoumarines
Ecorce	Quinine

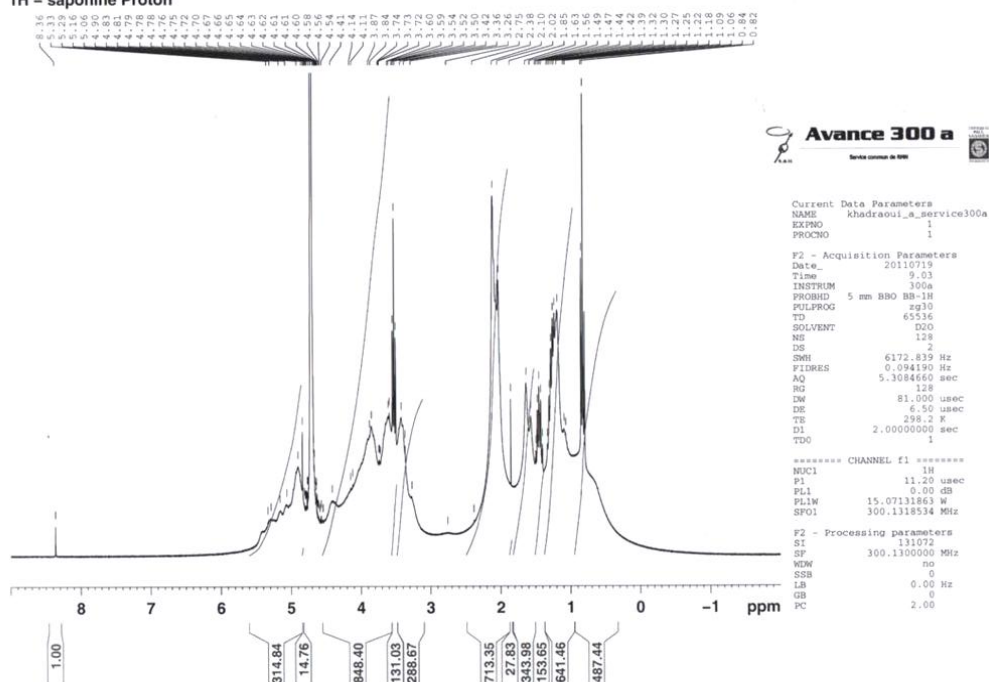
Réf : doctorat Berengère Claude (intérêt des polymères à empreintes moléculaires pour la préparation d'échantillons par extraction solides liquide)

APPENDICE E : Les spectres RMN des saponines

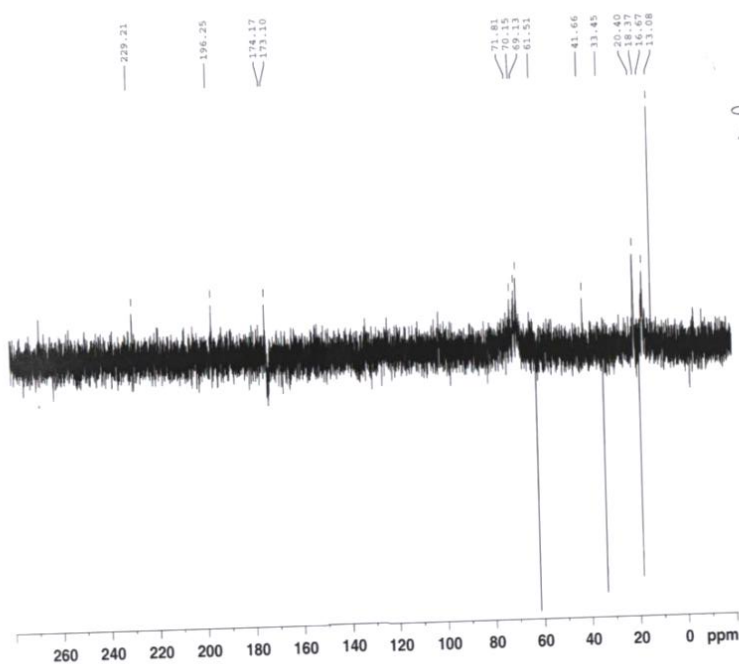
13C – saponine Carbone(zggg)



1H – saponine Proton



13C - saponine Carbone(jmod)

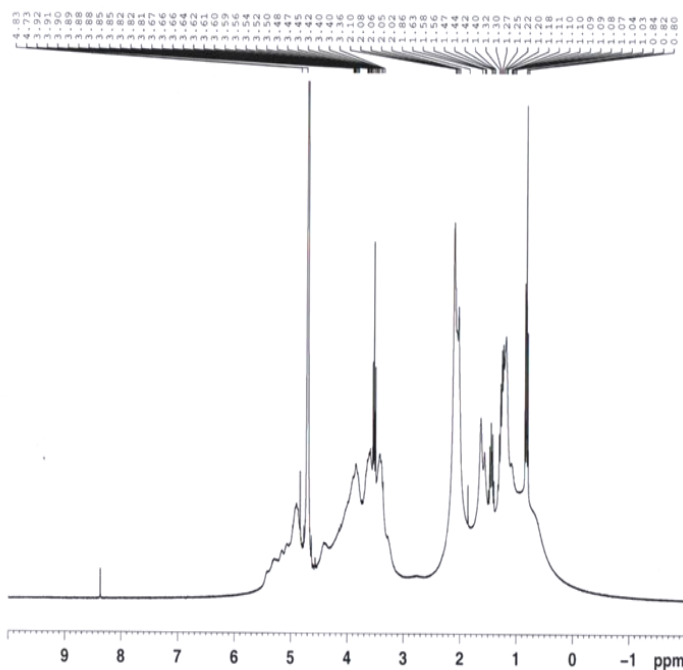


Avance 300 a

```

NAME khadraoui_a_service300a
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20110719
Time 17.58
INSTRUM 300a
PROBHD 5 mm BBO BB-1H
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 820
DS 4
SWH 22675.736 Hz
FIDRES 0.348004 Hz
AQ 1.441188 sec
RG 16384
DE 1.000000
TE 298.2 K
NUC1 13C
NUC2 13C
NUC1F1 13C
NUC1F2 13C
NUC1F3 13C
NUC1F4 13C
NUC1F5 13C
NUC1F6 13C
NUC1F7 13C
NUC1F8 13C
NUC1F9 13C
NUC1F10 13C
NUC1F11 13C
NUC1F12 13C
NUC1F13 13C
NUC1F14 13C
NUC1F15 13C
NUC1F16 13C
NUC1F17 13C
NUC1F18 13C
NUC1F19 13C
NUC1F20 13C
NUC1F21 13C
NUC1F22 13C
NUC1F23 13C
NUC1F24 13C
NUC1F25 13C
NUC1F26 13C
NUC1F27 13C
NUC1F28 13C
NUC1F29 13C
NUC1F30 13C
NUC1F31 13C
NUC1F32 13C
NUC1F33 13C
NUC1F34 13C
NUC1F35 13C
NUC1F36 13C
NUC1F37 13C
NUC1F38 13C
NUC1F39 13C
NUC1F40 13C
NUC1F41 13C
NUC1F42 13C
NUC1F43 13C
NUC1F44 13C
NUC1F45 13C
NUC1F46 13C
NUC1F47 13C
NUC1F48 13C
NUC1F49 13C
NUC1F50 13C
NUC1F51 13C
NUC1F52 13C
NUC1F53 13C
NUC1F54 13C
NUC1F55 13C
NUC1F56 13C
NUC1F57 13C
NUC1F58 13C
NUC1F59 13C
NUC1F60 13C
NUC1F61 13C
NUC1F62 13C
NUC1F63 13C
NUC1F64 13C
NUC1F65 13C
NUC1F66 13C
NUC1F67 13C
NUC1F68 13C
NUC1F69 13C
NUC1F70 13C
NUC1F71 13C
NUC1F72 13C
NUC1F73 13C
NUC1F74 13C
NUC1F75 13C
NUC1F76 13C
NUC1F77 13C
NUC1F78 13C
NUC1F79 13C
NUC1F80 13C
NUC1F81 13C
NUC1F82 13C
NUC1F83 13C
NUC1F84 13C
NUC1F85 13C
NUC1F86 13C
NUC1F87 13C
NUC1F88 13C
NUC1F89 13C
NUC1F90 13C
NUC1F91 13C
NUC1F92 13C
NUC1F93 13C
NUC1F94 13C
NUC1F95 13C
NUC1F96 13C
NUC1F97 13C
NUC1F98 13C
NUC1F99 13C
NUC1F100 13C
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 10.30 usec
P2 20.60 usec
PL1 1.00 dB
PL2 1.00 dB
PL1W 47.4116595 W
SFO1 75.473398 MHz
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
P1 10.30 usec
P2 20.60 usec
PL1 1.00 dB
PL2 1.00 dB
PL1W 15.07131863 W
SFO1 300.1318534 MHz
SFO2 400.1419550 MHz
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40
    
```

1H - saponine Proton (2e)



Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) :

Le spectre RMN- ^1H des triterpènes est peu spécifique. Il présente néanmoins une série de pics caractéristiques dans l'intervalle 0,5 ppm à 2 ppm, correspondant aux groupements méthyles. Le profil (nombre, multiplicité, déplacement) permettent une orientation concernant le type et la série du noyau triterpénique (Hans, F.J *et al.*, 1973; Charrouf, Z *et al.*, 1991; Marcia, L.N *et al.*, 1999; Asaph, A *et al.*, 2005; Hu, H.J *et al.*, 2005; Hua, S *et al.*, 2006; Yu, Q.L *et al.*, 2006; Mario, J.J *et al.*, 1999; Andras, K *et al.*, 2008; Chiy, R.C *et al.*, 2008; Igoli, J.O *et al.*, 2008; Yuan, J.Q *et al.*, 2008). L'examen de la région 2 à 6 ppm indique l'environnement auquel est soumis les protons fonctionnels (hydroxyle, doubleliaison,...).

Le spectre RMN- ^{13}C est plus précieux dans la détermination structurale des noyaux triterpéniques nous permet de bien mettre en évidence les 30 atomes de carbone qui constituent le squelette des triterpènes, et en particulier les groupements carbonyles, acide carboxylique et alcool, par leurs déplacements chimiques spécifiques (environ 210 ppm pour un carbonyle, 170 ppm pour un acide carboxylique et 70 ppm pour un alcool (Marcia, L.N *et al.*, 1999; Mario, J.J *et al.*, 1999).

APPENDICE F : Notations et abréviations

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN 1H	Spectre Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN 13C	Spectre Résonance Magnétique Nucléaire de carbone 13
IR	Infrarouge
GC-MS	chromatographie gazeuse couplé à la spectrométrie de masse
UV	Ultra-violet
TMSOTf	trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DBU	1,8Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène
PBS	phosphate buffer solution
Kd	Coefficient de transfert de matière m s-1
pH	potentiel d'Hydrogène
CMC	Concentration Micellaire Critique (mol.l-1)
T	Température (°C)
CI50	Concentration inhibitrice 50 %
ppm	Unité de δ (partie par million= 10-6, RMN)
t _R	temps de rétention

REFERENCES

1. La Flore De Mostaganem, "Le Sapindus Mukorossi, l'arbre à savon ou noix de lavage", (2010)
2. Trabut, L. et Mares, R. "L'Algérie agricole en 1906", bibliothèque nationale de France, (1906)
3. Pandey, B.P., "Taxonomy of Angiosperms", Chand and Company Ltd. Ram Nagar, Newdelhi, (2001), 297-299
4. Buerki, S., "Worldwide biogeography and systematics of Sapindaceae: a molecular and taxonomic survey combining large data sets and novel methodological approaches". Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel Switzerland, (2009)
5. Angiosperm Phylogeny Group (APG II), "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APGII", Botanical Journal of the Linnean Society 141, (2003), 399-436
6. Muellner, A.N., Vassiliades, D.D. and Renner. S.S., "Placing Biebersteiniaceae, a herbaceous clade of Sapindales, in a temporal and geographic context" Pl. Syst. Evol. 266, (2007), 233-252
7. Pellecure, J., "Les plantes médicinales des régions méditerranéennes", SAEP. Colmar, (1985), 98 p
8. Orwa, C., Multua, A; Kindt, R., Jamnadass, R. and Simons, A., "Agroforestry Database: a tree reference and selection guide", version 4.0, (2009)
9. Braham, M.; Sree, A., and Saxena, C., "Effect of pre-sowing treatments on the seed germination of Sapindus mukorossi Geartn and Sapindus trifoliatum", L. Advenes in Plant sciences, 9(1), (1996), 137-142
10. Sharma, A., Sati, S.C., Sati, O.P., Sati D., Maneesha and Kothiyal S.K/ IJRAP, 2(2) (2011), 403-409
11. Leybros, J. et Fremeaux, P., "Extraction solide-liquide - Aspects théoriques. Techniques de l'ingénieur (traité Génie des procédé)", J 2780
12. Poirot, R., "Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale", thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, (2007).
13. Moulin, J., Pareau, D., Rakib M. et Stambouli. M., "Cinétique du transfert de matière entre deux phases". Techniques de l'Ingénieur (traité Génie des procédé), J 1075.

14. Lalou, A., "Mise au point d'un procédé d'extraction des hémicelluloses à partir d'un substrat végétal lingo-cellulosique : application au cas des coques de tournesol", thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse, (1995)
15. Aguilera, J.M., "Solid-liquid extraction", Food Sciences and Technology, 128, (2003), 35-55
16. Chambers, C., Exaudi-Larsen, K. and Price, W., "Aqueous extraction of solutes from oranges: a kinetic study". Food Chemistry, 57 (4), (1996), 483-486
17. Simeonov, E., Tsibranska, I. and Minchev, A., "Solid-liquid extraction from plants experimental kinetics and modelling". Chemical Engineering Journal, 73, (1999), 255-259
18. Starmans, D.A.J. and Nijhuis, H.H., "Extraction of secondary metabolites from plant material", A review, Trends in Food Sciences and Technology, 7, (1996), 191-196
19. Bruneton, J., "Pharmacognosie. Phytochimie des plantes médicinales", Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 2^{ème} Ed, (1999), 915 p.
20. Gl-stndag, Z; Mazza, G, "Saponins: Properties, Applications and Processing", redOrbit, (2007)
21. Zou, C.-C; Hou, S.-J.; Shi, Y.; Lei, P.-S. and Liang, X.-T; "The synthesis of gracillin and dioscin: two typical representatives of spirostanol glycosides". Carbohydr.Res, 535, (2003), 721-727
22. Robinet, F-G, "Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse", thèse de doctorat, l'Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich
23. Sukhdev, S. H., Gennaro, L., and al., "Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants", International centre for science and high technology, Trieste, (2008), 67-69
24. Bouchelta, A., Boughdad, A., et Blenzar, A., "Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae) ", Biotechnol. Agron. Soc. Environ. (4), (2005), 259–269
25. Yang, C-H., Huang, Y-C, Chen, Y-F and Chang, M-H., "Foam Properties, Detergent Abilities and Long-term Preservative Efficacy of the Saponins from *Sapindus mukorossi*", Journal of Food and Drug Analysis, Vol. 18, No. 3, (2010), 155-160
26. Nadezhda, A. and al., "Recent Methodology in the Phytochemical Analysis of Ginseng", Phytochemical Analysis, Vol 19, Issue 1, (2008), 2-16

27. Feng, S., Qing, H., Peigen, X., Ishtiaq, M and Yiyu, C., "Simultaneous Quantification of Five Triterpenoid Saponins in Clematis L. Spp. by High-performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection", *Phytochemical Analysis*, Vol 19, Issue 1, (2008), 40–45
28. Ki Yong, L. and al., "Quality control of *Pulsatilla koreana* based on the simultaneous determination of triterpenoidal saponins by HPLC-ELSD and principal component analysis", *Phytochemical Analysis*, Vol 21, Issue 4, (2010), 314–321
29. Liwei, W., Xiaodong, W., Xiaofan, Y and Bing, Z., "Simultaneous Analysis of Diosgenin and Sarsasapogenin in *Asparagus officinalis* Byproduct by Thin-layer Chromatography", *Phytochemical Analysis*, Vol 22, Issue 1, (2011), 14–17
30. Joong, H.K., Jacqueline, M.R., Jocelyn Paré, J.R., Varoujan, A.Y., "application of the microwave-assisted process (MAP™) to the fast extraction of ginseng saponins", *Food Research International* 36, (2003), 491-498
31. Gauthier, C., "Glycosidation de triterpènes pentacycliques de type lupane et évaluation *in vitro* de leur potentiel anticancéreux", thèse de doctorat, université du Québec, (2006)
32. Chan, P., Mak, M., Wang, Y., "Composition comprising triterpene saponins and compounds with angeloyl functional group, methods for preparing same and uses thereof" (2009)
33. Hostettmann and Marston., "saponins, chemistry and pharmacologie of natural products", (1995), 19-51
34. Fenwick, G.R., Price, K.R., Tsukamoto, C., and Okubo, K., "Saponins. In Toxic substances in crop plants", Edited by J.P. D'Mello, C.M. Diffins, and J.H. Duffus. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. (1991), 285-327
35. Mackie, A.M., Singh, H.T., et Owen, J.M. "Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroidal saponins in echinoderms". *Comp. Bioch. Physi.* 56B, (1977), 9-14
36. Chwalek, M., "hémisynthèse de saponosides à hédéragénine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur la chaîne hémolytique", thèse de doctorat, université de Reims, Champagne Ardenne, (2004)
37. Acamovic, T., and Brooker, J. D., "Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals", *Proceedings of the Nutrition Society* (2005), 64, 403–412
38. Harmatha, J., "Chemo-ecological role of spirostanol saponins in the interaction between plants and insects", (2000), 129-141

39. Brown, G.D., "The biosynthesis of steroids and triterpenoids". *Natural Product Reports*, 7, (1998), 653-678
40. Goodwin, T.W., "Biosynthesis of Carotenoides and Plant Triterpenes", *Biochem.J*, 123, (1971). 293-329
41. Jorg, M. Augustin, a., and al, "Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins", *Phytochemistry*, 68, (2007) 275–297
42. Vincken, J-P, Heng, L., Aede de Groot,B, Gruppen, H., "Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom", *Phytochemistry*, (2006)
43. Pikul, S.; Switzer, G., "Zirconium tetrachloride as a convenient catalyst for the glycosylation of sterols with 2,3,4,6,6'-penta-O-acetyl-5- hydroxymethylgalactosyl fluoride". *Tetrahedron; Assymetr.* 8, (1997), 1165- 1168
44. Deng, S.; Yu, B.; Hui, Y.; Yu, H.; Han, X., "Synthesis of three diosgenyl saponins: dioscin, polyphyllin D, and balanitin 7". *Carbohydr. Res.* 317 (1999), , 53-62
45. Yu, B.; Zhang, Y.; Tang, P., "Carbohydrate chemistry in the total synthesis of Saponins". *Eur. J. Org. Chem*, 31, (2007), 5145-5161
46. Yamada, H.; Nishizawa, M. "Synthesis and structure revision of intensely sweet saponin osladin". *J. Org. Chem.* 60, (1995), 386-397
47. Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. "Biological activities and distribution of plant saponins". *J. Ethnopharmacol.* 94, (2004), 219-243
48. "marché actuel des bioproduits industriels et des biocarburants & évolutions prévisibles à échéance 2015/2030 -synthèse-", Etude réalisée pour le compte de l'ADEME par le cabinet Alcimed, (2007), 12-13
49. Qingyi, X., Mitsutoshi, N., and al., "Biosurfactants for Microbubble Preparation and Application", *International Journal of Molecular Sciences*, 12, (2011), 462-475
50. Guido, B, "Tensioactifs non ioniques, Mise en oeuvre industrielle" technique de l'ingénieur, J 2 265, (2004)
51. Poincare-N, H., "Etude cinétique et thermodynamique de réactions d'échange de protons et complexation de cations métalliques en milieu micellaire", Thèse de doctorat (2009)
52. Schwarz, M. W., "Saponins", *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2000), 423-485
53. Bertrand, C., "Bio-Pesticides organiques d'origine Naturelle"., Université de Perpignan – Via Domitia
54. B. Speiser, C. Kistler ; "Field tests with a molluscicide containing iron phosphate" ; *Crop Protection*, Vo 21, Issue 5, (2002), 389-394

55. Hommay, G., Jacky, F. and Ritz, M.F., "Feeding activity of limax valentianus Férussac: nocturnal rhythm and alimentary competition". *Journal of Molluscan Studies*, 64, (1998),137-146
56. Silva, T. M., Camara, C. A., and al., "Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol.13., (2005), 193-196
57. Nayama, M., Garba. A., Boulama-jackou. M. L., Toure, A., Idi, N., Nouhou, H., Decanter.,C. "Bilharziose uro-genitale a S. haematobium et infertilité Au Niger". *Mali médical*, Tome. XXII, n°3, (2007), 15-16
58. Belkacem, M., et Jana, M., "Curage et traitement molluscicide pour la lutte contre la Schistosomiase", *Easten Mediterranean Health Journal.*, vol. 12, (2006), 129-136
59. Henderson, I. F., and Parker, K. A., "Problems in developing chemical control of slugs", *Aspects of Applied Biology* 13, (1986), 341-347
60. Marston, A., et Hostettmann, K., "plants molluscicides" *Phytochemistry.*, vol. 24, n° 4, (1985) , 639-652
61. Sindambiwe, J.B., Calomme, M., Geerts, S., Pieters, L., Vlietinck, A.J., and Vanden Berghe, D.A., "Evaluation of biological activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*", *Journal of Natural Products*, 61, (1998), 585–590
62. Treyvaud, V., Marston, A., Dyatmiko, W. and Hostettmann, K., "Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. *Phytochemistry*", 55, (2000), 603–609
63. Molgaard, P., Chihaka, A., Lemmich, E., Furu, P., Windber, C., Ingerslev, F., and Halling-Sorensen, B., "Biodegradability of the molluscicidal saponins of *Phytolacca dodecandra*". *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32, (2000), 248–255
64. Huang, H.-C., Liao, S.-C., Chang, F.-R., Kuo, Y.-H., and Wu, Y.-C., "Molluscicidal saponins from *Sapindus mukorossi*, inhibitory agents of golden apple snails, *Pomacea canaliculata*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, (2003) 4916-4919
65. Ahmed, H.M., Bashir, A.K., El kheir, Y.M., "investigations of molluscicidal activity of certain sudanese plants used in folk-medicine", publisherthieme, stuttgart, Allemagne (1984), 74-77
66. Rochefort, S., Et al., "Recherche et développement de biopesticides et pesticides naturels à faible toxicité pour les organismes non ciblés et respectueux de l'environnement", *Rapport final – Volet Entomologie*, (2006)
67. Powell, K.A., and A.R. Jutum., "Technical and commercial aspects of biocontrol products". *Pest. Sci.* 3, (1993), 315 p

68. Hartly, S.E., "plant interactions with Biotic Factors", Nature publishing group, (2001), 1-10
69. Wooley, J.G., "plant alkaloids", Nature publishing group, (2001), 1-11
70. Duke, S.O., "Natural pesticides from plants", éd. Timber press, Portland, Oregon, USA, (1990), 511-517
71. Chaieb, I., "Les saponines du *Cestrum parqui* nature chimique implications physiologiques et potentiel bio-pesticide", Thèse de Doctorat. Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Elevage de Chott Mariem, Tunisia, (2005), 157 p
72. Shinoda, T., Nagao, T., Nakayama, M., Serizawa, H., Koshioka, M., Okabe, H., and Kawai, A., "Identification of a triterpenoid saponin from a crucifer, *Barbarea vulgaris*, as a feeding deterrent to the diamondback moth, *Plutella xylostella*". *J. Chem. Ecol.*, 28, (2002), 587-599
73. Chaieb, I., Ben Halima-Kamel, M., and Ben Hamouda, M.H., "Effects of diet addition of *Cestrum parqui* (Solanaeae) extracts on some Lepidoptera pests: *Pieris brassicae* (Pieridae) et *Spodoptera littoralis* Boisduval (Noctuidae)", *Med. Fac. Lanbouww. Uni. Gent.* 66, (2001), 479-480
74. Barbouche, N., Hajem, B., Lognay G., and Ammar, M., "Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* sur le criquet pèlerin *Schistocera gregaria*", *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5, (2001), 85-90
75. Oleszek, W.A., Hoagland, R., and Zablotowicz, E., "Ecological significance of plant saponins". Chemical Rubber Company Press, (1999), 451-465
76. Harmatha, J., "Chemo-ecological role of spirostanol saponins in the interaction between plants and insects", *Saponin in food, feedstuffs and medicinal plants.* (2000), 129-141
77. Wierenga, J.M., and Hollingworth, R.M., "Inhibition of insect acetylcholinesterase by the potato glycoalkaloid alpha-chaconine", *Natural Toxins* 1, (1992), 96-99
78. Kirtikar K.R., and Basu, B.D., "Andian médicinales plants", (1933), 636-641
79. Iqbal, A., Khan, U., and al., "Chemical constituents of *Sapindus mukorossi* Gaertn (Sapindaceae), *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1994), 33-41
80. Lachapelle, J., "Microscopie, méthodes d'examen, colorations", *Revue du Cercle de Mycologie de Bruxelles*, n°4, (2004), 35 – 71
81. Bouzidi, M. A., Latrèche, A., et al., "Caractérisation et valorisation des polysaccharides pariétaux d'*Urgine pancration* (Steinh) Phil. de Djebel Tessala (Nord-Ouest Algérien), les technologies de laboratoire, (2010), Vol 5, N°19, 24p
82. Salghi, R., Agadir, E., *Cours d'analyses physico-chimique des denrées alimentaires*, GPÉE, 1ère année.

83. Di Benedetto, M., "Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation", Centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne, (1997), 24-25
84. Henry. M., "Haemolytic saponin extraction and purification method", (1995)
85. Muir, A. D., Paton, D., and al., "Processus de récupération et de purification des saponines et sapogénines du quinoa (*Chenopodium quinoa*)", (1999)
86. Luque-Garcia, J. L., and M. D., Luque de Castro "Ultrasound: A powerful tool for leaching." *Trends in Analytical Chemistry* 22, (2003). 41-47.
87. Kokate, C.K., Practical Pharmacognosy, 4th ed., Vallabh Prakasan, Delhi, (1994), 177-180
88. Kokate, C.K., Practical Pharmacognosy, 4th ed., Vallabh Prakasan, Delhi, (1994), 107-111
89. Ahmed, S.M., Sandra, G et Gustavo, B. "Antinociceptive activity of triterpenes isolated from *Clusia ellipticifolia*". *Rev.Col.Cienc.Quim. Farm*, 33, (2004), 156-162.
90. Guillermo M., Gabriel J, A., Matthias, U and Ulrike, H, 'O-Glycoside Sequence of Pentacyclic Triterpene Saponins from *Phytolacca bogotensis* using HPLC-ESI/Multi-stage Tandem Mass Spectrometry"(2009), Published online in Wiley Interscience, 1148p
91. Viswanadh, G.S., Ramaiah, A.P., Laatsch, H et Maskey, R., "Chemical constituents of the heartwood and bark of *Homonoia riparia*". *J.Trop.Med.Planta*, 7, (2006). 21-25.
92. Salager, J-L., Choplin, L., "Mousses - Formation, formulation et propriétés", *Technique de l'ingénieur*, J2200, (2008)
93. Baumann, E., Stoya, G., and al., "hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure", *Acta Histochem*, (2000), 102, 24-35
94. Coutin, R .,"Les insectes de l'olivier", *Insectes*, 19 n° 130, (2003)
95. Ben Halima, K. M., et Ben Hamouda M. H, "A propos des pucerons des arbres fruitiers de Tunisie", *Notes fauniques de Gembloux* 58, (2005), 11-16
96. Singh. S et Singh. D.K, "Molluscicidal activity of *Nerium indicum* bark.", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 31, (1998), 951-954
97. Mott, K. E., and al., "Plant molluscicides", *Pharmazie in unserer Zeit*, Vol 18, Issue 1, (1989), 28p
98. Molgaard. P., Chihaka. A., Lemmich. E., Furu. P., Windberg. C., Ingerslev. F., Halling-Sorensens. B. "Biodegradability of the molluscicidal saponins of *phytolacca*

- dodecandra".Regulatory Toxicology and Pharmacology., vol. 32, (2000).‘ 248-255..
99. Silva. T. M., Camara. C. A., Barbosa. T. P., Soares. A. Z., Da Cunha. L. C., Pinte. A.C., Vargas. M. D.'Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives", Bioorganic and Medicinal Chemistry., vol.13, (2005),‘193-196
 100. Mason, T. J., Paniwnyk, L., et al. "The uses of ultrasound in food technology." Ultrasonics Sonochemistry 3, (1996), 253-260.
 101. Seydou, F., "Etude de la toxicité de certaines plantes vendues sur les marchés du district de Bamako" Thèse de doctorat, Université de Bamako, (2003)
 102. Ando, O., Tanaka and Shibata, S., "Chemical studies on the oriental plant drugs (XXV). Comparative studies on the saponins and sapogenins of ginseng and related crude drugs", (1971), 28–32
 103. Senthil Kumar, KL., Mohsin Hassan, M., and al., "Research Phytochemical and Pharmacological Studies on *Achillea Millefolium* (L) Leaves", Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences ,Vol 2, Issue 1, (2011), 28p
 104. Voutquenne, L., Lavaud, C., and al., "saponins from *Harpullia Cupanioides*", Phytochemistry, 49, (1998), 2081-2085
 105. Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J., "Biological activities and distribution of plant saponins", Journal of Ethnopharmacology 94, (2004), 219-243
 106. Letelier, María, E., Rodríguez-Rojas, C., and al.,"Surfactant and antioxidant properties of an extract from *Chenopodium quinoa* Willd seed coats" Journal of Cereal Science 53 (2011) 239-243
 107. Lin, K.I., Yang, C.H., Huang, C.W "Synthesis and Structure-Activity Relationships of Fenbufen Amide Analogs" Molecules (2010), 15, 8796-8803
 108. Rupesh Kumar, M., Tamizh Mani., and al., "Evaluation of anxiolytic and antidepressant activities of *Majorana Hortensis*" *Pharmacologyonline* (2011), 1134-1143
 109. Gebremedhim. G., Adewunmi, C. O., Becker. W., Agbedahunsi. J. M., Dörfler. G., "Hirudinicidal activities of some natural molluscicid used in schistosomiasis control" Journal of Ethnopharmacology, vol. 41, (1994),. 127-132.