

N° d'ordre :

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIÈRE
FILIÈRE : CHIMIE
SPÉCIALITÉ : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

MEMOIRE DE MASTER ACADEMIQUE

THÈME

Formulation et optimisation d'une crème d'activité anti-inflammatoire à base de huile essentielle de menthe poivrée

Présenté par :

- ABED CHAMS EDDINE

Mémoire soutenu publiquement, le 02/07/2025 devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>	<i>Affiliation</i>	<i>Qualité</i>
Mme Khellafi - KHALDI NASSIMA	MAA	UMMTO	Président
Mme AMITOUCHE DHAHBA	MCA	UMMTO	Examineur
Mme IDRIS IMANE	MCB	UMMTO	Encadrant
Mme MECHID WAHIBA	Ingénieur d'état en chimie industrielle	Site DAR EL BEIDA SAIDAL	Co-encadrant

Promotion : 2024-2025

REMERCIEMENT



Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire control qualité de l'industrie pharmaceutique **SAIDAL** du site Dar El Beida et au niveau de laboratoire pédagogique de chimie pharmaceutique de l'**UMMTO**.

Mes vifs remerciements vont tout d'abord à mon enseignante et ma promotrice Madame **IDRIS IMANE**, Maitre de conférence Classe B à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Qu'elle trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance pour l'encadrement efficace et son professionnalisme, ses critiques judicieuses, son attention inlassable, sa disponibilité, sa patience, sa présence, son énergie et son aide tout au long de ce travail.

Mes remerciements vont également à ma Co-promotrice Madame **Mechid Wahiba** Analyste senior dans le laboratoire control qualité au sein du site de production de SAIDAL DAR EL BEIDA. Sa disponibilité, ses qualités humaines, sa bienveillance, sa courtoisie et son encouragement, sa patience, son énergie et son aide tout au long de ma période de stage.



REMERCIEMENT



Je tiens à remercier Madame **KHALDI Nassima** Maître assistante classe A à L'UMMTO, d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à remercier également Madame **Amitouche Dhahbia**, Maître de conférences Classe A à l'UMMTO, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Un merci tout particulier à une personne qui m'a apporté énormément de soutien et d'aide. Pleine d'énergie positive, pétri de qualités, dotée d'une volonté de fer et d'un dévouement total, avec une constante détermination à viser l'excellence, vous avez été une véritable source d'inspiration et de motivation pour moi. Travailler avec vous, Mlle **BOUMATI ANISSA** Doctorante en Chimie pharmaceutique de la faculté des Sciences de l'UMMTO a été une expérience aussi enrichissante que stimulante, et votre accompagnement a incontestablement été déterminant dans la réussite de ce projet. Merci d'avoir égayé le laboratoire.



REMERCIEMENT



Je tiens à remercier chaleureusement tout le personnel de **Saidal**, et plus particulièrement l'**équipe du laboratoire de control qualité**, avec laquelle j'ai eu le privilège de collaborer.

Mes remerciements vont également à tout le **personnel** de la faculté des sciences de l'**UMMTO**.

Au terme de ce modeste travail, je tenais à exprimer mes profonds remerciements à tous ceux qui ont contribué de **près** ou de **loin** à la réalisation de ce travail.



ABED CHAMS EDDINE

HOME

01/09/2025

DEDICASSE

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَآخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنِ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ﴾

**C'EST AVEC LA PLUS
GRANDE ÉMOTION
QUE JE DÉDIE CE MODESTE TRAVAIL :**

A toute ma famille.

A MES PARENTS. *A mes frères et soeur.*

A TOUS MES PROCHES.

A TOUT MES ENSEIGNANTS DE TOUS LES CYCLES.

*A tout ceux que j'aime.
A tous ceux qui m'aiment.*



Table des matières

Introduction.....	1
Partie 01 : Synthèse bibliographique	
Introduction.....	1
Présentation de la société Group Sidal.....	3
Partie I.....	3
I. 1. Définition d'une crème pharmaceutique.....	6
I.2. Types de crèmes pharmaceutiques	6
I.3. Emulsion.....	6
Définition	6
I.3.1. Différents systèmes d'émulsion	6
I.3.2. Classification d'émulsion	7
I.3.3. Instabilité des émulsions.....	8
I.3.4. Stabilité des émulsions	8
I.3.5. Formulation d'une émulsion.....	9
I.3.5.1. Composition d'une émulsion	9
I.3.5.2. Préparation des émulsions.....	11
I.3.6. Optimisation de la formulation d'une émulsion	12
I.3.7. Contrôles qualités des émulsions.....	13
I.3.7.1. Examen macroscopique	13
I.3.7.2. Examen microscopique	13
I.3.7.3. Mesure du pH.....	13
I.3.7.4. Mesure de la viscosité.....	13
I.3.7.5. Tests de stabilité.....	13
Partie I.....	14
I.4. Introduction	15
I.5 .Classification botanique	15
I.5.1. Description botanique.....	15.
I.6. Huile essentielle de menthe poivrée	16
I.6.1. Evaluation physico-chimique (conformément à la pharmacopée International).....	16
I.6.2. Constituants chimiques.....	17

Table des matières

I.6.3. Menthol principe actif de HEMP	17
I.6.4. Propriétés médicinales de l'HEMP	18
I.6.4.1. Activité anti-oxydante	18
I.6.4.2. Activité anti-inflammatoire	18
I.6.4.3. Activité antibactérienne	18
I.6.4.4. Activité antifongique	18
I.7. Conclusion	19
Références bibliographiques	

Partie 02 : Matériel et méthodes

Partie II	19
II.1. Objectifs	20
II.2. Matériel	21
II.3. Méthodes	22
II.3.1. Caractérisations organoleptiques et Physico-chimiques	22
II.3.1.1. Caractérisations organoleptiques	22
II.3.1.2. Tests physiques	22
II.3.1.2.1. Densité relative	22
II.3.1.2.2. Indice de réfraction	22
II.3.1.3. Tests chimiques	23
II.3.1.3.1. Potentielle hydrogène pH	22
II.3.1.3.2. Indice d'acide	22
II.3.1.3.3. Indice de peroxyde	22
II.3.2. Etude des activités biologiques	24
II.3.2.1. Activité antioxydante	24.
II.3.2.2. Activité antibactérienne	27
II.3.2.3. Activité antifongique	30

Table des matières

II.3.2.4. Activité anti-inflammatoire-----	30
II.3.3. Formulation de la crème -----	32
II.3.3.1. Crème réalisé au niveau de Sidal-----	32
II .3.3.2. Crème réalisé au niveau de l'UMMTO -----	33
II.3.3.2.1. Optimisation de la formule de base -----	33
II.3.3.2.2. Evaluation de la stabilité des émulsions -----	35
II.3.3.3. Formulation finale et étude de stabilité -----	36
II.3.3.3.1. Formulation-----	36
II.3.3.3.2. Etude de stabilité-----	36
Références bibliographiques	
Partie 03 : Résultats et discussions	
Partie III	37
III.1. Caractérisations Physico- chimiques et organoleptiques des deux HEMP	38
III.1.1. Caractéristiques organoleptiques	38
III.1.2. Caractéristiques Physico-chimiques	38
III.1.2.1. Densité	38
III.1.2.2. Indice de réfraction	38
III.1.2.3. Indice d'acide.....	38
III.1.2.4. Indice de peroxyde	39
III.2. Etude des activités biologiques	40
III.2.1. Activité antioxydante.....	40
III.2.2. Activité antibactérienne	43
III.2.3. Activité antifongique.....	45
III.2.4. Activité anti-inflammatoire.....	46
III .3. Formulation de la crème	48
III.3.1. Crème réalisé au niveau de Sidal	48
III.3.1.1. Etude de stabilité	48
III.3.2. Crème réalisé au niveau de l'UMMTO.....	50
III.3.2.1. Optimisation de la formule de base.....	50

Table des matières

III.3.2.1.1. Optimisation du HLB	50
III.3.2.1.2. Optimisation de la consistance	51
III.3.2.1.3. Optimisation du temps	53
III.3.2.1.4. Optimisation de la vitesse d'homogénéisation	55
III.3.3. Formulation finale	56
III.3.3.1. Formulation avec huile d'amande amère	56
III.3.3.2. Formulation avec Myristate d'isopropyle	58
III.3.4. Comparaison de la stabilité entre la formulation finale UMMTO et la crème industrielle SAIDAL (0,5%)	59
Conclusion générale et perspectives	59
Références bibliographiques	60
Annexes	

Figure I.1 : Industrie pharmaceutique SAIDAL site DAR EL BEIDA.	3
Figure I.2 : schéma d'émulsions simples[11]	7
Figure I.3 : schéma d'émulsions multiples[11]	7
Figure I.4 : Représentation schématique des mécanismes d'instabilité dans un système d'émulsion [12]	8
Figure I.5 : Les composants d'une émulsion [15].....	9
Figure I.6 : La composition des tensioactifs.	10
Figure I.7 : Différents constituants chimiques de HEMP [42].....	17
Figure II.1 : Méthodologie expérimentale	20
Figure II.2 : Photographie des deux HEMP des deux marques Heva Pharm et IKLEF.	22
Figure II.3 : Réaction du DPPH \cdot en présence d'un antioxydant AH.	25
Figure II.4 : Schéma illustratif récapitulant le protocole d'activité antioxydant <i>in vitro</i> selon la méthode DPPH \cdot Made by BioRender.	27
Figure II.5 : Schéma illustratif décrit brièvement le protocole d'activité antibactérienne <i>in vitro</i> selon la méthode de diffusion de disque made by BioRender.	28
Figure II.6 : Les différentes étapes de la préparation de la suspension bactérienne	29
Figure II.7 : le dépôt des disques sur la gélose.	29
Figure II.8 : Schéma illustratif décrit brièvement le protocole d'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> par inhibition de la dénaturation de l'albumine.....	31
Figure II.9 : Schéma représente le protocole des différentes étapes de la formulation final de la crème.....	37
Figure III.1 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH \cdot en fonction de la concentration en acide ascorbique. -----	40
Figure III.2 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH \cdot en fonction de la concentration en HEMP-IKLEF. -----	41
Figure III.3 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH \cdot en fonction de la concentration en HEMP-Heva pharm. -----	41
Figure III.4 : Image illustrant l'activité antioxydante de l'acide ascorbique selon la méthode DPPH après incubation. -----	41
Figure III.5 : Valeurs de l'IC50 de l'acide ascorbique. -----	42
Figure III.6 : Courbe d'étalonnage du % inhibition de la dénaturation de l'albumine bovine en fonction de la concentration en Diclofénac. -----	46

Figure III.10 : Courbe d'étalonnage du % inhibition de la dénaturation de l'albumine bovine en fonction de la concentration en l'HEMP IKLEF. -----	47
Figure III.11 : Valeurs des IC50 du diclofénac et HEMP IKLEF. -----	47
Figure III.16 : Etude microscopique des deux crèmes de 1% et 0,5% de HEMP. -----	48
Figure III.17 : L'étude macroscopique des deux crèmes. -----	48
Figure III.18 : Etude de stabilité à la centrifuge des deux crèmes. -----	48
Figure III.19 : Sens d'émulsion des deux crème.-----	48
Figure III.20 : Observation microscopique des différente proportion d'Ac. -----	51
Figure III.21 : stabilité à la centri après 5,10 et 15min pour les différents proportions d'Ac.52	
Figure III.22 : sens d'émulsion des différents proportions d'Ac dans la phase aqueuse et la phase huiles. -----	52
Figure III.26 : stabilité à la centri après 15min pour les différents variations du temps d'homogénéisations. -----	53
Figure III.27 : sens d'émulsion des différents variations du temps d'homogénéisations. -----	53
Figure III.28 : Observation microscopique des différentes variations du temps d'homogénéisations. -----	53
Figure III.33 : observation de la stabilité à la centri après 10min pour les différents variation de vitesse d'homogénéisations. -----	55
Figure III.32 : observation de la stabilité à la centri après 15min pour les différents variation de vitesse d'homogénéisations. -----	55
Figure III.34 : sens d'émulsion des différents variations du temps d'homogénéisations. -----	55
Figure III.35 : Observation microscopique de différente variations de la vitesse d'homogénéisations-----	55
Figure III.36 : Formulation final avec myristate d'isopropyle.-----	58
Cette tentative s'est soldée par un échec de formation de la crème, avec séparation de phase	
Figure III.37 : indiquant une incompatibilité dans les conditions expérimentales utilisées. -----	58
Figure III.38 : Observation macroscopique juste après préparation. -----	60
Figure III.39 : Stabilité à la centrifugation pendant 15min à 10k trs/min et 60k trs/min (J0).60	
Figure III.40 : Observation microscopique (J0). -----	60
Figure III.41 : Test de déshabilité à 4°C et à 40°C après 24h. -----	60
Figure III.42 : Sens de l'émulsion (J0).-----	60
Figure III.43 : Observation microscopique (J1). -----	60
Figure III.44 : Test de déshabilité à 4°C et à 40°C après 48h. -----	60

Figure III.45 : Stabilité à la centrifugation respectivement pendant 15min à 10k trs/min et pendant 10 et 15min à 60k trs/min (J1).	60
Figure III.46 : Observation microscopique (J3).	60
Figure III.47 : Sens de l'émulsion (J3)	60
Figure III.48 : Stabilité à la centrifugation respectivement pendant 5,10 et15min à 10k trs/min (J3).	60
Figure III.49 : Stabilité à la centrifugation respectivement pendant 5,10 et 15min à 60k trs/min (J3).	60
Figure III.50 : Observation macroscopique J8.	60
Figure III.51 : Sens de l'émulsion (J8).	60
Figure III.52 : Stabilité à la centrifugation respectivement pendant 5,10 et15min à 10k trs/min et 60k trs/min (J8).	60
Figure III.53 : Observation microscopique (J8).	60

LISTE DES ABREVIATIONS

AA : Acide ascorbique

Ac : Alcool cérylique

ATCC 44028 : American Type Culture Collection (souche de référence)

BSA : Bovine Serum Albumin (Albumine sérique bovine)

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DPPH• : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

HAA : Huile d'amande amère

HE : Huile essentielle

HEMP : Huile essentielle de menthe poivrée

HLB : Hydrophile–Lipophile Balance (équilibre hydrophile-lipophile)

HLBm : HLB moyen

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %

K trs/min : 1000 tours par minute

NDJ : Type de viscosimètre (NDJ-8S)

O/W : Émulsion huile dans eau (Oil in Water)

PBS : Phosphate Buffered Saline (Tampon phosphate salin)

PI% : Pourcentage d'inhibition

RPM : Révolutions par minute (tr/min)

Span 60 : Monostéarate de sorbitan

TA : Tensioactifs

Tween 60 : Polysorbate 60

UV-Vis : Ultraviolet–Visible (spectrophotométrie UV-Visible)

Tableau I.1 : Différents systèmes d'émulsions [9] [10]	7
Tableau I.2 : Les différents rôles des tensioactifs selon leur valeur d'HLB.....	10
Tableau I.3 : La classification botanique de la menthe poivrée[40].....	16
Tableau I.4 : Les indices physico chimique de l'HEMP	16
Tableau II.1 matériel te produits utilisé.	21
Tableau II.2 : Références et familles des souches bactériennes utilisées.....	27
Tableau II.3 : Matière première utilisée dans la formulation.	32
Tableau II.5 : Composition de base des émulsions préparées.	34
Tableau II.6 : Proportions unitaires des tensioactifs et valeurs de HLBm correspondantes. .	34
Tableau II.7 : Les proportions totales de la phase huileuse, des tensioactifs et les valeurs critiques de HLB	34
Tableau II.8 : Les proportions finales de formulations finales avec huile d'amande amère et le mytistate d'isopropyle.....	36
Tableau III.1 : Caractéristiques organoleptiques.....	38
Tableau III.2 : Caractéristiques Physico-chimique HEMP	39
Tableau III.3 : DZI de l'HEMP pour les cinq souches testées.	43
Tableau III.5 : Etudes physico-chimique des deux crèmes.....	49
Tableau III.6 : Observation des études physico chimiques l'hors d'optimisation du HLB de HAA.....	50
Tableau III.7 : Observation des études physico-chimiques l'hors d'Alcool cétylique.....	52
Tableau III.8 : Observation des études physico-chimiques de différentes variations du temps d'homogénéisations du mélange.....	54
Tableau III.9 : Observation des études physico-chimiques de différentes variations de la vitesse du mélange.....	55
Tableau III.10 : Observation des études physico-chimiques de formulation final dans le temps (J0-J1-J3-J8)	57

INTRODUCTION GENERALE

Introduction

Le développement de nouvelles stratégies et formulations de crèmes constitue aujourd'hui un enjeu majeur en sciences pharmaceutiques et en innovation. En effet, les préoccupations environnementales et industrielles exigent de mettre en place des procédés de fabrication respectueux de l'environnement (chimie verte) tout en garantissant une économie de l'utilisation des matières premières. Ces approches durables ont connu un essor considérable au cours des dernières années, façonnant ainsi le paysage moderne des préparations pharmaceutiques.

Aujourd'hui au sein de l'entreprise SAIDAL, la formulation d'une crème à activité anti-inflammatoire représente un défi de taille, en raison du coût élevé des matières premières chimiques (agents de consistance et principes actifs synthétiques) et des effets indésirables qu'elles peuvent engendrer, aussi bien au niveau cutané qu'au niveau systémique.

A titre d'illustration, certains agents de consistance présentent des risques notables : le méthyl salicylate peut provoquer des dermatites chez les sujets sensibles aux salicylés, avec un potentiel toxique pouvant aller d'une toxicité aigüe à sévère [1]; l'alcool benzylique est reconnu pour son effet allergisant [2] ; et l'alcool cétylique, lorsqu'il est employé à des concentrations élevées, entraîne des irritations cutanées [3]. Quant aux principes actifs synthétiques, notamment les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), largement prescrits pour le traitement des affections inflammatoires et la douleur, ils demeurent associés à des effets secondaires graves, tels que des hémorragies gastro-intestinales ainsi que des complications cardiovasculaires et rénales[4].

Ces constats soulèvent plusieurs interrogations :

- Comment réduire le coût élevé des matières premières chimiques dans les formulations industrielles ?
- Est-il possible de limiter les impacts environnementaux et les effets indésirables cutanés et systémiques des agents de consistance et des principes actifs synthétiques dans les crèmes anti-inflammatoires ?
- Peut-on substituer les principes actifs synthétiques par des alternatives naturelles, efficaces et mieux tolérées ?

Face à cette problématique, notre étude poursuit plusieurs objectifs :

1. Optimiser une formule innovante de crème anti-inflammatoire, en réduisant la concentration en composants chimiques, afin d'améliorer à la fois la tolérance cutanée, le rapport coût-efficacité et la durabilité écologique du produit final.

2. Remplacer le principe actif synthétique par une alternative naturelle, en exploitant les propriétés biologiques de *Mentha piperita*, une plante médicinale largement répandue en Algérie, dont l'huile essentielle est réputée pour ses effets anti-inflammatoires notables.

3. Evaluer la stabilité de la formulation finale et la comparer avec une crème préparée selon le procédé industriel classique, afin de juger sa performance et sa reproductibilité.

Enfin, le présent mémoire s'articule autour d'une introduction générale, suivie de trois parties principaux et d'une conclusion générale :

Partie I : Présentation générales des crèmes et des émulsions, incluant leur définition, les principes fondamentaux de leur formulation ainsi que les principaux facteurs influençant leur stabilité. Le second chapitre est consacré à l'étude botanique de *mentha piperita*, avec une description de son huile essentielle et de ses principales propriétés biologiques.

Partie II : Présentation du matériel et des méthodes expérimentales mises en œuvre pour la réalisation de l'étude.

Partie III : Présentation, analyse et interprétation des résultats expérimentaux obtenus.

Présentation de l'organisme

Présentation de la société Group Sidal

SAIDAL est le premier laboratoire pharmaceutique producteur de médicaments génériques en Algérie. C'est une société par actions, au capital de 2 500 000 000 dinars algériens.

Fondé en 1982 pour répondre au besoin d'assurer une industrie pharmaceutique locale à même de garantir la disponibilité des médicaments et améliorer l'accès des citoyens aux traitements. SAIDAL est aujourd'hui organisé en Groupe industriel spécialisé dans le développement, la production et la commercialisation des produits pharmaceutiques à usage humain.

Cotée en bourse depuis 1999, son capital est à 80% détenu par l'Etat et les 20 % restants sont détenus par des investisseurs institutionnels et des personnes physiques.

En tant qu'acteur de santé à part entière, la mission première du groupe SAIDAL Spa consiste à améliorer la vie des patients en leur offrant une gamme riche et diversifiée de médicaments de qualité et en contribuant à améliorer l'accessibilité des traitements à travers l'adoption d'une politique tarifaire favorisant de larges couches de la société.



Figure 1 : Industrie pharmaceutique SAIDAL site DAR EL BEIDA.

Le groupe compte huit sites de production répartis à Alger, Médéa, Constantine, Annaba et Cherchell, totalisant une production annuelle moyenne de 250 millions d'unités de vente. Parmi eux, trois nouvelles unités spécialisées (El Harrach II pour les formes sèches, Cherchell et Constantine II pour sirops) ont été intégrées dans le cadre de développement.

Conscient que l'avenir de l'industrie pharmaceutique repose sur l'innovation, SAIDAL a mis en place un centre de recherche et développement implanté à Sidi Abdallah, dont la vocation est d'élaborer de nouvelles formules génériques avant leur passage à l'échelle industrielle. Dans la même dynamique, le groupe a créé l'Equival Biocenter, premier centre algérien spécialisé dans les études de bioéquivalence, situé à Hussein Dey.

Saidal a récemment obtenu la certification **ISO 9001** ; 2015, délivrée par l'organisme algérien « Vera Conformité » à la suite d'un audit fin décembre 2024.

Unité Saidal Dar El Beida, Alger

Actuellement cette usine fabrique des médicaments sous les trois formes : sèches, pâteuse et liquide. Elle comporte plusieurs locaux :

- Zone de production : nous y trouverons trois ateliers de production (formes pâteuse, liquide et sèche).
- Un laboratoire de control qualité chargée de l'analyse physico-chimique et microbiologique.
- Le magasin central.
- Station des traitements des eaux.
- Salle à chaudière, soute et bache a eau.
- Local pour groupe électrogène.
- Bloc administratifs.
- Deux postes de gardes.
- Unité de médecin de travail, cantine et vestiaire.

Présentation et description des activités du laboratoire de control qualité

Il comprend :

- Une salle d'instrumentation ; ou l'on fait l'analyse quantitative et qualitative par différentes méthodes : chromatographie liquide (HPLC), spectrophotométrie d'absorption infrarouge et spectrophotométrie d'adsorption atomique.
- Une salle de stabilité : ou l'on surveille la dégradation du médicament selon la température et l'humidité.
- Une salle de pesé.
- Un laboratoire control physico-chimique : ou l'on fait les différentes mesures (PH-conductivité...), préparations (solutions standards, dilution...) et ou les réactifs sont conservés.
- Salle des hottes.
- Un bureau de responsable de laboratoire.
- Une salle de documentation.
- Laboratoire microbiologique.
- Une salle de stockage de réactifs et de verrerie.

Partie I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE1 Généralités sur les émulsions

I. 1. Définition d'une crème pharmaceutique

Selon la définition de la Pharmacopée, les crèmes sont des préparations semi-solides multiphasiques pour application cutanée d'aspect homogène typiquement composées d'une phase lipophile et d'une phase aqueuse, dont la première est finement dispersée dans la seconde [5]. Comme tout système émulsionné, les crèmes doivent obligatoirement être stabilisées par des émulsionnants [6].

I.2. Types de crèmes pharmaceutiques

D'un point de vue galénique, les crèmes sont des émulsions. Elles peuvent être classées en :

Crème hydrophile : c'est-à-dire **L/H** où la phase externe est aqueuse. C'est une crème dite froide et doit son nom à la sensation rafraichissante qu'elle laisse après son application. Elle est décrite comme lavable [7].

Crème lipophile : c'est-à-dire **H/L** où la phase externe est lipophile. Elle est dite pommade hydrophile et généralement décrite comme étant non lavable [7].

I.3. Emulsion

Définition

Une émulsion peut être définie comme étant un système hétérogène **thermodynamiquement instable** constitué de deux phase liquides **no miscibles**, dans lequel un liquide est dispersé dans l'autre sous **fines gouttelettes** et mélangées à la l'aide d'une agitation mécanique et **d'un tensioactif** [8].

I.3.1. Différents systèmes d'émulsion

Différent type d'émulsions peuvent être distingués selon la dimension des gouttelettes présentent dans la phase dispersée qui sont classées dans le (**Tableau I.1**).

Tableau I.1 : Différents systèmes d'émulsions [9] [10]

Taille (µm, nm)	Désignation	Caractéristiques	Aspect
> 1 µm	Émulsions grossières (macroémulsions)	Ce sont des systèmes dispersés hors équilibre constitués de deux phases liquides non miscibles. Elles sont instables.	Blanc laiteux
1 à 0,1 µm	Émulsions fines (mini-émulsion)	Elles sont métastables.	Blanc bleuté (Opalescent)
< 0,1 µm	Microémulsion	Les microémulsions sont des systèmes transparents homogènes de faible viscosité qui contiennent un pourcentage élevé d'huile et d'eau et des concentrations élevées (15–25%) de mélange d'émulsifiants.	Translucide ou transparent
< 100 nm	Nanoémulsion	Elles sont thermodynamiquement stables	

I.3.2. Classification d'émulsion

Les émulsions simples [11]

Eau dans huile (E/H ou w/o) : les gouttelettes d'eau sont dispersées dans une phase huileuse continue.

Huile dans eau (H/E ou o/w) : les gouttelettes d'huile sont dispersées dans une phase aqueuse continue.

Les émulsions multiples [11]

Eau dans huile dans eau (E/H/E ou w/o/w) : une émulsion multiple où une émulsion eau dans huile est elle-même dispersée dans une phase aqueuse.

Huile dans eau dans huile (H/E/H ou o/w/o) : une émulsion multiple où une émulsion huile dans eau est elle-même dispersée dans une phase huileuse

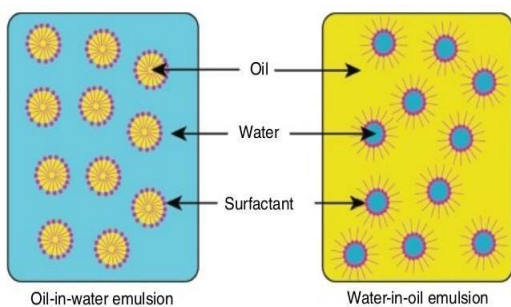


Figure I.2 : schéma d'émulsions simples[11]

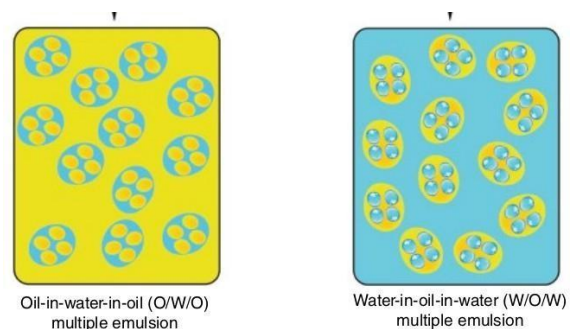


Figure I.3 : schéma d'émulsions multiples[11]

I.3.3. Instabilité des émulsions

La stabilité d'une émulsion se réfère à sa capacité à résister aux changements de ses propriétés physico-chimiques au fil du temps. Les mécanismes responsables de cette instabilité comprennent la séparation gravitationnelle (crémage/sédimentation), la floculation, la coalescence, murissement d'Ostwald, et l'inversion de phase (**Figure I.3**) [12].

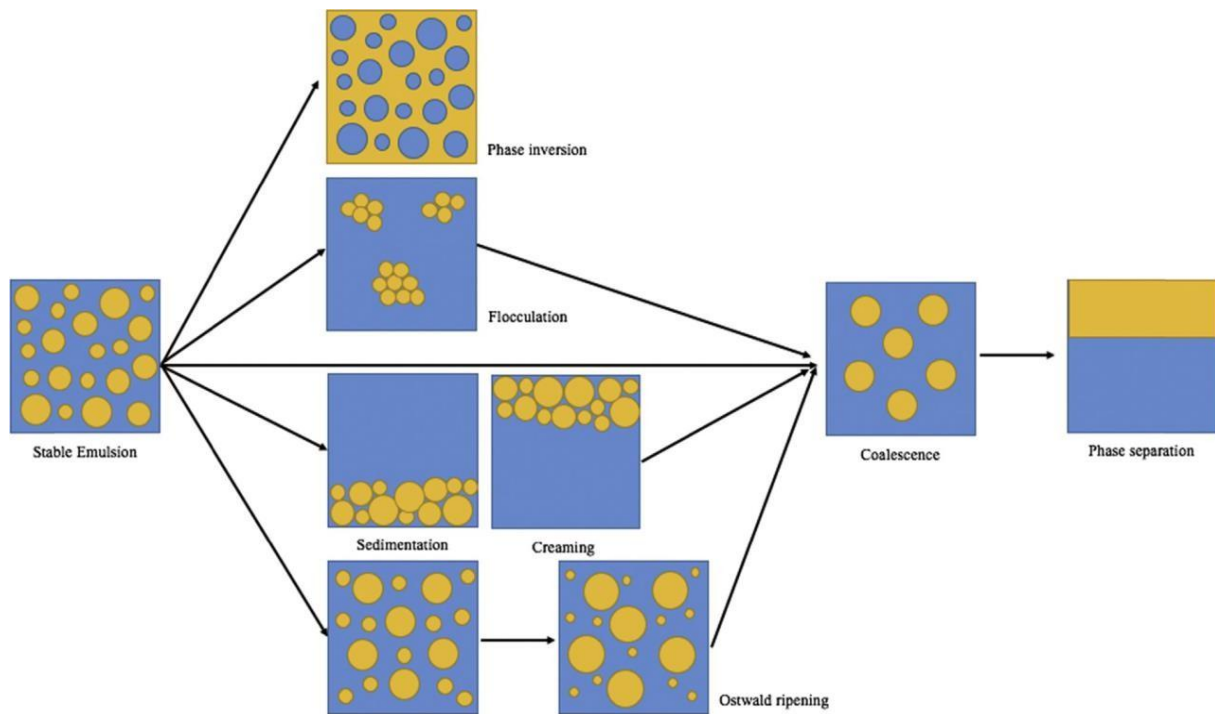


Figure I.4 : Représentation schématique des mécanismes d'instabilité dans un système d'émulsion [12]

I.3.4. Stabilité des émulsions

La stabilité d'une émulsion est un phénomène de nature cinétique, influencé par de nombreux facteurs tels que le pH, la force ionique, la viscosité ou encore la température. Néanmoins la taille des gouttelettes reste le paramètre déterminant.

La stabilité de l'émulsion dépend en grande partie des propriétés de la couche interraciale qui sépare la phase dispersée de la phase continue.

Une émulsion est considérée comme stable lorsque la distribution des gouttelettes en termes de taille et leur organisation spatiale ne subissent aucune modification significative au cours de la période d'observation [13] [14].

I.3.5. Formulation d'une émulsion

I.3.5.1. Composition d'une émulsion

La composition d'une émulsion est très importante pour assurer sa stabilité. Une émulsion est constituée d'huile, d'eau, d'émulsifiants, de co-émulsifiants, de co-tensioactifs et d'agents stabilisants, comme résumé dans la (**Figure I.4**). De nombreuses études démontrent la nécessité d'utiliser des co-émulsifiants, car une seule chaîne d'émulsifiant peut s'avérer insuffisante pour réduire efficacement la tension interfaciale dans un système émulsionné [15].



Figure I.5 : Les composants d'une émulsion [15].

Phase lipophile

La phase huileuse constitue un composant essentiel dans la formulation en raison de sa capacité à solubiliser la quantité désirée de composés actifs lipophiles. Elle peut être d'origine végétal (huile de soja), animal ou minéral (paraffine liquide) [15]. Elle est généralement composée d'un mélange d'ingrédients (cire comme cire d'abeilles, huiles comme huile végétale ou essentielle, et graisses comme beurre de Karité) [16].

Phase hydrophile

La phase aqueuse dans une émulsion est la partie composée d'eau ou de substances hydrosolubles (qui se dissolvent dans l'eau). Elle peut contenir :

De l'eau purifiée (ou distillée), des électrolytes (comme le chlorure de sodium), des agents hydrophiles (comme la glycérine, l'alcool, etc.), des conservateurs hydrosolubles, et parfois des principes actifs solubles dans l'eau [17].

Tensioactifs

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles, qui contiennent à la fois une région hydrophile polaire et une région hydrophobe non polaire. Ils se placent à l'interface des phases hydrophiles et lipophiles de l'émulsion [18]. La tête hydrophile forme des liaisons hydrogènes et ioniques avec la phase hydrophile tandis que la queue hydrophobe forme des interactions hydrophobes avec la phase lipophile [19] (Figure I.5).

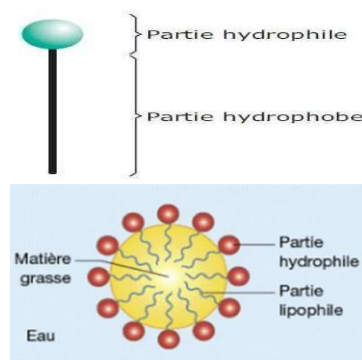


Figure I.6 : La composition des tensioactifs.

Propriété physico-chimique des tensioactifs / HLB

Le HLB ou Balance Hydrophile Lipophile est une valeur caractéristique des surfactifs qui représente l'importance de la partie hydrophile par rapport à la partie lipophile. Les tensioactifs peuvent être classés selon leur rôle à partir de leur valeur HLB, tel que représenté dans le (Tableau I.2) [19].

Tableau I.3 : Les différents rôles des tensioactifs selon leur valeur d'HLB

HLB	2 -3	3 - 6	7 - 9	8 à 16	13 à 15	15 à 18
Rôle	Antimoussant	Emulsifiant	Mouillant	Émulsifiant	Détergent	Solubilisant
		E/H		H/E		

Lorsque on utilise le mélange de deux surfactifs dans la formulation d'une émulsion (un hydrophile et l'autre lipophile) le nouvel HLB résulte des valeurs des proportions de l'un et de l'autre selon une règle d'additivité [18] :

$$HLB_{mix} = f HLB_A + (1-f) HLB_B$$

- HLB_{mix} : HLB du mélange des deux émulsifiants.
- HLB_A : HLB de l'émulsion A.
- HLB_B : HLB de l'émulsion B.
- f : c'est la fraction massique de l'émulsion A dans le mélange.
- $1-f$: c'est la fraction massique de l'émulsion B dans le mélange.

Le **HLB critique** est une notion caractéristique de l'huile. C'est la valeur que doit posséder le HLB du surfactif ou du mélange de surfactifs pour obtenir une émulsion stable avec cette huile [20].

Les additifs

Divers additifs sont incorporés dans la formulation afin d'optimiser ses propriétés sensorielles, sa stabilité ainsi que sa conservation. Parmi ces additifs, on retrouve des antioxydants, des adjuvants (aromes, colorants, conservateurs), des émoullients qui permettent d'améliorer la texture et l'étalement du produit sur la peau, rendant l'application plus agréable et les agents de consistance, quant à eux, renforcent la stabilité physique et améliorent la résistance au stress (stockage, température) et maintiennent la texture au fil du temps [21] [22] [23].

I.3.5.2. Préparation des émulsions

Préparation des phases

Les deux phases sont chauffées séparément à la même température. Cette température est déterminée par le composant ayant le point de fusion le plus élevée [24] [25].

Emulsification

Généralement, l'émulsification se décompose en deux étapes successives [26].

Une étape de dispersion-mélange que l'on appelle pré-émulsification et qui va conduire à une simple mise en suspension de gouttelettes de la phase dispersée dans la phase continue (gouttes de l'ordre de 100 μm).

Une étape d'homogénéisation dont le but est de réduire la taille des gouttes de façon à conférer à l'émulsion les propriétés requises et à la stabiliser.

Protocole expérimental

L'ordre et la méthode d'addition des composants ont une influence décisive sur le déroulement de l'émulsification et ses résultats.

Les trois techniques standard de mélanges des phases sont [27] :

Par addition : C'est la méthode classique, où la phase à disperser est lentement incorporée dans la phase continue.

Par inversion : La phase continue est versée dans la phase à disperser. Dans le cas d'une émulsion H/E (huile dans eau), la phase aqueuse est lentement mélangée à la phase lipidique. Une émulsion H/E initiale est produite, jusqu'à inversion de l'émulsion.

Par alternance : Les deux phases sont ajoutées alternativement l'une à l'autre.

I.3.6. Optimisation de la formulation d'une émulsion

Plusieurs facteurs interviennent dans l'optimisation d'une émulsion parmi ces facteurs on peut citer [27] [28] [29] :

- **Système émulsifiant optimal :**
 - Sélectionné les proportions des émulsifiants selon le HLB requis de l'huile utilisée.
 - Utilisé des proportions de co-émulsifiants les plus favorable.
 - Evaluation de leurs compatibilités, tolérance cutanée.
- **Ratio huile/eau optimal :**
 - Ajustement du pourcentage de phase huileuse pour une texture idéale et une stabilité maximale.
 - Un ratio trop élevé peut entrainer une instabilité ou une inversion de phase.
- **Optimisation du pH.**
- **Optimisation du temps d'agitation, la vitesse d'homogénéisation et la température.**

I.3.7. Contrôles qualités des émulsions

I.3.7.1. Examen macroscopique

Apprécier les caractéristiques organoleptiques : couleur – odeur – homogénéité. Cet examen visuel permet également de noter la présence de tout phénomène de dégradation : crémage, coalescence ou séparation de phase [30].

I.3.7.2. Examen microscopique

L'examen microscopique permet d'évaluer la taille des gouttelettes de la phase dispersée et l'homogénéité de leur distribution. Cette dernière doit être aussi homogène que possible. Elle peut être mesurée par microscope optique, granulométrie laser et un appareil d'Anderson [31].

I.3.7.3. Mesure du pH

A l'aide d'un pH-mètre. Il permet de suivre la stabilité physico-chimique de l'émulsion et évaluer la compatibilité cutanée à long terme [31].

I.3.7.4. Mesure de la viscosité

La viscosité de l'émulsion préparée est déterminée à l'aide d'un viscosimètre. Il permet de détecter des signes d'instabilité (coalescence, floculation...) par des variations de viscosité dans le temps et de suivre l'évolution de la structure rhéologique de l'émulsion sous l'effet de la température, ou du stockage [32].

I.3.7.5. Tests de stabilité

Essai de stabilité en temps réel

Vérifier que l'émulsion reste stable physiquement, chimiquement, microbiologiquement dans ses conditions normales de stockage sur une période prolongée.

Sédimentation dans des tubes à essai [33].

La stabilité dans des tubes à essai

La stabilité apparente d'une émulsion peut être évaluée dans une éprouvette graduée à des intervalles de temps réguliers et à différentes températures [34].

Sédimentation forcée par centrifugation

Soumettre l'émulsion à une agitation forcée à l'aide d'une centrifuge, et évaluer sa stabilité[35].

Détermination du type (sens) d'émulsion (H/E ou E/H)**Méthode de dilution**

Une émulsion H/E peut être diluée avec de l'eau, mais pas avec de l'huile. L'inverse est vrai pour une émulsion E/H [36].

Méthode de coloration

Un colorant hydrosoluble (Bleu de méthylène, bleu de bromotymol, érythrosine, etc.) et un colorant liposoluble sont ajoutés séparément à l'émulsion[36].

Emulsion + colorant hydrosoluble :

Si l'émulsion est de type H/E (huile dans eau), la coloration se répand dans toute l'émulsion.

Si l'émulsion est de type E/H (eau dans huile), la coloration ne se répand pas.

Emulsion + colorant liposoluble :

Si l'émulsion est de type E/H, la coloration se répand dans toute l'émulsion.

Si l'émulsion est de type H/E, la coloration ne se répand pas.

Test de conductivité électrique

La conductivité électrique d'une émulsion dépend de sa phase continue[36].

Les émulsions H/E conduisent l'électricité.

Les émulsions E/H sont des isolants.

Etude rhéologique

La coulabilité, l'étalement et la « seringabilité » d'une émulsion seront directement déterminées par ses propriétés rhéologiques. L'étude de comportement rhéologique passe par la réalisation d'une courbe d'écoulement ou rhéogramme [37].

Stabilité microbiologique

Recherche de contamination de germes bactériens et fongiques qui ne doivent pas se retrouver dans les préparations dermatologiques. (Surtout pour les produits sans conservateurs fort) [38].

Test de déstabilité à chaud et à froid

Évaluer la résistance de l'émulsion aux variations brutales ou répétées de température (simule ce qui pourrait arriver pendant le transport ou un mauvais stockage) [39].

Partie I

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 02 L'huile essentielle de menthe poivrée

I.4. Introduction

La menthe poivrée est une plante médicinale qui suscite un intérêt croissant de la part des industries agroalimentaire et pharmaceutique en raison de ses multiples bienfaits pour la santé humaine. Cette étude vise à présenter une description détaillée sur cette plante ainsi que les différents constituants chimiques et activité biologique associés à son huile essentielle.



I.5 .Classification botanique

La classification taxonomique constitue un repère essentiel pour situer la menthe poivrée dans l'arbre du vivant.

La menthe poivrée, connue scientifiquement sous le nom de *Mentha piperita* L., est une plante herbacée vivace aromatique, appartenant à la famille des Lamiacées. Il s'agit d'un hybride naturel issu de *M. aquatica* L. (menthe aquatique) et de *M. spicata* L. (menthe verte,). Le nom du genre *Mentha* est dérivé du grec *Mintha*, nom d'une nymphe mythologique transformée en cette plante ; le nom d'espèce *piperita* vient du latin *piper*, signifiant poivre, en référence à son goût aromatique et piquant. Elle présente les caractéristiques suivantes [41] :

Tige : Quadrangulaire, dressée ou ascendante, souvent teintée de rouge ou de pourpre, mesurant entre 30 et 90 cm de hauteur.

Feuilles : Opposées, ovales-lancéolées, pétiolées, finement dentées, de couleur vert foncé, avec une odeur forte et caractéristique.

Fleurs : Petites, de couleur violette ou rose pâle, regroupées en épis terminaux, avec un calice campanulé à cinq dents.

Fruits : Très rarement présents, car la plante est souvent stérile.

Odeur : Fortement aromatique, fraîche, caractéristique de la mentholée.

Habitat : Elle est cultivée dans les régions tempérées, notamment pour son huile essentielle riche en menthol.

Le (Tableau I.4) présente les principaux rangs hiérarchiques auxquels appartient *Mentha piperita* L.[40].

Tableau I.5 : La classification botanique de la menthe poivrée[40].

Rang taxonomique	Classification
Règne	<i>Plantae</i> (plantes)
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i> (plantes vasculaires)
Division	<i>Magnoliophyta</i> (angiospermes = plantes à fleurs)
Classe	<i>Magnoliopsida</i> (dicotylédones)
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i> (Labiées)
Genre	<i>Mentha</i>
Espèce	<i>Mentha × piperita</i> L.

I.6. Huile essentielle de menthe poivrée

Elle se présente sous la forme d'un liquide incolore à jaune pâle ou vert-jaunâtre, ayant une odeur et un goût caractéristique, suivis d'une sensation de fraîcheur. Elle est librement soluble dans l'éthanol à 70%, et la solution peut présenter une légère opalescence. L'huile est localisée principalement sur la face inférieure des feuilles, elle est extraite par distillation à la vapeur [42].

I.6.1. Evaluation physico-chimique (conformément à la pharmacopée International)

La qualité d'une HE est évaluée à travers différents paramètres physico-chimiques. Le (Tableau I.6) présente des principaux indices physiques et chimiques caractérisant l'huile essentielle de menthe poivrée[43].

Tableau I.7 : Les indices physico chimique de l'HEMP

Indices physiques	Indices chimiques
Densité relative à 20°C : 0,900 à 0,916	Indice d'acidité : maximum 1,4
Indice de refraction : 1,457 à 1,467	Indice de peroxyde : ≤ 10,0 meq O ₂ /kg
Rotation optique : de -10° à -30°	

I.6.2. Constituants chimiques

Selon les monographies de la pharmacopée Internationale les principaux constituants de L'HEMP (huile essentielle de menthe poivrée) [43] :

- **Limonène** : 1,0 – 5,0 %
- **Cinéole (1,8-cinéole)** : 3,5 – 14,0 %
- **Menthone** : 14,0 – 32,0 %
- **Menthofurane** : 1,0 – 9,0 %
- **Isomenthone** : 1,5 – 10,0 %
- **Acétate de menthyle** : 2,8 – 10,0 %
- **Isopuléol** : max. 0,2 %
- **Menthol** : 30,0 – 55,0 %
- **Pulégone** : max. 4,0 %
- **Carvone** : max. 1,0

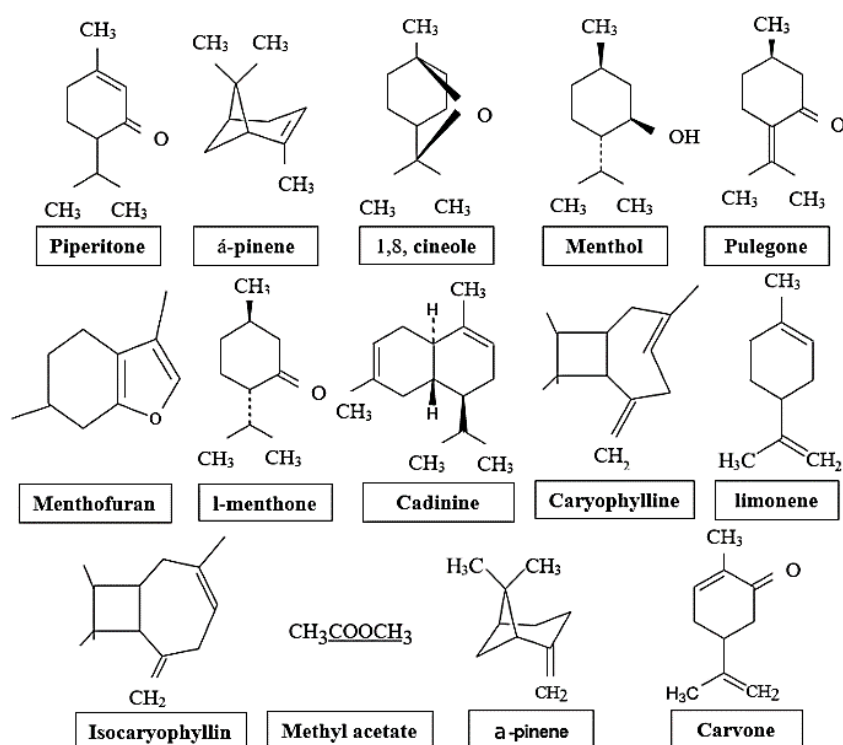


Figure I.7 : Différents constituants chimiques de HEMP [42]

I.6.3. Menthol principe actif de HEMP

Le menthol est l'un des additifs aromatisants les plus importants au monde, et constitue l'un des terpènes les plus efficaces pour améliorer la pénétration cutanée des principes actifs pharmaceutiques [44]. Il est précieux en raison de son parfum mentholé rafraîchissant qu'ils confèrent aux plantes. Il joue un rôle essentiel en raison de ses nombreuses propriétés biologiques : activités anti-oxydante, antimicrobienne, anticancéreuse, anti-inflammatoire [45] et antifongique [44]. Le menthol occupe une place importante en médecine, notamment dans le traitement des troubles gastro-intestinaux ainsi que pour le soulagement des maux de tête. Grâce

à ses propriétés antiseptiques, il est également utilisé pour traiter l'inflammation gingivale, l'herpès buccal et les douleurs dentaires (odontalgie) [46].

I.6.4. Propriétés médicinales de l'HEMP

I.6.4.1. Activité anti-oxydante

Un antioxydant est toute substance capable de retarder ou d'inhiber l'oxydation des substrats biologiques. Leur rôle principal est de protéger les cellules contre le stress oxydatif induit par les radicaux libres, considérés comme l'une des principales causes du processus de vieillissement [46] et des maladies chroniques et dégénératives telles que l'athérosclérose, le cancer, le diabète et l'Alzheimer [47]. La menthe poivrée de son côté représente également une excellente source d'antioxydants, tout comme l'acide ascorbique (Vitamine C), Vitamine E et le bêta-carotène [48].

I.6.4.2. Activité anti-inflammatoire

L'HEMP réduit l'inflammation excessive et les lésions de type dermatite atopique (eczéma sévère) en bloquant une voie biochimique très importante dans la réponse inflammatoire ERK-NF- κ B ce qui freine la production de médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans ces maladies. Elle incite en parallèle la production de cytokines anti-inflammatoire qui calment l'inflammation [47].

I.6.4.3. Activité antibactérienne

L'HEMP se révèle particulièrement efficace contre les bactéries, en raison de sa richesse en monoterpènes oxygénés (92,95 %), des composés reconnus pour leur forte efficacité et leur large spectre d'activité antibactérienne [49].

I.6.4.4. Activité antifongique

L'HEMP présente une activité antifongique significative contre les levures et champignons et cela est due à la présence du menthol et menthone comme constituants chimique majeurs [50].

I.7. Conclusion

L'examen de la littérature met en évidence l'importance des crèmes pharmaceutiques en tant que systèmes émulsionnés largement utilisés pour l'administration topique. Toutefois, l'utilisation de matières premières chimiques, qu'il s'agisse des agents de consistance ou des principes actifs synthétiques tels que les AINS, demeure associée à des contraintes économiques, toxicologiques et environnementales non négligeables.

Parallèlement, les huiles essentielles d'origine végétale, et plus particulièrement celle de *Mentha piperita*, apparaissent comme des alternatives prometteuses. Riches en composés bioactifs, elles se distinguent par leurs propriétés biologiques notamment anti-inflammatoires et leur meilleure tolérance cutanée, tout en s'inscrivant dans une dynamique de valorisation des ressources naturelles locales et de respect de principes de la chimie verte.

Néanmoins, leur incorporation dans des systèmes émulsionnés impose de relever certains défis liés à la stabilité physico-chimique. Ces constats soulignent la nécessité d'explorer de nouvelles stratégies de formulation permettant de concilier efficacité thérapeutique, sécurité d'emploi, viabilité économique et durabilité environnementale.

C'est dans cette perspective que s'inscrit le chapitre II, dont l'objectif ultime est de développer une crème anti-inflammatoire innovante à base d'huile essentielle de *Mentha piperita*, en optimisant le système émulsionnant et en évaluant la stabilité de la formulation proposée comparativement à une autre crème déjà préparée selon le procédé utilisé en industrie pharmaceutique.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Bell, A. J., & Duggin, G. (2002). Acute methyl salicylate toxicity complicating herbal skin treatment for psoriasis. *Emergency Medicine*, *14*(2), 188-190.
- [2] Curry, E. J., & Warshaw, E. M. (2005). Benzyl alcohol allergy: importance of patch testing with personal products. *DERM*, *16*(4), 203-208.
- [3] Heldreth, B., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D., ... & Andersen, F. A. (2012). Final report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel on the safety assessment of methyl acetate. *International journal of toxicology*, *31*(4_suppl), 112S-136S.
- [4] Kehili, S., Boukhatem, M. N., Belkadi, A., Ferhat, M. A., & Setzer, W. N. (2020). Peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil as a potent anti-inflammatory, wound healing and anti-nociceptive drug. *European Journal of Biological Research*, *10*(2).
- [5] Daniels, R., & Knie, U. (2007). Galenics of dermal products—vehicles, properties and drug release. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, *5*(5), 367-383.
- [6] Liu, Y., Wu, Q., Zhang, J., Yan, W., & Mao, X. (2024). Food emulsions stabilized by proteins and emulsifiers: A review of the mechanistic explorations. *International Journal of Biological Macromolecules*, *261*, 129795.
- [7] Allen, L. V., Ansel, H. C., & Popovich, N. G. (2011). Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. *Evaluation*, *56*, 44.
- [8] Costa, C., Medronho, B., Filipe, A., Mira, I., Lindman, B., Edlund, H., & Norgren, M. (2019). Emulsion formation and stabilization by biomolecules: The leading role of cellulose. *Polymers*, *11*(10), 1570.
- [9] Tartaro, G., Mateos, H., Schirone, D., Angelico, R., & Palazzo, G. (2020). Microemulsion microstructure (s): A tutorial review. *Nanomaterials*, *10*(9), 1657.
- [10] Ruckenstein, E. (1999). Thermodynamic insights on macroemulsion stability. *Advances in colloid and interface science*, *79*(1), 59-76.
- [11] Nour, A. H. (2018). Emulsion types, stability mechanisms and rheology: A review. *International Journal of Innovative Research and Scientific Studies (IJIRSS)*, *1*(1).
- [12] Hu, Y. T., Ting, Y., Hu, J. Y., & Hsieh, S. C. (2017). Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems. *Journal of food and drug analysis*, *25*(1), 16-26.
- [13] Jouanny-Bouyer, E. J. (2011). *Stabilisation d'émulsions d'intérêt pharmaceutique par des protéines et des polysaccharides: exemples de la β -lactoglobuline, de la gomme arabique et de la gomme xanthane* (Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI).

Références bibliographiques

- [14] Walstra, P. I. E. T. E. R. (1996). Emulsion stability. *Encyclopedia of emulsion technology*, 4, 1-62.
- [15] Raviadaran, R., Muthoosamy, K., & Manickam, S. (2018). Simple and multiple emulsions emphasizing on industrial applications and stability assessment. In *Food process engineering and quality assurance* (pp. 179-230). Apple Academic Press.
- [16] Schubert, H., & Engel, R. (2004). Product and formulation engineering of emulsions. *Chemical Engineering Research and Design*, 82(9), 1137-1143.
- [17] Brochette, P. (1999). Emulsification. Elaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 2(J2150), J2150-1.
- [18] Kruglyakov, P. M. (2000). *Hydrophile-lipophile balance of surfactants and solid particles: physicochemical aspects and applications* (Vol. 9). Elsevier.
- [19] Ghosh, S., Ray, A., & Pramanik, N. (2020). Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, 265, 106429.
- [20] Egito, E. S. T., Machado, L. A., Farias, I. E., Silva, K. G. H., & Oliveira, A. G. (2018). HLB Concept: a way to never forget it. *Biomedical Journal*, 1, 2.
- [21] Poddębniak, P., & Kalinowska-Lis, U. (2024). A survey of preservatives used in cosmetic products. *Applied Sciences*, 14(4), 1581.
- [22] Simoes, A., Veiga, F., Vitorino, C., & Figueiras, A. (2018). A tutorial for developing a topical cream formulation based on the quality by design approach. *Journal of pharmaceutical sciences*, 107(10), 2653-2662.
- [23] Manchanda, S., Chandra, A., Bandopadhyay, S., Deb, P. K., & Tekade, R. K. (2018). Formulation additives used in pharmaceutical products: emphasis on regulatory perspectives and GRAS. In *Dosage form design considerations* (pp. 773-831). Academic Press.
- [24] Reiner, J., Ly, T. T., Liu, L., & Karbstein, H. P. (2022). Melt emulsions: influence of the cooling procedure on crystallization and recrystallization of emulsion droplets and their influence on dispersion viscosity upon storage. *Chemie Ingenieur Technik*, 94(3), 356-364.
- [25] Yordi, E. G., Guaman, I. S. G., Fuentes, M. E. F., Radice, M., Scalvenzi, L., Abreu-Naranjo, R., ... & Martínez, A. P. (2025). Conceptual Design of the Process of Making Cosmetic Emulsion.
- [26] Siva, S. P., Kow, K. W., Chan, C. H., Tang, S. Y., & Ho, Y. K. (2019). Prediction of droplet sizes for oil-in-water emulsion systems assisted by ultrasound cavitation: transient scaling law based on dynamic breakup potential. *Ultrasonics sonochemistry*, 55, 348-358.

Références bibliographiques

- [27] Doutsis, M., Vlachou, M. C., Koukiotis, C., Kostoglou, M., & Karapantsios, T. D. (2025). Experimental Investigation of Stability of Emulsions Produced by Catastrophic Phase Inversion Using Non-Ionic Surfactants. *Colloids and Interfaces*, 9(1), 6.
- [28] Yordi, E. G., Guaman, I. S. G., Fuentes, M. E. F., Radice, M., Scalvenzi, L., Abreu-Naranjo, R., ... & Martínez, A. P. (2025). Conceptual Design of the Process of Making Cosmetic Emulsion.
- [29] Emami, J., Pourmashhadi, A., Sadeghi, H., Varshosaz, J., & Hamishehkar, H. (2015). Formulation and optimization of celecoxib-loaded PLGA nanoparticles by the Taguchi design and their in vitro cytotoxicity for lung cancer therapy. *Pharmaceutical development and technology*, 20(7), 791-800.
- [30] Shkreli, R., Terziu, R., Memushaj, L., & Dhano, K. (2022). Formulation and stability evaluation of a cosmetics emulsion loaded with different concentrations of synthetic and natural preservative. *Journal of Biological Studies*, 5(1), 38-51.
- [31] Stabrauskiene, J., Mazurkevičiūtė, A., Majiene, D., Balanaskiene, R., & Bernatoniene, J. (2025). Development and Evaluation of an Anti-Inflammatory Emulsion: Skin Penetration, Physicochemical Properties, and Fibroblast Viability Assessment. *Pharmaceutics*, 17(7), 933.
- [32] Shafiei, M., Kazemzadeh, Y., Martyushev, D. A., Dai, Z., & Riazi, M. (2023). Effect of chemicals on the phase and viscosity behavior of water in oil emulsions. *Scientific reports*, 13(1), 4100.
- [33] Querol, N., Barreneche, C., & Cabeza, L. F. (2017). Storage stability of bimodal emulsions vs. monomodal emulsions. *Applied Sciences*, 7(12), 1267.
- [34] Doutsis, M., Vlachou, M. C., Koukiotis, C., Kostoglou, M., & Karapantsios, T. D. (2025). Experimental Investigation of Stability of Emulsions Produced by Catastrophic Phase Inversion Using Non-Ionic Surfactants. *Colloids and Interfaces*, 9(1), 6.
- [35] Kräenbring, M. A., Ozcan, F., & Segets, D. (2024). Analyzing Emulsion Dynamics via Direct Visualization and Statistical Methodologies. *ACS omega*, 9(37), 39253-39258.
- [36] Sinko, P. J. (2023). *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences*. Lippincott Williams & Wilkins.
- [37] Barnes, H. A., Hutton, J. F., & Walters, K. (1989). *An introduction to rheology* (Vol. 3). Elsevier.
- [38] Ratajczak, M., Kubicka, M. M., Kamińska, D., Sawicka, P., & Długaszewska, J. (2015). Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3), 303-307.

Références bibliographiques

- [39] Aulton, M. E., & Taylor, K. (Eds.). (2013). *Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines*. Elsevier Health Sciences.
- [40] Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., Tortajada, M., ... & Ji, P. (2019). Chemical composition and antioxidant properties of essential oils from peppermint, native spearmint and scotch spearmint. *Molecules*, 24(15), 2825.
- [41] Loolaie, M., Moasefi, N., Rasouli, H., & Adibi, H. (2017). Peppermint and its functionality: A review. *Arch Clin Microbiol*, 8(4), 54.
- [42] Ibrahim, M., Ankwai, G. E., Gungshik, J. R., & Taave, P. (2021). Comparative extraction of essential oils of *Mentha piperita* (mint) by steam distillation and enfleurage. *Nigerian Journal of Chemical Research*, 26(2), 56-62.
- [43] Taherpour, A. A., Khaef, S., Yari, A., Nikeafshar, S., Fathi, M., & Ghambari, S. (2017). Chemical composition analysis of the essential oil of *Mentha piperita* L. from Kermanshah, Iran by hydrodistillation and HS/SPME methods. *Journal of Analytical Science and Technology*, 8(1), 11.
- [44] Skalicka-Woźniak, K., & Walasek, M. (2014). Preparative separation of menthol and pulegone from peppermint oil (*Mentha piperita* L.) by high-performance counter-current chromatography. *Phytochemistry Letters*, 10, xciv-xcviii.
- [45] ROZZA, Ariane Leite, DE FARIA, Felipe Meira, BRITO, Alba Regina Souza, *et al.* The gastroprotective effect of menthol: involvement of anti-apoptotic, antioxidant and anti-inflammatory activities. *PloS one*, 2014, vol. 9, no 1, p. e86686.
- [47] Farnad, N., Heidari, R., & Aslanipour, B. (2014). Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint (*Mentha piperita*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8(2), 113-121.
- [48] Zhao, H., Ren, S., Yang, H., Tang, S., Guo, C., Liu, M., ... & Xu, H. (2022). Peppermint essential oil: Its phytochemistry, biological activity, pharmacological effect and application. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 154, 113559.
- [49] Floare, A. D., Dumitrescu, R., Alexa, V. T., Balean, O., Szuhaneck, C., Obistioiu, D., ... & Galuscan, A. (2023). Enhancing the antimicrobial effect of ozone with *Mentha piperita* essential oil. *Molecules*, 28(5), 2032.
- [50] Desam, N. R., Al-Rajab, A. J., Sharma, M., Mylabathula, M. M., Gowkanapalli, R. R., & Albratty, M. (2019). Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha* × *Piperita* L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University-Science*, 31(4), 528-533.

Références bibliographiques

Partie II

Matériel et Méthodes

II.1. Objectifs

Cette partie a pour objectif la caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle de menthe poivrée ainsi que l'évaluation de ses principales activités biologiques, notamment l'activité antioxydante, antimicrobienne et anti-inflammatoire. Elle inclut également la formulation, l'optimisation des paramètres technologiques de l'émulsion (HLB, co-émulsifiant, temps et vitesse d'homogénéisation) et l'évaluation de la stabilité d'une crème thérapeutique anti-inflammatoire, incorporant cette huile essentielle comme principe actif.

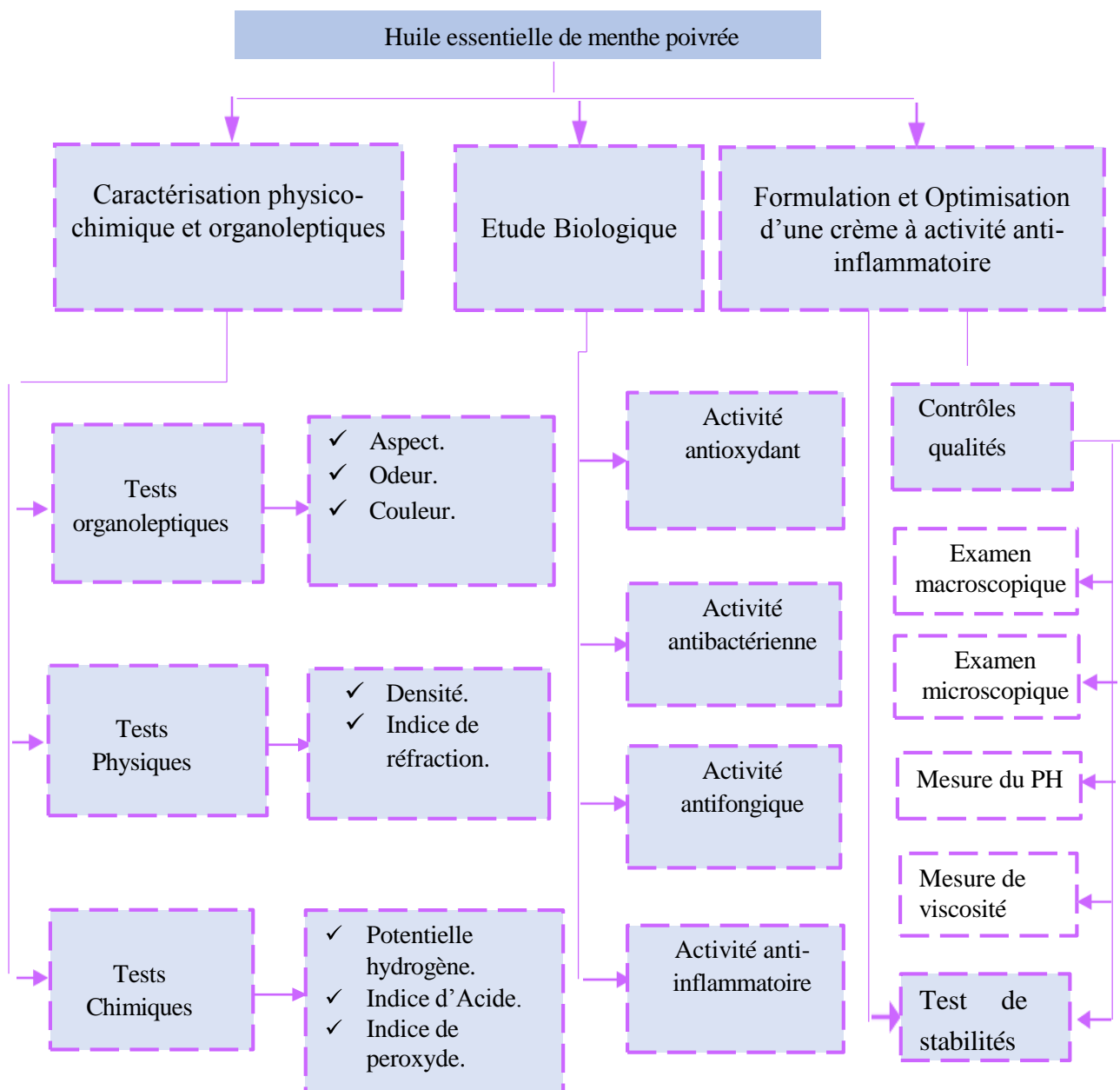


Figure II.1 : Méthodologie expérimentale

II.2. Matériel

Le matériel et produits utilisés sont regroupés dans le (**Tableau II.1**).

Tableau II.1 : Matériel et produits utilisés.

Etapas	Équipements & Matériel
Caractérisation physico- chimiques	Balance analytique Refractomètre. Papier pH. Agitateur magnétique Plaque chauffante Hotte
Etude de l'activité antioxydante	Spectrophotomètre UV marque SHIMADZU mini-1240 Vortex
Étude de l'activité Antimicrobienne	Écouvillons stériles Hotte à flamme lamineux Pince Bec benzène. Disques antibiogramme Etuve Densimètre McFarland de la marque biosan modèle DEN-18 Pied à coulisse Incubateur Blinder Balance de précision
Etude de l'activité anti-inflammatoire	Spectrophotomètre UV Agitateur magnétique Thermomètre PH-mètre
Formulation (crème)	Agitateur à hélice de la marque/modèle : Heidolph/ RZR 2021 Support élévateur

Balance analytique

Centrifugeuse

Microscope optique de marque/model

PHYWE équipé d'un oculaire WF

10X/18mm

Viscosimètre de marque/modèle NDJ-8S

(Série NDJ), équipé d'un rotor n°3 réglé à

une vitesse de rotation 12 RPM

Etuve : Memmert

Réfrigérateur

II.3. Méthodes

II.3.1. Caractérisations organoleptiques et Physico-chimiques

Dans cette caractérisation deux marques différentes de HEMP ont été utilisées : IKLEF et Heva Pharm.



Figure II.2 : photographie des deux HEMP des deux marques Heva Pharm et IKLEF.

II.3.1.1. Caractérisations organoleptiques

L'évaluation des propriétés organoleptiques représente généralement une étape essentielle dans les études portant sur les facteurs influençant la qualité d'une huile essentielle. Dans le cadre de ce travail, trois critères ont été retenus pour évaluer la qualité organoleptique : l'odeur, la couleur et l'aspect.

II.3.1.2. Tests physiques

II.3.1.2.1. Densité relative

La densité relative d'une huile essentielle est le rapport de sa masse volumique à la masse volumique d'un corps pris comme référence, de l'eau distillée à 20°C [1].

Procédure

Le pycnomètre est soigneusement nettoyé puis rincé.

Une fois l'équilibre thermique avec la salle de balance atteint, le pycnomètre vide est pesé.

Il est ensuite rempli d'eau distillée et pesée de nouveau.

Après avoir été vidé, rincé et séché, le pycnomètre est rempli avec l'huile puis pesé.

Cette grandeur est sans dimension. Elle est calculée selon la formule suivante[1] :

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : masse du pycnomètre vide (en g).

m_1 : masse du pycnomètre rempli d'eau (en g).

m_2 : masse du pycnomètre rempli d'HE (en g).

II.3.1.2.2. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est défini selon la norme (NFT 60 212) par le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide à une longueur d'onde définie et la vitesse de propagation dans la substance. C'est un paramètre qui indique le degré d'insaturation des acides gras entrant dans la composition des matières grasses. Il est mesuré à l'aide d'un réfractomètre d'Abbe [2].

II.3.1.3. Tests chimiques

II.3.1.3.1. Potentielle hydrogène pH

Dépourvu d'unité, le potentiel hydrogène, désigné par le pH, constitue une grandeur permettant de mesurer l'activité chimique de l'ion hydrogène au sein d'une solution. Par ailleurs, le pH révèle le degré d'acidité ou de basicité d'une solution, indiquant ainsi si celle-ci est acide, basique ou neutre [3].

II.3.1.3.2. Indice d'acide

L'indice d'acide I_a est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g d'huile essentielle [4].

Procédé

Verser 20mL d'éthanol à 95%, 0,5g d'HE et deux gouttes de phénophtaléine dans un erlenmeyer.

Ajouter progressivement une solution alcoolique de KOH (0,1M) jusqu'à apparition d'une coloration rose persistante.

L'indice d'acide est calculé par la formule suivante[4] :

$$\mathbf{I.A} = \frac{56,11 \times V \times N}{m}$$

D'où :

- N : normalité de la solution KOH (en mol/L)
- V : volume consommé de KOH (en ml)
- m : masse d'HE (en g)
- 56,11 : masse molaire de KOH (g/mol)

II.3.1.3.3. Indice de peroxyde

Cet indice mesure le nombre d'atome d'oxygène actifs présents dans les chaînes organiques d'une substance grasse et permet d'évaluer le degré d'oxydation des acides gras insaturés. Plus l'indice est élevé, plus la graisse est oxydée [5].

Procédé

- Peser 1g HE dans un flacon de 250ml.
- Ajouter 10 mL de chloroforme et 15 mL d'acide acétique, puis immédiatement 1mL d'une solution saturée d'iodure de potassium.
- Ajouter 10 mL de chloroforme et 15 mL d'acide acétique, puis immédiatement 1mL d'une solution saturée d'iodure de potassium.
- Agiter pendant 1 minute et laisser reposer dans l'obscurité pendant 5 minutes.
- Ajouter 75mL d'eau distillée en agitant vigoureusement, puis quelques gouttes d'amidon (solution aqueuse à 1%).
- Titrer avec une solution de thiosulfate de sodium (0,01N).

L'indice de peroxyde (IP) est calculé par la formule suivante [5]:

$$\mathbf{IP} = \frac{(V-V_0) \times 10}{m}$$

Avec :

- V_0 : volume de thiosulfate utilisé pour l'essai à blanc (mL)
- V : volume de thiosulfate de sodium utilisé pour la prise d'essai en (mL)
- m : prise d'essai en gramme

II.3.2. Etude des activités biologiques

II.3.2.1. Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée selon la méthode DPPH.

Ce test permet de mettre en évidence de façon relativement simple le pouvoir anti radicalaire d'un antioxydant ou d'un extrait antioxydant. Cette méthode mesure la capacité réductrice d'un antioxydant en présence d'un radical libre, le DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). C'est un radical libre très stable à l'état cristallin et en solution, de coloration violette, présentant une bande d'adsorption maximale à 515 nm dans le méthanol. La réduction du radical DPPH[•] par un donneur d'atome H (AH) conduit à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl incolore (DPPH-H) et au radical A[•] (**Figure II.3**). Plus un composé aura de facilité à céder son atome d'hydrogène, plus celui-ci sera jugé efficace en tant qu'antioxydant[6]. Le potentiel donneur d'un atome d'hydrogène d'un échantillon est le plus souvent exprimé par le paramètre IC₅₀, qui correspond à la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la concentration initial de DPPH[•] [7]. Plus l'IC₅₀ est petite, plus la molécule est antioxydante[8].

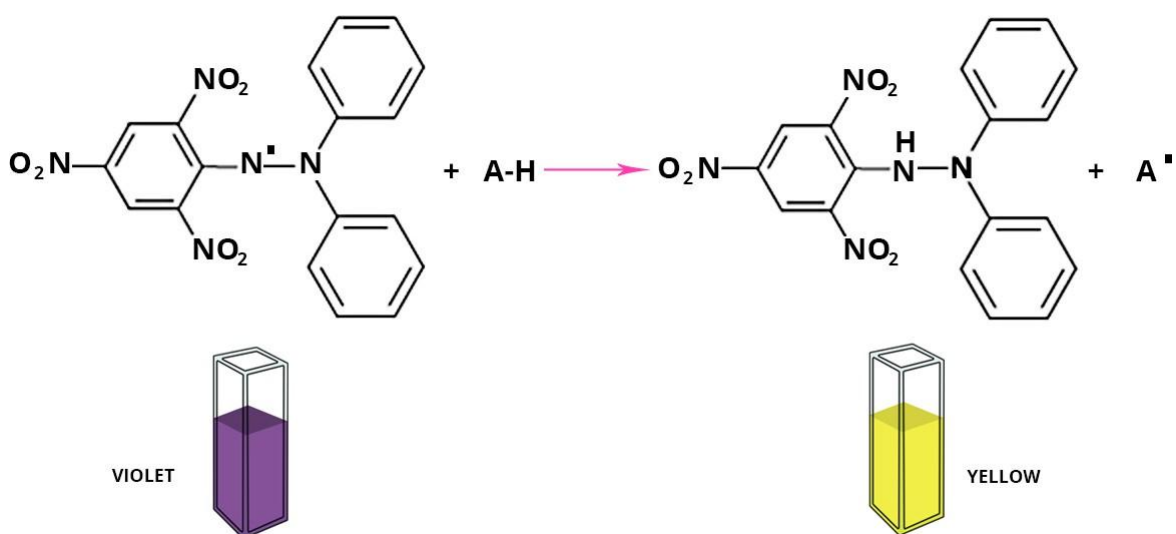


Figure II.4 : Réaction du DPPH[•] en présence d'un antioxydant AH.

Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti radicalaire de l'échantillon. Suivant la relation suivante[6] :

$$\% \text{ Taux d'inhibition} = \left(\frac{\text{Abs du control négative} - \text{Abs de l'échantillon}}{\text{Abs du control négative}} \right) \times 100$$

Mode opératoire :

Le protocole suivi est issu d'une méthode décrite dans la littérature [9]. Avec de légères modifications apportées l'hors de la préparation des concentrations des échantillons.

Préparation de la solution DPPH:

Une solution de DPPH à 40 µg/mL a été préparée en dissolvant précisément **8 mg de DPPH** dans **200 mL de méthanol**. La solution a été conservée à l'abri de la lumière pour éviter toute dégradation.

Préparation des solutions d'échantillons et références

Des solutions de HEMP ont été préparées dans le méthanol aux concentrations suivantes : 4 ; 2 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 mg/mL par dilution sériée. Un volume de 2 mL a été préparé pour chaque concentration. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard de référence. Les concentrations suivantes ont été préparées dans le méthanol : 2 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,0625 ; 0,03125 ; 0,0156 mg/mL.

Procédure expérimentale

Tous les essais ont été réalisés en **triplicata**. Dans des tubes à essai propres et secs, **100 µL** de chaque solution (échantillon ou standard) ont été ajoutés à **2 mL** de la solution de DPPH. Après agitation douce, les tubes ont été incubés à **température ambiante, à l'obscurité, pendant 60 minutes**.

Un **contrôle négatif** a été réalisé en remplaçant l'échantillon par 100 µL de **DPPH**.

Un **blanc** a été préparé en mélangeant 2 mL de méthanol avec 100 µL de solvant, afin de corriger l'absorbance de fond.

Lecture et traitement des données

Près incubation, l'absorbance de chaque mélange a été mesurée à **517 nm** à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité radicalaire a été calculé selon la formule suivante [9] :

$$\% \text{ Taux d'inhibition} = \left(\frac{-A}{A_0} \right) \times 100$$

Où :

- A_0 représente l'absorbance du control négative (DPPH Seul).
- A est l'absorbance de l'échantillon testé.

Les résultats obtenus ont été utilisés pour tracer la courbe d'inhibition en fonction des concentrations, permettant ainsi de déterminer la **concentration inhibitrice à 50 % (IC₅₀)** en utilisant la courbe de régression linéaire. Le protocole expérimental suivi est résumé dans le schéma de la (Figure II.5).

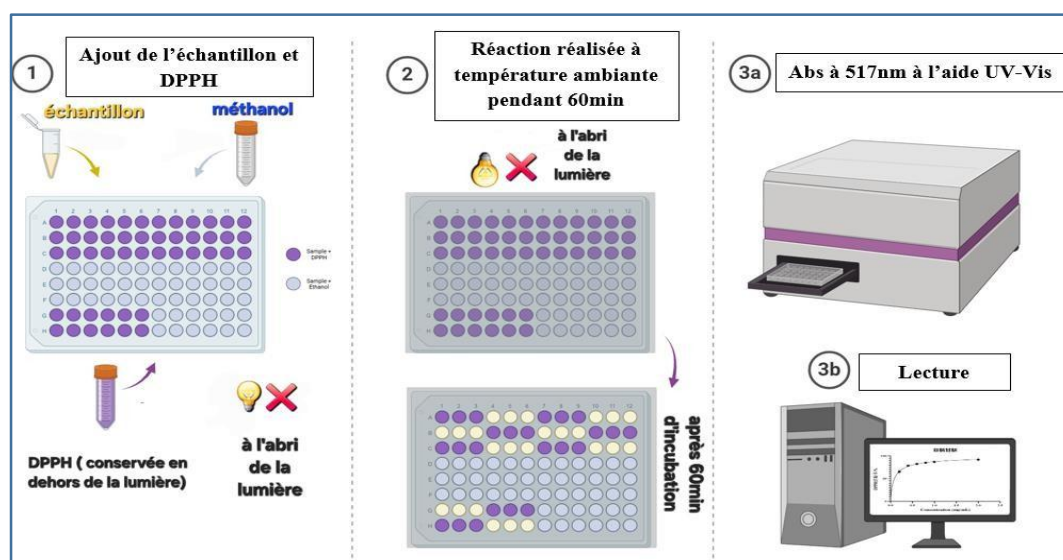


Figure II.6 : Schéma illustratif récapitulant le protocole d'activité antioxydant in vitro selon la méthode DPPH. Made by BioRender.

II.3.2.2. Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée selon la méthode des aromatoigrammes, basées sur la diffusion sur disques en milieu gélosé. Les essais ont été effectués au sein de laboratoire microbiologique –control qualité physico-chimique –de l'unité pharmaceutique SAIDAL, L'expérimentation a été réalisée le lundi 24 mars 2025 dans des conditions de laboratoire contrôlées : température de 22,6 °C et humidité relative de 50,4 %.

Matières premières utilisées

Les souches bactériennes sont représentées dans le (Tableau II.2).

Tableau II.3 : Références et familles des souches bactériennes utilisées.

Souche	Gram	Référence	Famille
<i>Escherichia Coli</i>	(-)	ATCC 8739	Enterobacteriaceae [10]
<i>Staphylococcus aureus</i>	(+)	ATCC 6538	Staphylococcaceae [11]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)	ATCC 9027	Pseudomonadaceae [12]

<i>Bacillus spizizenii</i>	(+)	ATCC 6633	Bacillaceae [13]
<i>Salmonella enterica</i>	(-)	ATCC 44028	Enterobacteriaceae [14]

Méthode de diffusion du disque

L'évaluation technique de l'activité antibactérienne des HE est l'aromatogramme, semblable à l'antibiogramme qui permet de tester les antibiotiques, appelée « méthode des disques » (**Figure II.8**).

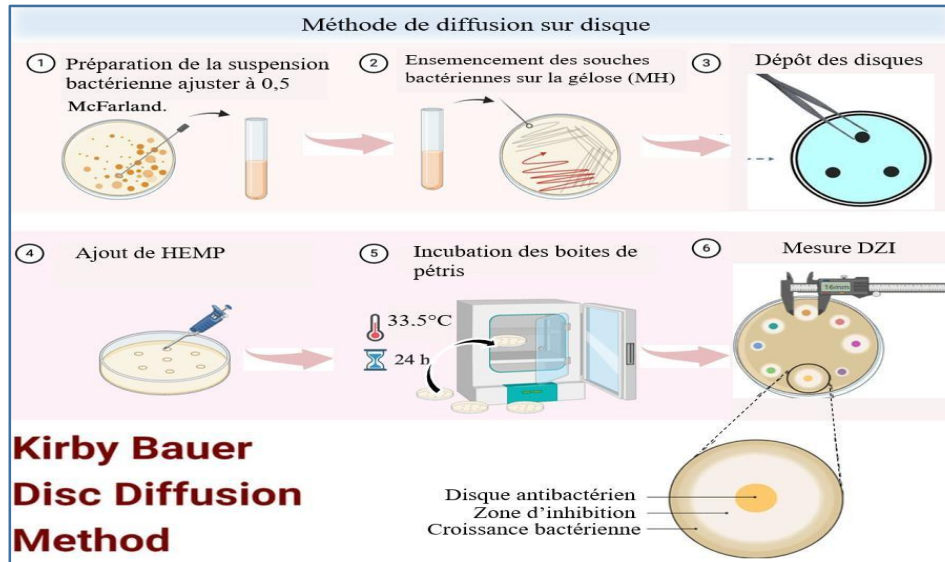


Figure II.7 : Schéma illustratif décrit brièvement le protocole d'activité antibactérienne in vitro selon la méthode de diffusion de disque made by BioRender.

La suspension microbienne est d'abord inoculée et ensemencée en surface sur milieu gélosé en boîte de Pétri. Un disque de papier-filtre de 6mm de diamètre, imbibé d'HE diluée dans le solvant (15µL), est plaqué sur la surface de la gélose ensemencée et les boîtes de Pétri sont alors incubées dans les conditions optimales de température et de temps du micro-organisme considéré. Pendant l'incubation, les germes se développent sous forme de colonies visibles à l'œil nu [15]. L'obtention d'un halo clair autour du disque indique l'inhibition du développement microbien. Le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré en millimètre, incluant le diamètre du disque. Deux témoins sont réalisés dans les mêmes conditions opératoires : un témoin négatif avec le solvant ayant servi à la solubilisation des HE, et un disque d'antibiotique comme témoin positif [16].

Protocole expérimental

Préparation de la suspension bactérienne

- A l'aide d'un écouvillon stérile prélever une colonie fraîche de la souche bactérienne (1) la suspendre dans un tube à essai (2) contenant de l'eau purifiée puis agiter bien (3).

- Ajuster la densité optique à 0,5 McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/ml) en comparant avec un standard McFarland (4).

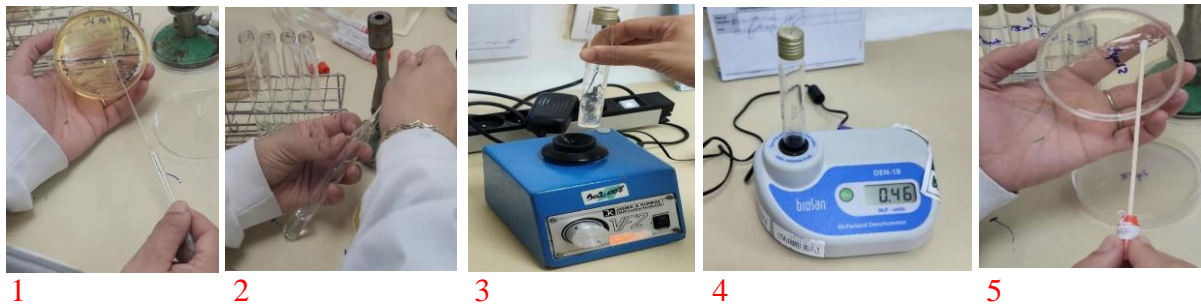


Figure II.9 : Les différentes étapes de la préparation de la suspension bactérienne

- La méthode de préparation est reproduite pour les 05 souches.

Ensemencement des boîtes de pétri

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- Ensemencer uniformément la surface du milieu Muller-Hinton par étalement selon trois directions pour assurer une bonne répartition (5) :
 - Premier passage en zigzag vertical.
 - Deuxième passage en zigzag horizontal.
 - Troisième en diagonal pour couvrir toute la surface.
- Laisser sécher quelques minutes à température ambiante avant de poser les disques.

Préparation des disques imprégnés de HEMP

- Stériliser les disques antibiogrammes vierges sous hotte à flux laminaire UV.
- Préparer une solution d'HEMP 300mg dans 3mL de DMSO et agiter bien.
- Ensuite à l'aide d'une micropipette imprégner chaque disque avec 20 μ L de la solution d'HE.
- Laisser sécher à température ambiante sous condition stériles.

Dépôt des disques sur le milieu

- A l'aide d'une pince stérile, déposer les disques imprégnés d'HE sur la surface du milieu ensemencé.
- Exercer une légère pression pour assurer un bon contact avec la gélose.
- Laisser sécher à température ambiante sous conditions stériles.



Figure II.10 : le dépôt des disques sur la gélose.

Incubation

- Incuber les boîtes à 33,5°C pour pendant 24heures en position inversée.

Après incubation l'activité antibactérienne a été déterminée de manière qualitative à l'aide de cette méthode en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible [17] :

- Résistante : diamètre inférieur à 8mm.
- Sensible : diamètre compris entre 9 et 14mm.
- Très sensible : diamètre compris entre 15 et 19mm.
- Extrêmement sensible : diamètre supérieur à 20mm.

II.3.2.3. Activité antifongique

L'activité antifongique a été évaluée en utilisant la même méthode que celle utilisée pour l'activité anti bactérienne et dans des conditions expérimentales similaires. Quelques légères modifications en toutefois été apportées, notamment le remplacement du milieu de culture par un milieu Sabouraud, plus adapté à la croissance des champignons *Candida albicans* ATCC44028 [18], ainsi qu'une incubation à 22,5 °C pendant 48heures.

II.3.2.4. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée in vitro selon la méthode d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA), en suivant un protocole adapté de celui décrit par la littérature [19] avec quelque modification.

Protocole expérimental :

Préparation du tampon PBS (pH = 6,4)

Un tampon PBS (phosphate buffered saline) a été préparé avec les concentrations suivantes, dissoutes dans 1 L d'eau distillée : NaCl (8g), KCl (0,2g), Na₂HPO₄ (0,68g), KH₂PO₄ (0,98g). Le pH a été ajusté à 6,4 à l'aide du HCl.

Préparation des solutions échantillons, références et BSA

Des solutions de HEMP et Diclofénac ont été préparées dans le DMSO aux concentrations suivantes : 10 ; 5 ; 1,25 ; 0,75 ; 0,375 mg/mL par dilution sériée.

Préparation de la solution BSA

Une solution de BSA à 5% (m/v) a été préparée en dissolvant 2,5g dans 50g de l'eau distillée.

Procédure expérimentale

Les tests ont été réalisés en triplicata en mélangeant : 50µL de la solution à tester de (HEMP ou Diclofénac) + 0,45ml de solution de BSA à 5%.

Un control négative a été réalisé en remplaçant l'échantillon par 50 µL DMSO.

Un blanc a été préparé en mélangeant 50 μ L DMSO+ 0,45mL PBS.

Les mélanges ont été incubés à 37°C pendant 20min, puis à 56°C pendant 20min supplémentaires. Après refroidissement à température ambiante 2,5mL de PBS ont été ajoutés à chaque tube. L'absorbance a été mesurée à 255nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante [20] :

$$\% \text{ Taux d'inhibition} = \left(\frac{-A}{A_0} \right) \times 100$$

Où :

- A_0 représente l'absorbance du control négative.
- A est l'absorbance de l'échantillon testé.

Le protocole expérimental suivi est résumé dans le schéma (Figure II.12).

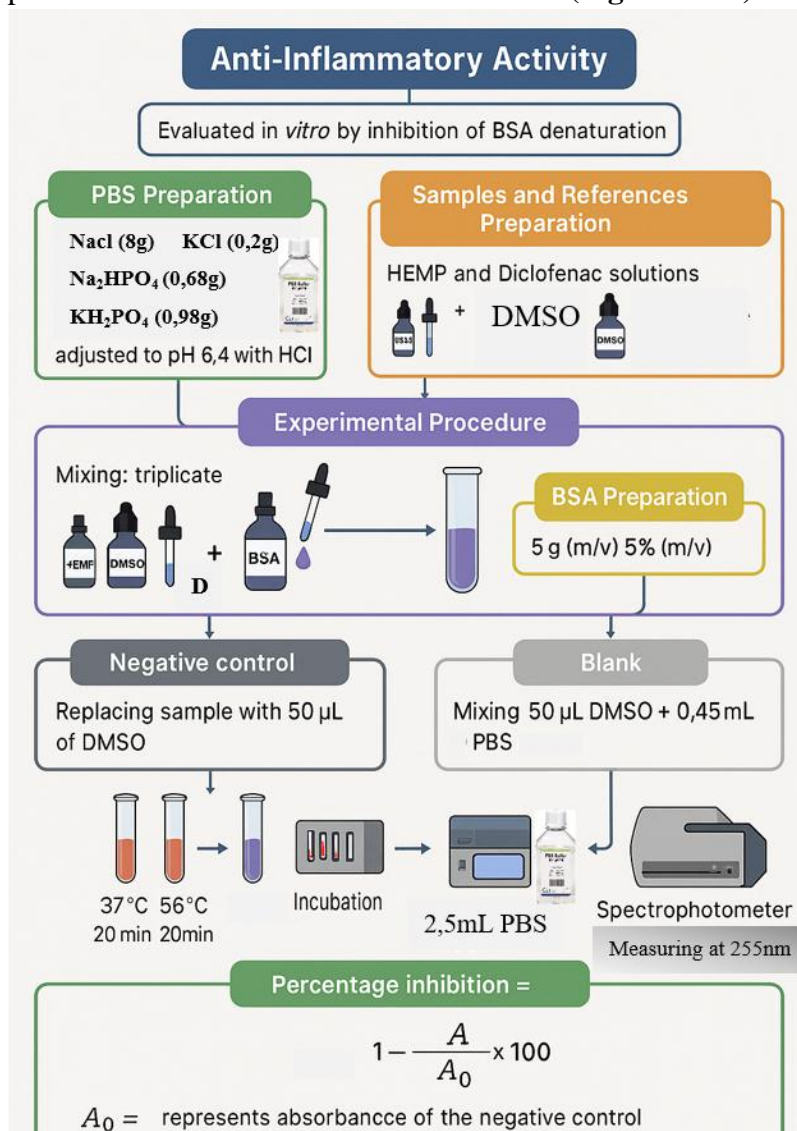


Figure II.11 : Schéma illustratif décrit brièvement le protocole d'activité anti-inflammatoire *in vitro* par inhibition de la dénaturation de l'albumine.

II.3.3. Formulation de la crème

Deux procédures de formulation de la crème ont été réalisées dans cette étude.

La première a été réalisée au niveau de laboratoire control qualité de l'industrie pharmaceutique SAIDAL du site Dar El Beida.

La deuxième formulation a été optimisée au niveau de laboratoire pédagogique de chimie pharmaceutique de L'UMMTO.

II.3.3.1. Crème réalisé au niveau de Saidal

Matière première

Les matières premières et leurs proportions utilisées pour la formulation des crèmes de 1% et 0,5% de HEMP pour une quantité totale de 50g sont mentionnées dans le (Tableau II.4).

Tableau II.5 : Matière première utilisée dans la formulation.

Matières premières	Fonction	Proportion (g)
HE Menthe poivrée	Principe actif	0,5 et 0,25
Méthyl-salicylate	Agent parfumant	12
Myristate d'isopropyle	Emollient	1.5
Polysorbate 60 (Tween 60)	Emulsifiant, Emollient	3
Alcool stéarylique	Facteur de consistance	2.5
Alcool cétylique	Facteur de consistance	2.5
Palmitate de cétyle	Facteur de consistance, Emulsifiant	1
Monostéarate de sorbitan (span 60)	Emulsifiant	1
Alcool benzylique	Solvant	0.5
Eau purifiée	Solvant	q.s.p

Protocol expérimental :

Les deux phases aqueuses et huileuses sont préparées séparément dans deux béchers distincts.

La phase huileuse :

Les composants suivants sont chauffés à des températures spécifiques, puis mélangés progressivement :

→ le tween (60) + myristate d'isopropyle sont chauffés à 30°C.

→ Alcool stéarylique + Alcool cétylique sont ajoutés et portés à 35°C.

→ Palmitate de cétyle + Alcool benzylique sont incorporés à 70°C.

→ Monostréarate de sorbitan + Méthyl salicylate sont ajoutés également à 70°C.

Sous
Agitation

Phase aqueuse :

L'eau purifiée est chauffée à 70°C sous agitation constante.

Ensuite la phase aqueuse est incorporée dans la phase huileuse, sous agitation continue jusqu'à refroidissements. Une fois la température abaissée à environ 30°C, HEMP est ajoutée.

II .3.3.2. Crème réalisé au niveau de l'UMMTO**Matière première utilisé****Tableau II.6 :** Matériel première utilisé

Matière Première	Span (60)	Tween (60)	Alcool cétylique	Huile d'amande amer
Rôle	Emulsifiant Lipophile [21]	Emulsifiant Hydrophile [22]	Co-émulsifiant, Lipophile [23]	Ingrédient principal de la phase lipophile

II.3.3.2.1. Optimisation de la formule de base

Une étude d'optimisation du système émulsionnant a d'abord été entreprise selon les étapes suivantes :

Optimisation du HLB Huile amande amère, la consistance, temps de mélange et la vitesse d'homogénéisations.

Détermination du HLB optimal de l'huile d'amande amère

Dans un premier temps, on a procédé à la détermination du HLB optimal de l'huile d'amande amère. Pour ce faire, différentes émulsions contenant 10 % d'huile d'amande amère ont été préparé en variant les proportions de Tween 60 (HLB=14,9) et Span 60 (HLB=4,7) (**Tableau II.7**). La proportion de TA est fixée à 5% de la masse total de l'émulsion (50g). La composition de base des émulsions préparées est récapitulée dans le (**tableau II.5**).

Tableau II.8 : Composition de base des émulsions préparées.

Ingrédients		Proportions (%)
Huile d'amande amer	10	
Tween 60	x	5
Span 60	y	
Eau distillée	q.s.p. 50	

Tableau II.9 : Proportions unitaires des tensioactifs et valeurs de HLB_m correspondantes.

Emulsions	Proportion de span 60 (%)	Proportion de tween 60(%)	Valeur de HLB _m
n°1	4,36	0,64	6
n°2	3,40	1,60	8
n°3	2,14	2,86	10
n°4	1,54	3,46	12
n°5	0,93	4,07	13

Optimisation de la consistance

Une fois le HLB optimal déterminé, une seconde série d'expérience a été menée en ajoutant cette fois-ci de l'alcool cétylique (HLB=15,5) à différentes concentrations (1%, 3% et 5%) afin d'identifier la proportion optimale du co-émulsifiant. Les proportions totales de la phase huileuse, des tensioactifs et les valeurs critiques de HLB ont été recalculée pour chaque cas (**Tableau II.10**).

Tableau II.11 : Les proportions totales de la phase huileuse, des tensioactifs et les valeurs critiques de HLB

Emulsion	Alcool cétylique (%)	Huile d'amande amer (%)	HLB critique	% Tensioactifs	
				Tween	Span
1	1%	10%	6,855	1,08	3,92
2	3%		8,185	1,74	3,26
3	5%		9,135	2,22	2,78

Optimisation du temps de mélange

Afin d'identifier le temps de mélange optimal pour garantir la bonne homogénéité de l'émulsion, différents temps d'agitations ont été testés (3, 5 et 10 minutes).

Optimisation de la vitesse d'homogénéisation

Enfin, l'impact de la vitesse d'homogénéisation sur la stabilité de l'émulsion a été évalué en testant 3 vitesses : 500, 1000 et 1500 trs par minute.

Remarque : lors de l'optimisation de chacun de ces paramètres (HLB, Ac, temps, Vitesse) les émulsions ont été préparées de manières standardisées, à 1000 trs/min pendant 5 min, sauf dans les cas où le paramètre étudié était justement la vitesse ou le temps.

II.3.3.2.2. Evaluation de la stabilité des émulsions

Chaque formulation obtenue au cours des différentes phases d'optimisation a été soumise à une série de tests de stabilité, à savoir :

Observation macroscopique : consiste à évaluer l'aspect, la consistance, homogénéité, la couleur et l'odeur de l'émulsion.

Observation microscopique : permet d'estimer la taille des gouttelettes ainsi que leur répartition au sein de l'émulsion. Réalisée à l'aide d'un microscope de marque/modèle PHYWE, équipé d'un oculaire WF 10X/18mm,

Mesure de pH à l'aide d'un pH-mètre de la marque HANNA modèle HI 2210.

La stabilité centrifuge a été évaluée à 10000 trs/min pendant des durées de 5, 10 et 15 min à l'aide d'une centrifugeuse de la marque Andreas Hettich GmbH & Co. KG modèle EBA 20.

Evaluation du sens d'émulsion a été réalisée par test de dilution dans une phase aqueuse puis dans une phase huileuse selon le protocole suivant : 5 ml de l'émulsion ont été introduits dans un tube à essai, puis une petite quantité d'eau a été ajoutée, après agitation, l'aspect du mélange a été observé afin de déterminer le type d'émulsion. La même procédure a été répétée en remplaçant l'eau par de l'huile.

II.3.3.3. Formulation finale et étude de stabilité

II.3.3.3.1. Formulation

Après optimisation de l'ensemble des paramètres, deux formulations finales ont été élaborées en incorporant 1% d'HEMP dans une quantité totale de 200g de crème (**Tableau II.12**). La première est toujours avec de l'huile d'amande amer (**1**) et la 2^{ème} en substituant la 1^{ère} phase huileuse par du myristate d'isopropyle (**2**) (HLB=11,5). Le protocole expérimental est représenté dans la (**Figure II.13**).

Tableau II.13 : Les proportions finales de formulations finales avec huile d'amande amère et le myristate d'isopropyle

Emulsion	Alcool cétylique		Huile d'amande amer		Masse total Ø huileuse (g)	HLB critique	% Tensioactifs		% HE
	(%)	Masse (g)	(%)	Masse (g)			Tween	Span	
1	3%	6	10%	20	26	8,185	1,74	3,26	1
2						12,42	3,75	1,25	

II.3.3.3.2. Etude de stabilité

Cette formulation a ensuite été soumise à une étude de stabilité approfondie, réalisée selon les mêmes tests appliqués l'hors des phases précédentes d'optimisation. En complément d'autres évaluations ont été introduites :

Centrifugation à haute vitesse : 60000 trs/min pendant 5, 10, 15 minutes, afin de tester la résistance extrême de l'émulsion à la séparation de phase.

La viscosité a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre numérique de marque/modèle NDJ-8S (Série NDJ), équipé d'un rotor n°3 et réglé à une vitesse de rotation de 12 RPM, afin d'évaluer la consistance globale ainsi que la stabilité rhéologique de la formulation.

Le test de stabilité thermique, a été réalisé dans des conditions de stress, en exposant les formulations à une température élevée de 40 °C dans une étuve, ainsi qu'à une température basse de 4 °C dans un réfrigérateur.

Ces essais ont été réalisés à des intervalles spécifiques : J0 (le jour de préparation), J1 (après 24 heures), J3 (après 72 heures) et J8 (après 8 jours), dans le but d'évaluer l'évolution de la stabilité de la crème dans le temps.

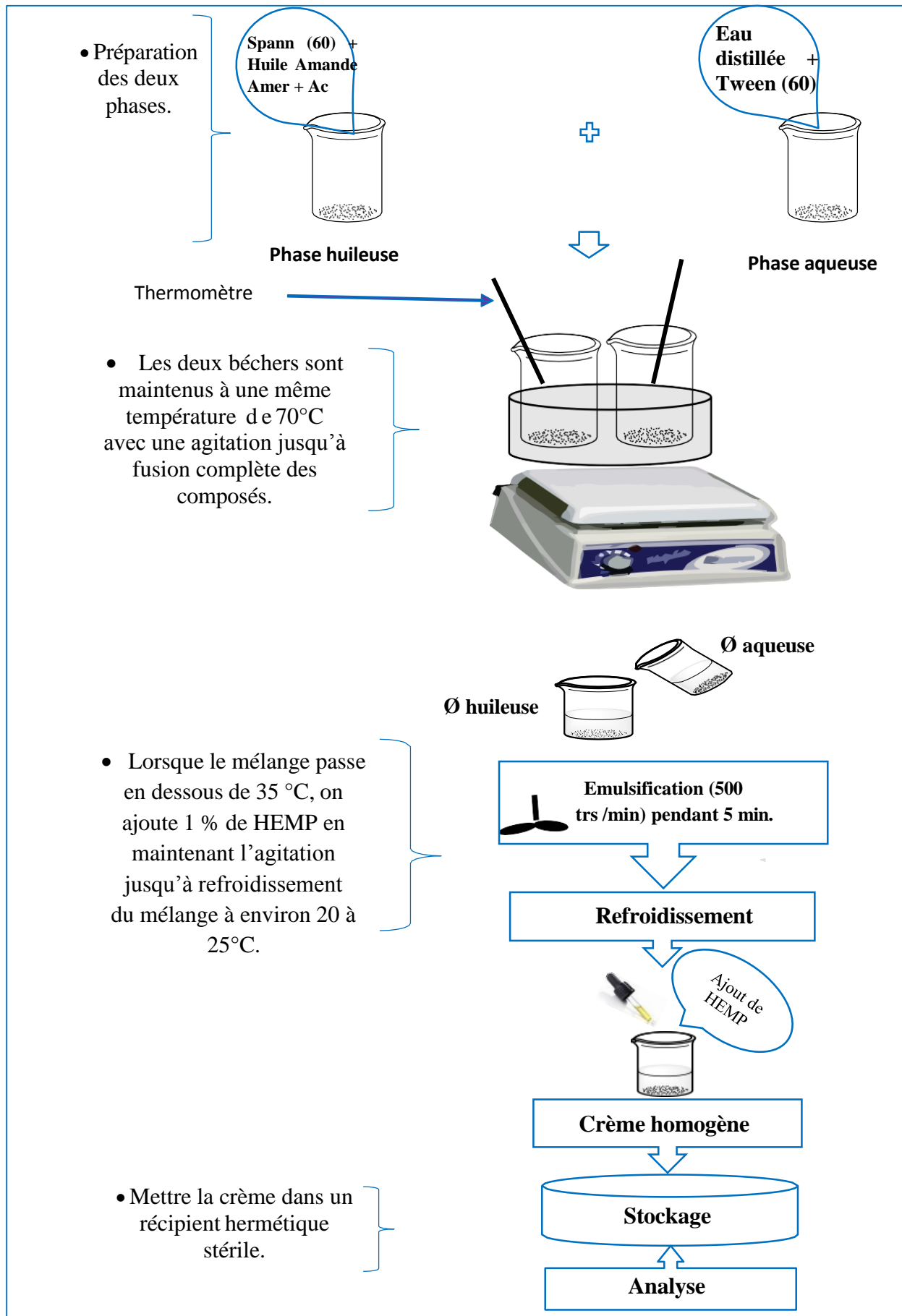


Figure II.14 - Schéma représente le protocole des différentes étapes de la formulation final de la crème.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographique

- [1] Nahr, F. K., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Kafil, H. S., Hoseini, M., & Moghadam, B. E. (2019). Investigation of physicochemical properties of essential oil loaded nanoliposome for enrichment purposes. *Lwt*, *105*, 282-289.
- [2] Zahra, L. F., Khadidja, G. A. D. R. I., Sabrina, B. E. K. K. A. R. I., & Sonia, H. O. U. A. R. I. Valorisation des noyaux de dattes dans la production du biodiesel et son utilisation comme source d'énergie alternative.
- [3] De Levie, R. (2010). Potentiometric pH measurements of acidity are approximations, some more useful than others. *Journal of Chemical Education*, *87*(11), 1188-1194.
- [4] Radi, M., Eddardar, Z., Drioiche, A., Remok, F., Hosen, M. E., Zibouh, K., ... & Zair, T. (2024). Comparative study of the chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activity of the essential oils extracted from *Lavandula abrialis* and *Lavandula stoechas*: in vitro and in silico analysis. *Frontiers in Chemistry*, *12*, 1353385.
- [5] Kontogianni, V. G., & Gerothanassis, I. P. (2022). Analytical and structural tools of lipid hydroperoxides: Present state and future perspectives. *Molecules*, *27*(7), 2139.
- [6] Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). DPPH radical scavenging assay. *Processes*, *11*(8), 2248.
- [7] Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *17*(1), 11-24.
- [8] Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *17*(1), 11-24.
- [9] Molole, G. J., Gure, A., & Abdissa, N. (2022). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl. resin. *BMC chemistry*, *16*(1), 48.
- [10] Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- [11] Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., & Göker, M. (2020). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *70*(11), 5607-5612.
- [12] Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, genetics and evolution*, *9*(6), 1132-1147.

Références bibliographique

- [13] Liu, X., Wu, N., Zhang, M., Xue, F., & Xu, Q. (2023). Isolation and characterization of the zearalenone-degrading strain, *Bacillus spizizenii* B73, inspired by esterase activity. *Toxins*, *15*(8), 488.
- [14] El-Tayeb, M. A., Ibrahim, A. S., Al-Salamah, A. A., Almaary, K. S., & Elbadawi, Y. B. (2017). Prevalence, serotyping and antimicrobials resistance mechanism of *Salmonella enterica* isolated from clinical and environmental samples in Saudi Arabia. *brazilian journal of microbiology*, *48*(3), 499-508.
- [15] Zarai, Z., Kadri, A., Ben Chobba, I., Ben Mansour, R., Bekir, A., Mejdoub, H., & Gharsallah, N. (2011). The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids in health and disease*, *10*(1), 161.
- [16] Thompson, A., Meah, D., Ahmed, N., Conniff-Jenkins, R., Chileshe, E., Phillips, C. O., ... & Row, P. E. (2013). Comparison of the antibacterial activity of essential oils and extracts of medicinal and culinary herbs to investigate potential new treatments for irritable bowel syndrome. *BMC complementary and alternative medicine*, *13*(1), 338.
- [17] Freitas, V. D. D., Coelho, E. L. J., Moreira, J. M. A. R., Dutra, V., Sousa, V. R. F., & Almeida, A. D. B. P. F. D. (2025). Antibacterial Activity of Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum*) Against Oxacillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs with Otitis Externa. *Pathogens*, *14*(7), 709.
- [18] Gholampour-Azizi, I., Rouhi, S., & Yahyayi, F. (2015). In vitro antifungal activity of *Cucumis melo* on *Candida albicans*. *Zahedan J Res Med Sci*, *17*(7), 35-39.
- [19] Fetni, S., & Bertella, N. (2020). Etude in vitro des propriétés anti-inflammatoires de l'extrait méthanolique des fruits de *Rosa canina* L.(Rosacées). *Nutrition & Santé*, *9*(2), 117-125.
- [20] Ndoye Foe, F. M. C., Tchinang, T. F. K., Nyegue, A. M., Abdou, J. P., Yaya, A. J. G., Tchinda, A. T., ... & Etoa, F. X. (2016). Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC complementary and alternative medicine*, *16*(1), 117.
- [21] Zapolski, R., Gasztych, M., Jastrzab-Miškiewicz, B., Jankowska-Konsur, A., & Musiał, W. (2025). The Properties of the Monolayers of Sorbitan Lipids as Informative Factors on the Hydrophilic–Lipophilic Balance Value of Their Mixtures, Proposed for Dermatological Applications. *Molecules*, *30*(8), 1841.

Références bibliographique

- [22] Zheng, Y., Zi, Y., Shi, C., Gong, H., Zhang, H., Wang, X., & Zhong, J. (2023). *Tween emulsifiers improved alginate-based dispersions and ionic crosslinked milli-sized capsules. Npj Science of Food, 7 (1).*
- [23] Ribeiro, H. M., Morais, J. A., & Eccleston, G. M. (2004). Structure and rheology of semisolid o/w creams containing cetyl alcohol/non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. *International journal of cosmetic science, 26(2), 47-59.*

Partie III

Résultats et Discussions

III.1. Caractérisations Physico- chimiques et organoleptiques des deux HEMP

III.1.1. Caractéristiques organoleptiques

Les résultats des caractéristiques organoleptiques sont regroupés dans le (Tableau III.1).

Tableau III.2 : Caractéristiques organoleptiques

Caractéristiques	Couleur	Aspect	Odeur
HEMP(IKLEF)	Jaune pâle	Liquide, limpide, homogène, sans impuretés	Forte odeur
HEMP (Heva Pharm)	Incolore	Liquide, limpide, homogène, sans impuretés	Un peu moins forte que IKLEF
Normes[1]	Incolore à jaune pâle ou vert-jaunâtre	Liquide, Limpide	Mentholée, fraîche, intense

Nos deux huiles se présentent sous forme liquide à température ambiante, d'une odeur intense principalement due à la forte concentration en menthol, composé majoritaire de cette huile, l'aspect limpide et homogène témoigne de la bonne qualité des deux huiles et l'absence de contaminants ou de dégradation. Les deux huiles sont conformes aux normes comme décrit dans le tableau 09. Cependant quelques légères différences ont été constaté. Celle-ci peuvent être dû à la composition chimique des huiles qui peut varier selon l'origine géographique de la plante.

III.1.2. Caractéristiques Physico-chimiques

La détermination de divers indices, largement exigée par les pharmacopées, est intéressante en termes d'évaluation de la qualité des HEs. Les résultats des caractéristiques organoleptiques sont regroupés dans le (Tableau III.3).

Tableau III.4 : Caractéristiques Physico-chimique HEMP

[1]Caractéristiques	HEMP (IKLEF)	HEMP (Heva Pharm)	Normes [2]
Densité (à 20 °C)	0,915	0,900	0,900 - 0,916
Indice de réfraction	1,470 (à 33,5 °C)	1,465 (à 33,5 °C)	1,457 - 1,467 (à 20 °C)
Indice d'acide (mg KOH/g)	1,37	1,0418	max. 1,4
Indice de peroxyde (meq O ₂ /kg)	7,34	2,00	≤ 10,0

III.1.2.1. Densité

Les valeurs de densité obtenues sont de 0,915 pour l'EHMP IKLEF et de 0,9 pour celle de Heva Pharm. Ces deux résultats sont conformes à la plage normative (0,9 à 0,916 à 20 °C), indiquant que les deux huiles sont de bonne qualité sur le plan de densité. La différence entre les deux peut refléter des variations dans la composition chimique, notamment en monoterpènes et composés oxygénés. Généralement, une huile contenant une plus grande proportion de composés oxygénés ou de molécules plus lourdes peut présenter une densité légèrement plus élevée [3].

III.1.2.2. Indice de réfraction

Les valeurs de l'indice de réfraction obtenues sont de 1,470 pour IKLEF et de 1,465 pour celle de Heva Pharm, Ces valeurs se situent à proximité de la plage rapportée dans la littérature, généralement comprise entre 1,457 et 1,467[3]. Cette légère variation peut s'expliquer par une différence de température entre les conditions de notre essai et celles de la norme de référence (généralement mesurée à 20 °C), sachant que l'indice de réfraction est un paramètre thermosensible[4], Par ailleurs, cet indice constitue un critère de qualité important des HEs, car il dépend de leur composition chimique, en particulier de la teneur en monoterpènes et en composés oxygénés. Une proportion élevée en monoterpènes est généralement associée à une augmentation de l'indice de réfraction [5].

III.1.2.3. Indice d'acide

Les valeurs obtenues sont de 1,37mg KOH/g pour IKLEF et de 1,0418mg KOH/g pour Heva Pharm. Ces deux valeurs sont inférieures au seuil maximal autorisé de 1,4 mg KOH/g, indiquant

une faible teneur en acides gras libres et donc une pureté et une bonne stabilité chimique du produit. Une valeur trop élevée pourrait indiquer une dégradation [6].

III.1.2.4. Indice de peroxyde

Les indices de peroxydes sont 7,34meq O₂/kg pour IKLEF et de 2,00meq O₂/kg pour Heva Pharm, tous deux inférieurs à la limite critique de 10,0meq O₂/kg. Ce paramètre, indicateur de l'oxydation lipidique, révèle que les deux huiles sont faiblement oxydées. La valeur plus élevée de IKLEF peut suggérer une oxydation légèrement avancée, pouvant être liée aux conditions de conservation (lumière, chaleur, air) [7].

Conclusion

L'évaluation des paramètres physico-chimiques des deux HEs, issues des marques IKLEF et Heva Pharm, a permis de confirmer leurs conformités globales aux normes de qualité généralement admises pour ce type d'huile. Bien que quelques différences aient été observées entre les deux échantillons, ces variations restent modérées et peuvent être attribuées à des facteurs tels que la composition chimique spécifique de chaque lot, les conditions de distillation ou de stockage, ou encore l'origine botanique de la matière première.

III.2. Etude des activités biologiques

III.2.1. Activité antioxydante

Méthode DPPH

L'évaluation d'activité antioxydante de HEMP des deux marques Heva Pharm et IKLEF et de l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH• à révéler les résultats suivants :

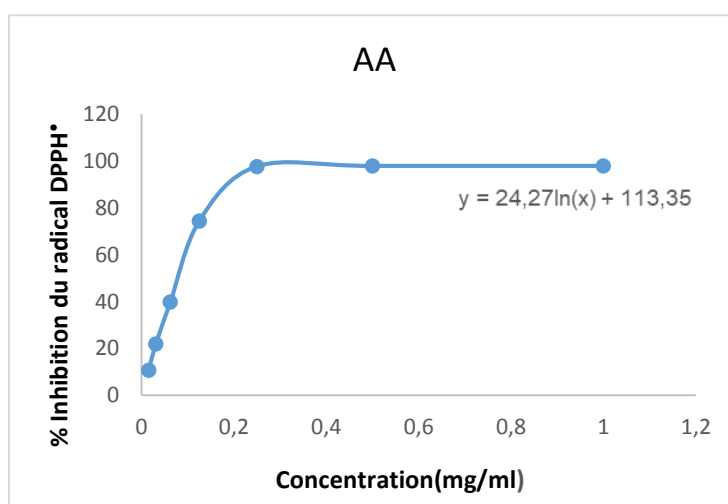


Figure III.1 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction de la concentration en acide ascorbique.

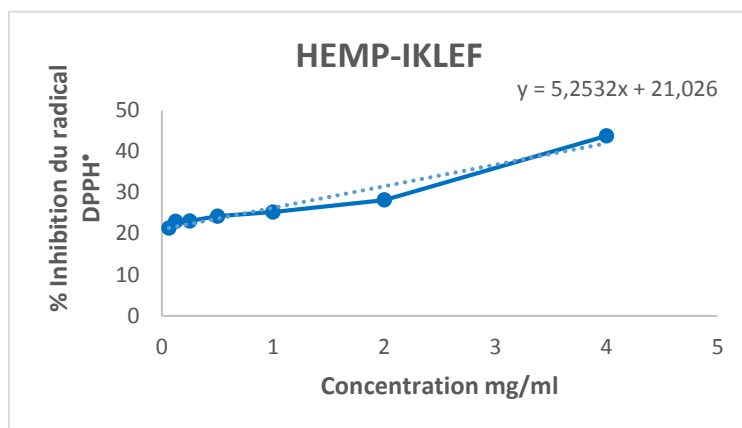


Figure III.2 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction de la concentration en HEMP-IKLEF.

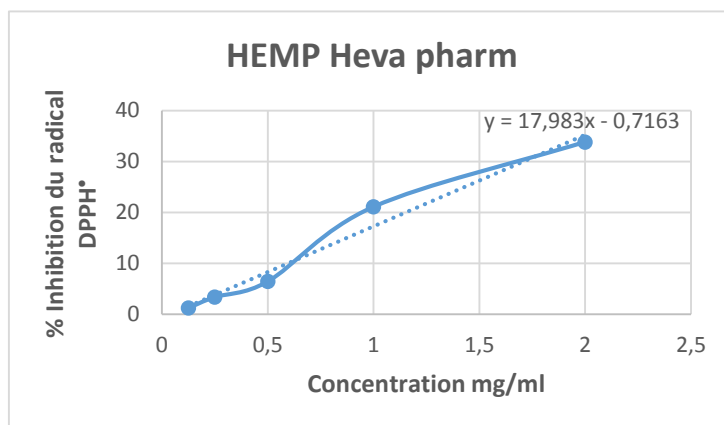


Figure III.3 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction de la concentration en HEMP-Heva pharm.



Figure III.4 : Image illustrant l'activité antioxydante de l'acide ascorbique selon la méthode DPPH après incubation.

Une augmentation progressive du pourcentage d'inhibition a été observée en fonction de la concentration, aussi bien pour l'acide ascorbique que pour les deux huiles essentielles testées. Néanmoins les deux HEs testées n'ont pas dépassé un pourcentage d'inhibition de 50%, et donc l'analyse des courbes a permis de déterminer uniquement la concentration inhibitrice à 50% pour l'AA indicateur clé de l'efficacité antioxydante (**Figure III.5**).

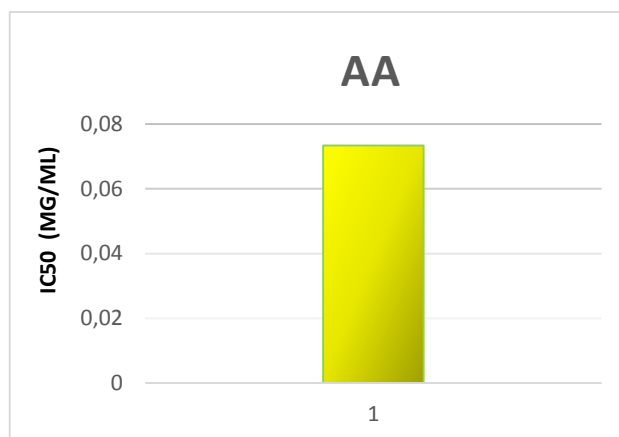


Figure III.5 : Valeurs de l'IC₅₀ de l'acide ascorbique.

AA à présenter une IC₅₀ très faible (0,0734mg/mL), confirmant son pouvoir antioxydant, bien documenté dans la littérature [8], en ce qui concerne HEMP des deux marques.

Les résultats obtenus sont en désaccord avec ceux rapportés dans la littérature, qui ont obtenu une IC₅₀ de 3,12mg/mL, indiquant une activité modérée, attribué principalement à la présence de menthol, menthone [9].

Ces résultats confirment que l'HEMP possède une certaine capacité antioxydante, leur pouvoir reste inférieur à celui de l'acide ascorbique. Toutefois, cette activité peut représenter un atout complémentaire dans le cadre d'une formulation topique, notamment en association avec d'autres agents antioxydants.

III.2.2. Activité antibactérienne

Les résultats de mesure de diamètre des zone d'inhibition enregistrées de l'HEMP vis-à-vis des 5 souches bactériennes sont présentés le (Tableau III.5).

Tableau III.6 : DZI de l'HEMP pour les cinq souches testées.

Souche bactérienne	Diamètre du halo d'inhibition (mm)	Sensibilité à HEMP
<i>Bacillus sp</i> +	24,69	Forte sensibilité
<i>Escherichia coli</i> -	10,33	Faible sensibilité
<i>Staphylococcus aureus</i> +	10,77	Faible sensibilité
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -	0	Résistance totale



<i>Salmonella enterica</i> -	0		Résistance totale
---------------------------------	---	--	-------------------

Différence d'efficacité selon le type de bactérie testée :

Les résultats montrent une activité plus marquée contre les bactéries à Gram positif, notamment *Bacillus sp* et *Staphylococcus aureus*, avec des DZI respectivement 24,90mm et 10,77mm. En revanche, les souches à Gram négative ont montré une sensibilité plus faible, voire même une résistance totale dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enterica*. Cette différence est expliquée par la structure de l'enveloppe cellulaire [10] :

Les bactéries à Gram (-), possèdent une membrane externe supplémentaire, qui leur confère une double protection contre les agents hydrophobes et toxiques. En revanche, les bactéries à Gram+, dépourvues de cette barrière, sont plus sensibles à l'action des HEs [11].

Les résultats montrent une activité antimicrobienne variable selon la souche testée :

- HEMP contient des monoterpènes (ex : menthol, menthone) qui perturbent la membrane cellulaire et entraînent une fuite du contenu intracellulaire [12].
- Les Bactéries à Gram (+) comme *Bacillus* sont plus sensibles aux HEs en raison de leur paroi riche en peptidoglycane, plus perméable aux composés lipophiles [13].
- La faible sensibilité de *Staphylococcus aureus* peut être due à des mécanismes de résistance naturelle (ex : production d'enzymes de dégradation des HEs) [14].
- *Escherichia coli* est une bactérie à Gram (-), possédant une membrane externe riche en lipopolysaccharides (LPS), qui limite l'entrée des composés hydrophobes comme les HEs [15].
- *P. aeruginosa* et *Salmonella enterica* sont résistantes aux agents antibactériens en raison de :
 - sa membrane externe très imperméable, qui empêche la pénétration des HEs [16];
 - ses pompes d'efflux, qui expulsent activement les molécules toxiques [17] ;
 - sa capacité à former un biofilm, renforçant sa protection contre les substances antimicrobiennes [18].

Des études ont montré que des concentrations faibles en HEMP suffisent à inhiber la croissance de certaines souches par ailleurs une concentration un peu plus élevée a montré une efficacité contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*. Concernant les bactéries à Gram (-

), HEMP à montrer une efficacité contre *E. coli* avec une concentration plus élevée que les deux premiers. En revanche, *Pseudomonas aeruginosa* et *salmonella enterica* se sont révélées être les plus sensibles, n'étant inhibées qu'à des concentrations élevées [19].

Les études scientifiques confirment que l'HEMP a une activité plus marquée contre les bactéries Gram+. Tandis que les Grams négatifs et les bactéries opportunistes comme *P. aeruginosa* y sont plus résistantes.

Conclusion

Les résultats obtenus montrent que HEMP possède une activité antibactérienne significative contre *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus* et *E coli*, avec une efficacité maximale contre *Bacillus*. En revanche *P. aeruginosa* et *Salmonella enterica* se révélée complètement résistantes. Confirmant ainsi leurs statuts de bactéries hautement résistantes aux antimicrobiens naturels, en raison de ses membranes externes et de ses systèmes de défense naturels.

Le mécanisme d'action de HE est généralement lié à son interaction avec la membrane cytoplasmique des bactéries. Elle peut être absorbée par la cellule et provoquer une désorganisation de la membrane, entraînant sa lyse et perturbant les fonctions essentielles à la survie cellulaire [20].


La richesse de HEMP en monoterpènes oxygénés expliquerait son large spectre d'activité antimicrobienne [21].

III.2.3. Activité antifongique

Les résultats de mesure de diamètre des zones d'inhibition enregistrées de HEMP vis-à-vis de la souche fongique est présenté dans le (Tableau III.7).

Tableau III.4 : DZI de HEMP pour la souche testée

Souche fongique	DZI	Sensibilité de HEMP
<i>Candida albicans</i>	25.70 mm	Forte sensibilité



Le résultat montre une forte activité de l'HEMP sur la souche fongique testée avec un DZI de 25,7mm. La forte inhibition confirme l'effet antifongique bien connue des monoterpènes contenus dans l'HEMP [22].

Candida albicans est un champignon dont la membrane est riche en ergostérol, une cible des composés antifongiques naturels [23].

III.2.4. Activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in-vitro de l'HEMP IKLEF a été évaluée à l'aide de la méthode d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA), un procédé au cours duquel les protéines perdent leurs structures secondaire et tertiaire sous l'effet de conditions expérimentales défavorables [24]. Les résultats ont été comparés à ceux du diclofénac sodique, utilisé comme anti-inflammatoire de référence. Les % D'inhibition ont été calculés à différentes concentrations pour les deux échantillons testés (Figure III.7), (Figure III.8) et (Figure III.9).

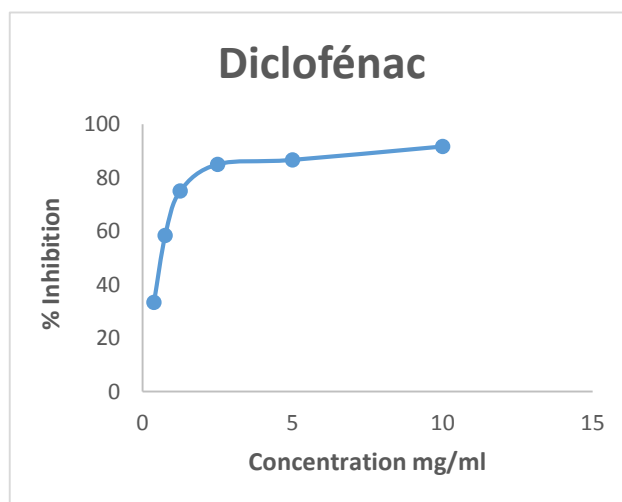


Figure III.6 : Courbe d'étalonnage du % inhibition de la dénaturation de l'albumine bovine en fonction de la concentration en Diclofénac.

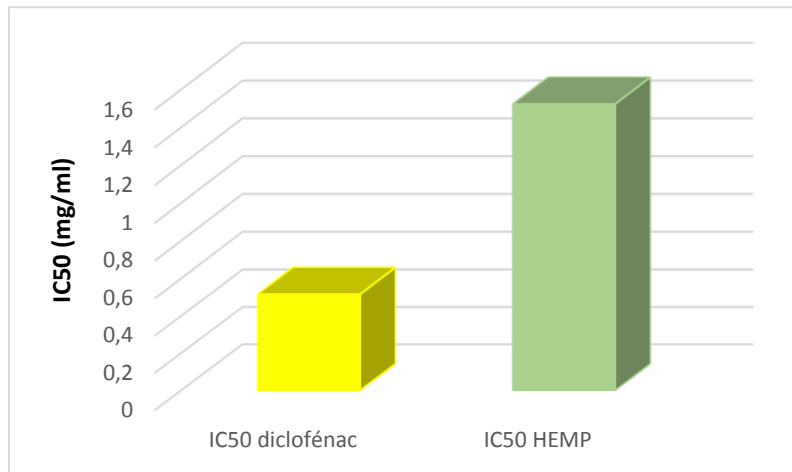


Figure III.11 : Valeurs des IC₅₀ du diclofénac et HEMP IKLEF.

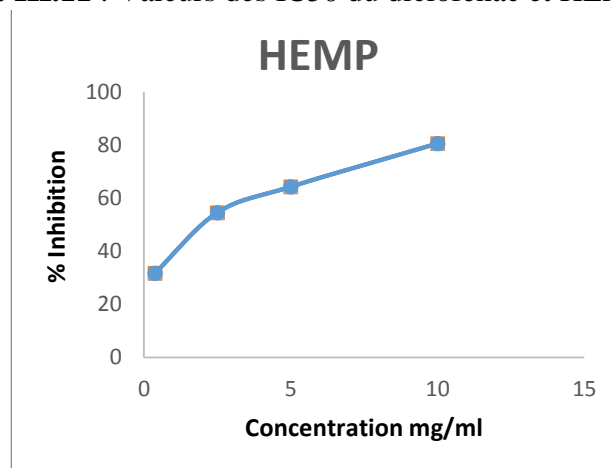


Figure III.10 : Courbe d'étalonnage du % inhibition de la dénaturation de l'albumine bovine en fonction de la concentration en l'HEMP IKLEF.

Les résultats obtenus montrent que les deux échantillons testés présentent une activité anti-inflammatoire. Le Diclofénac a montré une activité plus constante et plus élevée, avec une inhibition maximale de 91,67% à 10mg/mL. Il a également atteint 50% d'inhibition à une concentration bien plus faible que HE, avec une IC₅₀ de 0,515 mg/mL, contre 1,522 mg/mL pour HEMP.

Ces résultats confirment que HEMP possède une activité anti-inflammatoire notable, mais inférieure à celle du diclofénac, ce qui reste cohérent avec les données de la littérature, qui ont rapporté une activité anti-inflammatoire de HEMP par inhibition de la BSA avec une IC_{50} de 1,64mg/m L [25], mettant en évidence le rôle des constituants tels que le menthol, le menthone et leurs dérivés, connus pour leurs propriétés anti-prostaglandines et leur capacité à stabiliser les membranes cellulaires.

III .3. Formulation de la crème

III.3.1. Crème réalisé au niveau de Saldal

III.3.1.1. Etude de stabilité

L'étude de stabilité physico-chimique de la crème a été faite après 1mois et 10jours de préparation (Figure III.12),(Figure III.13), (Figure III.14) ,(Figure III.15), (Tableau III.5).

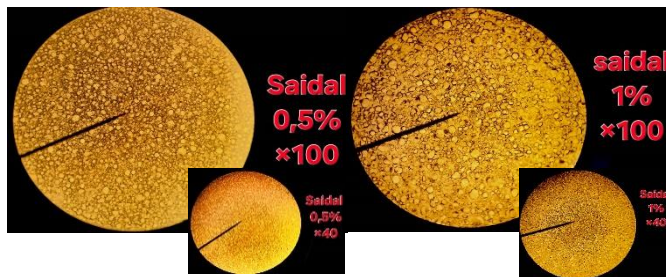


Figure III.16 : Etude microscopique des deux crèmes de 1% et 0,5% de HEMP.



Figure III.17 : L'étude macroscopique des deux crèmes.

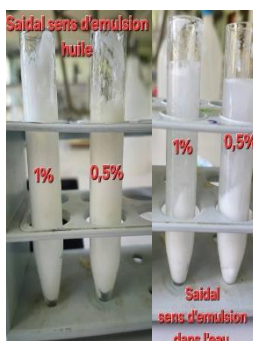


Figure III.19 : Sens d'émulsion des deux crème.

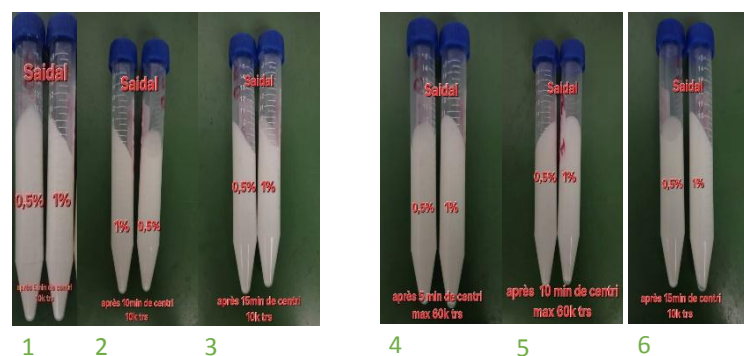


Figure III.18 : Etude de stabilité à la centrifuge des deux crèmes.

Tableau III.5 : Etudes physico-chimique des deux crèmes.

Paramètre évalué	0,5%	1%
Aspect macro	crème blanche , homogène, visqueuse , dense , à l'odeur parfumée , facile à étaler	La même chose légèrement plus fluide que la 0,5%
Observation micro	Gouttelettes majoritairement petites et homogènes, avec quelques plus grandes	Gouttelettes plus grosse, réparation moins homogène , présence de coalescence partielle
Test du sens d'émulsion	Soluble uniquement dans la phase aqueuse	
pH	5,67	5,47
Centrifuge	Résistance totale à la séparation (5,10,15min à 10 000tr/min et 60 000tr/min)	

L'analyse **macro** des deux formulations montre une bonne apparence générale, avec une texture homogène et stable. La formulation 0,5% présente une consistance légèrement plus dense et plus visqueuse, favorable à une application topique contrôlée. Celle à 1% est plus fluide, ce qui pourrait faciliter son étalement.

Sur le plan **microscopique**, des gouttelettes de petite taille bien réparties ont été observées dans la crème à 0,5%, traduisant une bonne dispersion de la phase interne. En revanche, la formulation à 1% présente des gouttelettes plus grosse et moins uniformes, suggérant un début d'instabilité de l'émulsion. Cette différence peut s'expliquer par la plus grande quantité HE, pouvant dépasser la capacité d'absorption du system tensioactif utilisé.

Le test du sens d'émulsion a confirmé dans les deux cas un système huile dans eau (H/E).

Les valeurs de **pH**, comprises entre 5,47 et 5,67, restent compatibles avec le pH physiologique de la peau (environ 5,5) [26], ce qui garantit une bonne tolérance cutanée et une minimisation du risque d'irritation.

Enfin, **la stabilité centrifuge** des deux formulations, observée jusqu'à 15 minutes à 10 000tr/min, indique une excellente résistance à la séparation de phase, une légère préférence pour la version 0,5% en terme de structure interne.

Conclusion

Ces résultats suggèrent que la formulation à 0,5% d'HEMP offre une meilleure stabilité globale avec une microstructure plus homogène, un pH plus proche de celui de la peau et une texture

favorable à un usage topique. Bien que la formulation à 1% soit également stable, la présence de globules plus gros et moins répartis pourrait la déstabilisée à long terme.

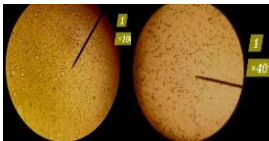

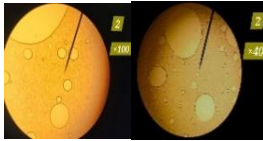
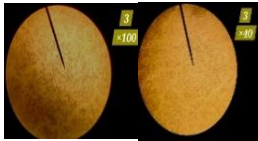
III.3.2. Crème réalisé au niveau de l'UMMTO

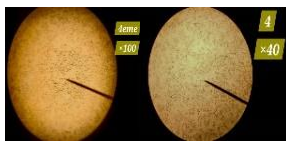

III.3.2.1. Optimisation de la formule de base

III.3.2.1.1. Optimisation du HLB

Cette optimisation a été faite selon les études physico-chimiques suivantes : études macroscopique, microscopique, sens de l'émulsion et stabilité à la centrifuge. Les résultats obtenus sont représentés dans le (Tableau III.6).

Tableau III.6 : Observation des études physico chimiques l'hors d'optimisation du HLB de HAA.

Emulsion	HLB _m	Observation macroscopique	Sens d'émulsion	Observation microscopique	Centrifugation
1	6	Crème blanche, visqueuse, odeur caractéristique d'amande amère : bonne homogénéité globale	Hydrophile	Gouttelette de petites de taille, bien répartis homogènes 	 Stable
2	8	-	-	Présence de gouttelettes de tailles variables, séparation visible 	
3	10	Légère fluidité	-	Gouttelettes de petites de tailles mais mal réparties 	

4	12	-	-	Présence de petites gouttelettes et d'autres légèrement plus grande, mauvaise répartition.	Séparation de phase
					
5	13	-	-	Petites gouttelettes et autres grosses.	

L'émulsion 1 (HLB=6) s'est révélée la plus stable d'un point de vue macroscopique, microscopique et centrifuge. La texture obtenue était visqueuse, homogène et bien liée, avec un comportement clairement hydrophile au test de sens d'émulsion. L'analyse microscopique à confirmer la présence de gouttelettes homogènes et bien réparties, sans signe de coalescence, ce qui traduit une bonne stabilité de l'émulsion.

A l'inverse, les émulsions préparées avec un HLB supérieur à 8 ont montré une instabilité croissante : apparition de gouttelettes de tailles variables, mauvaise répartition, voir séparation de phase complète pour l'émulsion 4 (HLB=12). L'émulsion 5 (HLB=13) présente une légère amélioration avec des gouttelettes bien réparties, mais la présence de quelques plus grosses particules peut indiquer une instabilité potentielle à moyen terme.

Sur la base de ces résultats, la valeur de $HLB_m=6$ est apparue comme la plus adaptée pour l'HAA dans le cadre de cette formulation, offrant une bonne stabilité globale et une structure homogène. Cette formulation sera donc utilisée comme formule de base pour les étapes suivantes de l'optimisation.

III.3.2.1.2. Optimisation de la consistance

Cette optimisation a été faite selon les mêmes critères déjà cité au-dessus. Ils sont représentés dans les : (Figure III.16), (Figure III.17), (Figure III.18) et (Tableau III.7).

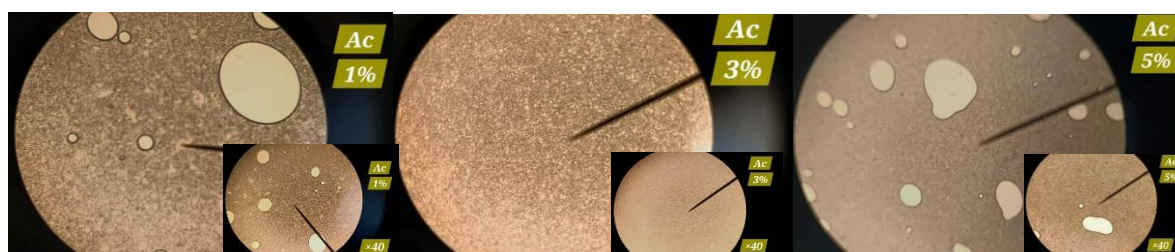


Figure III.20 : Observation microscopique des différentes proportions d'Ac.

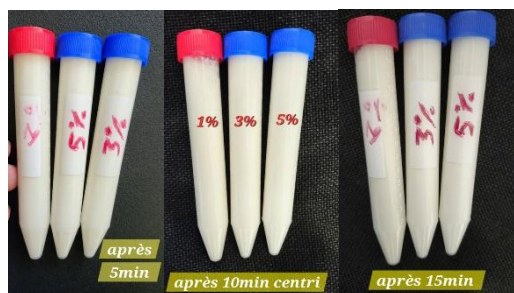


Figure III.21 : stabilité à la centri après 5,10 et 15min pour les différents proportions d'Ac.

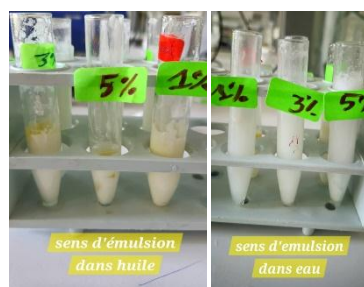


Figure III.22 : sens d'émulsion des différents proportions d'Ac dans la phase aqueuse et la phase huiles.

Tableau III.7 : Observation des études physico-chimiques l'hors d'Alcool cétyle.

Emulsion	1	2	3
Proportion Ac	1%	3%	5%
Observation macroscopique	Crémeuse laiteuse blanchâtre, visqueuse à texture épaisse et homogène, sans grumeaux : odeur caractéristique de HAA	Crème laiteuse, blanchâtre très homogène visqueuse sans grumeaux	Crème laiteuse, blanchâtre, semi solide légèrement fluide présence visible de grumeaux et de particule solide à l'œil nu
Ses d'émulsion		Hydrophile	
Observation microscopique	présence de nombreuse gouttelettes de grande taille et quelque autre plus grossière	gouttelettes très fines , bien réparties , homogénéité excellente	Présence de gouttelettes petite bien répartis , mais également de nombreuses gouttelettes beaucoup plus grandes
Centrifugation	Stable après 5min et 10min : apparition d'une mousse en surface à 10 et 15min	Stable jusqu'à 15 min de centrifugation	-
pH	6,88	6,72	6,25

L'ajout de 1% d'alcool cétyle (n°1) a permis d'obtenir une crème stable, épaisse, sans grumeaux avec une bonne homogénéité globale. Toutefois, l'analyse microscopique a mis en évidence la présence de gouttelettes de grande taille, ce qui pourrait indiquer une stabilité intermédiaire à long terme. La formation d'une mousse en surface après 10 et 15min de centrifugation un signe déséquilibre.

L'émulsion contenant 3% d'Ac (n°2) a donné les meilleurs résultats : texture homogène, excellente dispersion des gouttelettes, et stabilité parfois même après 15min de centrifugation. Cela suggère une meilleure structure ainsi qu'un rôle optimal de l'alcool cérylique en tant que co-émulsifiant à cette concentration.

A l'inverse, une augmentation à 5% (n°3) a entraîné une déstabilisation macroscopique : présence de grumeaux, formation de particules solides visible à l'œil nu, et un aspect semi-solide peu homogène. Cette instabilité est confirmée par l'observation microscopique montrant un mélange de gouttelettes bien réparties et d'autres beaucoup plus grandes.

Pour le pH les trois préparations présentent un pH autour de 6 et 7 qui est bien toléré à une application topique.

Conclusion

La concentration de 3% d'alcool cérylique s'est révélée la plus adaptée pour cette formulation, assurant un bon équilibre entre viscosité, homogénéité et stabilité. Cette proportion sera retenue pour les étapes ultérieures de l'optimisation.

III.3.2.1.3. Optimisation du temps

Cette optimisation a été faite aussi selon les mêmes critères déjà cité au-dessus. Ils sont représentés dans les : (Figure III.23), (Figure III.24) , (Figure III.25) et (Tableau III.8).



Figure III.26 : stabilité à la centri après 15min pour les différentes variations du temps d'homogénéisations.

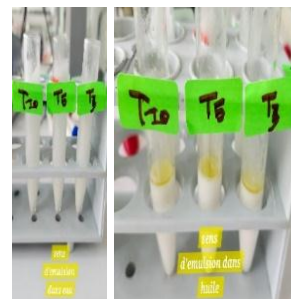


Figure III.27 : sens d'émulsion des différentes variations du temps d'homogénéisations.

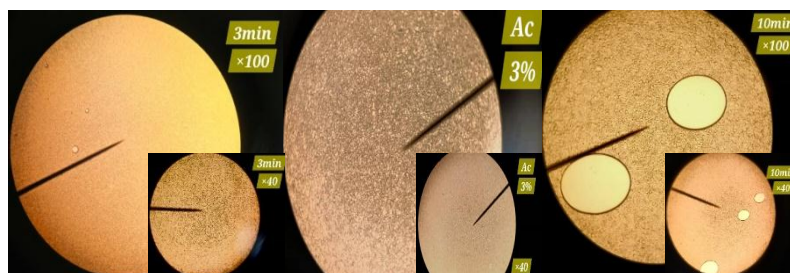


Figure III.28 : Observation microscopique des différentes variations du temps d'homogénéisations.

Tableau III.8 : Observation des études physico-chimiques de différentes variations du temps d'homogénéisations du mélange.

Emulsion	1	2	3
Temps	3	5	10
Observation macroscopique	Crémeuse laiteuse blanchâtre, visqueuse, opaque lisse, à texture épaisse et homogène odeur caractéristique de HAA		
Ses d'émulsion	Hydrophile		
Observation microscopique	gouttelettes très fines , bien réparties , homogénéité excellente mais un peu légèrement inférieur à la 2	gouttelettes très fines , parfaitement réparties : homogénéité excellente	gouttelettes très fines, biens réparties mais apparition de qlq gouttelette grossière
Centrifugation	Stable à 15min de centrifugation		
pH	6,04	6,14	6,06

Toutes les formulations présentent des caractéristiques macroscopiques similaires : texture crémeuse, blanchâtre, visqueuse et homogène. Le test de sens d'émulsion a confirmé le caractère hydrophile de l'ensemble des émulsions.

L'analyse microscopique a toutefois permis de dire que **l'émulsion agitée pendant 5min (n°2)** s'est révélée la plus homogène, avec des gouttelettes très fine et parfaitement réparties, traduisant une émulsion bien stabilisée.

L'émulsion obtenue après 3min (n°1) a montré également une bonne homogénéité, mais légèrement inférieure à celle de l'émulsion 2, ce qui pourrait refléter un temps de dispersion insuffisant. A l'inverse, un temps prolongé de 10min (n°3) n'a pas amélioré la stabilité de l'émulsion, au contraire, on a observé l'apparition de quelques gouttelettes grossières, signe d'un début de coalescence.

La stabilité centrifuge s'est révélée satisfaisante pour les trois émulsions, aucune séparation de phase n'ayant été observée après 15min. Concernant les valeurs de pH, elles restent relativement constantes et compatibles avec un usage cutané, sans variations significatives selon le temps d'agitation.

Conclusion

Le temps d'homogénéisations optimal a été fixé à 5min, ce qui permet une dispersion fine et homogène des gouttelettes. Ce paramétré a été fixée pour la dernière étape d'optimisation.

III.3.2.1.4. Optimisation de la vitesse d'homogénéisation

Cette optimisation a été faite aussi selon les mêmes critères déjà cité au-dessus. Ils sont représentés dans les : (Figure III.29), (Figure III.30), (Figure III.31) et (Tableau III.9).



Figure III.33 : observation de la stabilité à la centri après 15min pour les différents variation de vitesse d'homogénéisations.

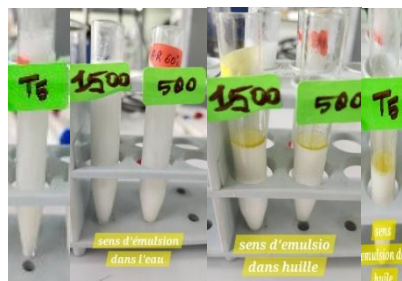


Figure III.34 : sens d'émulsion des différents variations du temps d'homogénéisations.



Figure III.32 : observation de la stabilité à la centri après 10min pour les différents variation de vitesse d'homogénéisations.

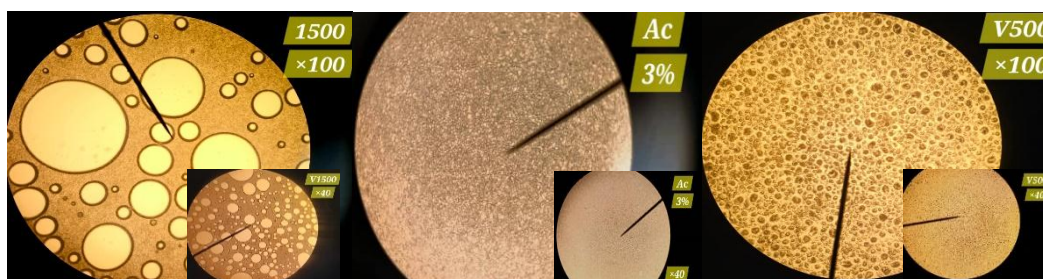


Figure III.35 : Observation microscopique de différentes variations de la vitesse d'homogénéisations

Tableau III.9 : Observation des études physico-chimiques de différentes variations de la vitesse du mélange.

Emulsion	1	2	3
Vitesse	500	1000	1500
Observation macroscopique	Crémeuse laiteuse blanchâtre, visqueuse, opaque lisse, à texture épaisse et homogène odeur caractéristique de HAA		
Ses d'émulsion	Hydrophile		
Observation microscopique	gouttelettes très fines , parfaitement réparties : homogénéité excellente , un peu	gouttelettes très fines , parfaitement réparties : homogénéité excellente	Présence de grosse gouttelettes accompagnées d'autres de tailles

	mieux que l'émulsion n°3		variable , mauvaise réparations
Centrifugation	Après 15min les deux première reste stable , la 3éme il ya eu une formation de mousse		
pH	6,25	6,14	6,21

Les émulsions préparées à 500 et 1000trs/min présentent toutes deux un aspect macroscopique très homogène, une bonne viscosité et une texture stable. L'observation microscopique confirme une répartition fine et uniforme des gouttelettes, avec une légère supériorité de l'émulsion obtenue à 500trs/min en termes d'homogénéité visuelle.

En revanche, l'augmentation de la vitesse à 1500trs/min a conduit à une perturbation du système émulsionné. L'analyse microscopique met en évidence la présence de gouttelettes de tailles irrégulières, mal réparties, ce qui suggère un déséquilibre dû à un cisaillement excessif. Cette hypothèse est soutenue par l'apparition de mousse en surface après 15min de centrifugation, indiquant un début de déstabilisation.

Les valeurs de pH restent toutes dans une plage physiologique (6,14 à 6,25), compatibles avec une application cutanée, et ne montrent pas d'impact significatif de la vitesse sur l'acidité de la formulation.

Conclusion

La vitesse de 500trs/min a été retenue comme la plus adaptée, assurant une dispersion efficace, une bonne stabilité centrifuge et une homogénéité optimale sans endommager la structure de l'émulsion. Tout comme les précédents paramètres celui-là sera retenue pour la formulation finale.

III.3.3. Formulation finale

III.3.3.1. Formulation avec huile d'amande amère

L'étude de stabilité approfondie de cette formulation dans le temps (Jo, J1, J3, J8) sont représentées dans le (Tableau III.10) et (Annexe 01).

Tableau III.10 : Observation des études physico-chimiques de formulation final dans le temps (J0-J1-J3-J8).

Temps	Tests de stabilité respectivement : Macro (1) , sens (2) , micro (3) , centri 10k trs/min (4), centri max 60k trs/min (5) , pH (6) , viscosité (7) , Tests de stabilité thermique (8)
J0	(1) : crémeuse, visqueuse, de couleur jaune clair, homogène, lisse, sans grumeaux, avec une odeur caractéristique de HAA, étalement facile sur la peau, (2) : hydrophile, (3) : présence de gouttelettes très fines bien réparties, accompagnées de quelques gouttelettes légèrement plus grandes. A l'échelle 40× , la répartition semble homogène on peut dire probablement que c'est une microémulsion (4) : stable après 15min de centri à10k trs/min , (5) : l'apparition d'une couche de couleur jaune plus foncée à la surface au bout de 15min de centri 60k trs/min (6) : 6,69 (adapté à l'application cutanée) , (7) : 3497mPa.S indiquant une bonne consistance (8) : stable après 24h à 4°C et à 40°C.
J1	(1) : Même que J0, (2) : hydrophile, (3) : aucun changement significatif, stabilité conservée (4) : stable pendant 15min à 10k trs/min, (5) : l'apparition d'une couche jaune plus foncée en surface au bout de 15min de centri 60k trs/min, (6) : 6,26 (légère baisse mais toujours dans une plage acceptable) (7) : 4984mPa.S (augmentation significative par rapport à J0) (8) : stable à 4°C pendant 48h. A 40°C, présence d'une fine couche supérieure jaunâtre avec quelques gouttelettes, suggérant un début de déstabilisation thermique.
J3	(1) : Aucun changement visible (2) : Lipophile , (3) : Stabilité maintenue , gouttelettes toujours bien réparties (4) : stable pendant 15min à 10k trs/min, (5) : stable pendant 15min à 60k trs/min, (6) : 6,34 , (7) : 5205mPa.s , (8) : /
J8	(1) : Même apparence qu'aux jours précédents, mais apparition d'une couche huileuse en surface (2) : lipophile, (3) : Pas de changement visible, stabilité conservée (4) : stable après 15min de centri à10k trs/min, (5) : Apparition, après 10min, d'une phase transparente au fond, traduisant un début de séparation de phase. (6) : 6,16 , (7) : / , (8) : /

J0 :

L'émulsion montre une bonne stabilité initiale, aussi bien macroscopiquement que microscopiquement. Les résultats suggèrent une structure stable avec un léger début de déphasage à haute centrifugation, sans altération visible à chaud ou à froid.

J1 :

La formulation conserve une bonne stabilité après 24h, malgré une légère baisse de pH. La stabilité thermique commence à être impactée à chaud.

J3 :

Malgré le changement du sens d'émulsion (devenu lipophile). La stabilité physique reste globalement satisfaisante. Mais ce changement mérite d'être surveillé.

J8 :

A partir du 8ème jour, on observe une dégradation progressive de l'émulsion. Cela se manifeste par une séparation partielle des phases, un changement du caractère de l'émulsion (devenue lipophile). Une diminution de la viscosité et une instabilité sous l'effet d'une centrifugation à grande vitesse. Ces signes indiquent que la stabilité de la crème commence à se détériorer après le troisième jour.

Conclusion

La formulation finale enrichie en HEMP présente une bonne stabilité globale durant les 3 premiers jours, avec des propriétés physico-chimique constantes, une structure homogène et un comportement stable aux stress centrifuge et thermique. A partir du 8ème jour, des signes de déstabilisation apparaissent, notamment sous forme de séparation de phase et de variation du sens d'émulsion, indiquant une stabilité limitée dans le temps. Des améliorations de la phase grasse ou du système émulsionnant pourraient être envisagées pour prolonger cette stabilité.

III.3.3.2. Formulation avec Myristate d'isopropyle

Cette tentative s'est soldée par un échec de formation de la crème, avec séparation de phase (**Figure III.37**), indiquant une incompatibilité dans les conditions expérimentales utilisées.



Figure III.36 : Formulation final avec myristate d'isopropyle.

III.3.4. Comparaison de la stabilité entre la formulation finale UMMTO et la crème industrielle SAIDAL (0,5%)

La formulation finale développée à l'UMMTO (1% HEMP) présente de bonnes caractéristiques physico-chimique initiales (J0-J3) mais montre des signes de déstabilisation significatifs à partir du 8^e jour (séparation de phase, inversion partielle, diminution de viscosité). En comparaison, la formulation industrielle SAIDAL à 0,5% se distingue par une microstructure plus homogène et une meilleure tenue aux essais centrifuges et thermiques. Ces observations indiquent que la charge en HE et l'équilibre HLB/tensioactifs sont des facteurs critiques de stabilité.

CONCLUSION

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail d'étude a porté sur la valorisation de l'huile essentielle de la menthe poivrée (HEMP) à travers la formulation d'une crème topique à visée anti-inflammatoire.

Dans une première phase, des analyses physico-chimiques ont permis de caractériser deux marques commerciales d'HEMP (IKLEF et Heva Pharm). Les résultats ont révélé des valeurs globalement conformes aux normes de la pharmacopée, tant en termes de densité, d'indice de réfraction, que d'acidité et d'oxydation, avec une préférence relative pour la marque IKLEF en terme de stabilité oxydative.

Les activités biologiques ont ensuite été étudiées. L'HEMP a révélé une absence d'activité antioxydante significative, les taux d'inhibition du radical DPPH n'ayant pas dépassé les 50 pour cents. En revanche l'HEMP a montré une activité antibactérienne ciblée, avec une efficacité marquée contre *Bacillus sp* et staphylococcus aureus, mais une absence totale d'effet contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella enterica*. Une activité antifongique intéressante a également été observée, en particulier contre *Condida albicans*. Enfin, l'activité anti-inflammatoire mesurée in vitro par la méthode BSA a confirmé un potentiel inhibiteur prometteur, bien que moins que le diclofénac.

La dernière phase a consisté à formuler et optimiser une crème contenue 1% d'HEMP, en étudiant successivement l'effet du HLB, du co-émulsifiant, du temps et de la vitesse d'agitation. Une formulation finale stable a été obtenue et ensuite validée par une série de tests de stabilité macroscopiques, microscopiques, thermiques et centrifuges. Celle-ci a montré de bonnes caractéristiques physico-chimiques initiales (J0-J3), mais a présenté des signes de déstabilisation significatifs à partir du 8^e jour (séparation de phases, diminution de viscosité, inversion partielle du sens d'émulsion). En comparaison, la crème industrielle de Sidal à 0,5% HEMP s'est distinguée par une microstructure plus homogène et une meilleure tenue aux essais de stabilité, confirmant que la charge en huile essentielle et l'équilibre HLB/tensioactifs constituent des facteurs critiques de stabilité.

Ce travail met ainsi en lumière le potentiel thérapeutique et technologique de l'HEMP dans la formulation topique, mais souligne également la nécessité d'une optimisation plus poussée afin d'améliorer la stabilité et ouvre la voie à des investigations approfondies in vivo ainsi qu'à des études cliniques pour confirmer ses effets et sa sécurité d'utilisation à long terme.

Perspectives et améliorations

Renforcer l'étude antimicrobienne :

- ✓ Tester différentes concentrations de HEMP pour voir si une dose plus élevée augmente l'efficacité sur *E. coli* et *S. aureus*.
- ✓ Associer HEMP avec d'autres HEs pour observer un effet synergique contre *P. aeruginosa*.
- ✓ Etudier l'effet de HEMP en milieu liquide (MIC et MBC) pour comparer avec l'antibiogramme sur gélose et afin d'obtenir une évaluation complétée de son potentiel antimicrobien.
- ✓ Tester l'activité sur des souches cliniques résistantes aux antibiotiques, pour voir si HE peut être une alternative thérapeutique.

Optimiser la formulation :

- ✓ Réaliser une version de la crème UMMTO à 0,5% d'HEMP, en conservant la même matrice, afin de vérifier si la réduction de la teneur en HE reproduit la stabilité observée dans la formulation de SAIDAL.
- ✓ Mettre en place une optimisation plus approfondie à travers un plan d'expériences factoriel couplé une analyse statistique (ANOVA), permettant d'identifier les facteurs critiques, d'analyser leurs interactions et de définir les conditions optimales de formulation de manière rigoureuse et reproductible.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Skalicka-Woźniak, K., & Walasek, M. (2014). Preparative separation of menthol and pulegone from peppermint oil (*Mentha piperita* L.) by high-performance counter-current chromatography. *Phytochemistry Letters*, *10*, xciv-xcviii.
- [2] Hudz, N., Kobylinska, L., Pokajewicz, K., Horčinová Sedláčková, V., Fedin, R., Voloshyn, M., ... & Lipok, J. (2023). *Mentha piperita*: Essential oil and extracts, their biological activities, and perspectives on the development of new medicinal and cosmetic products. *Molecules*, *28*(21), 7444.
- [3] Dajic Stevanovic, Z., Sieniawska, E., Glowniak, K., Obradovic, N., & Pajic-Lijakovic, I. (2020). Natural macromolecules as carriers for essential oils: From extraction to biomedical application. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 563.
- [4] Vieira, D. S., Menezes, M., Gonçalves, G., Mukai, H., Lenzi, E. K., Pereira, N. C., & Fernandes, P. R. G. (2015). Temperature dependence of refractive index and of electrical impedance of grape seed (*Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*) oils extracted by Soxhlet and mechanical pressing. *Grasas y Aceites*, *66*(3), e083-e083.
- [5] Delgado Ospina, J., Grande Tovar, C. D., Menjívar Flores, J. C., & Sánchez Orozco, M. S. (2016). Relación entre el índice de refracción y la concentración de timol en aceites esenciales de *Lippia origanoides* Kunth. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, *32*(2), 127-133.
- [6] Yusuf, Z., Assefa, B., Desta, M., Mengistu, S., Teneshu, J., Seyida, S., & Dugasa, D. (2022). Biological Activities of Peppermint (*Mentha Piperita* L.) Oil. *Anti-Infective Agents*, *20*(4), 64-69.
- [7] Boukhebti, H., Chaker, A. N., Belhadj, H., Sahli, F., Ramdhani, M., Laouer, H., & Harzallah, D. (2011). Chemical composition and antibacterial activity of *Mentha pulegium* L. and *Mentha spicata* L. essential oils. *Der Pharmacia Lettre*, *3*(4), 267-275.
- [8] Banafa, S. H., & Alasbahi, R. H. (2024). CHEMICAL COMPOSITION, EVALUATION OF RADICAL SCAVENGING AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF ESSENTIAL OIL LEAVES OF *MENTHA LONGIFOLIA* (L.) HUDSON SUBSP. SCHIMPERI (BRIQ.) BRIQ. CULTIVATED IN ADEN GOVERNMENT, YEMEN. *Electronic Journal of University of Aden for Basic and Applied Sciences*, *5*(4), 494-506.
- [9] Al-Mijalli, S. H., Mrabti, N. N., Ouassou, H., Sheikh, R. A., Abdallah, E. M., Assaggaf, H., ... & Mrabti, H. N. (2022). Phytochemical variability, in vitro and in vivo biological investigations, and in silico antibacterial mechanisms of *Mentha piperita* essential oils collected from two different regions in Morocco. *Foods*, *11*(21), 3466.

Références bibliographiques

- [10] Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- [11] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- [12] Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532-7546.
- [13] Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- [14] Cox, S. D., & Markham, J. L. (2007). Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 930-936.
- [15] Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & Van Griensven, L. J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model. *Molecules*, 15(11), 7532-7546.
- [16] Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., & Nazemi, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 17(2), 142-145.
- [17] Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., & Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology*, 40(1), 76-94.
- [18] Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international*, 2015(1), 759348.
- [19] Muntean, D., Licker, M., Alexa, E., Popescu, I., Jianu, C., Buda, V., ... & Danciu, C. (2019). Evaluation of essential oil obtained from *Mentha× piperita* L. against multidrug-resistant strains. *Infection and Drug Resistance*, 2905-2914.
- [20] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- [21] Marwa, C., Fikri-Benbrahim, K., Ou-Yahia, D., & Farah, A. (2017). African peppermint (*Mentha piperita*) from Morocco: Chemical composition and antimicrobial properties of essential oil. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 8(3), 86-90.
- [22] Saharkhiz, M. J., Motamedi, M., Zomorodian, K., Pakshir, K., Miri, R., & Hemyari, K. (2012). Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of *Mentha piperita* L. *International Scholarly Research Notices*, 2012(1), 718645.

Références bibliographiques

- [23] Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 501-517.
- [24] Mizushima, Y., & Kobayashi, M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169-173.
- [25] Machewar, K., Kakde, R., & Sabale, P. (2024). Evaluation of Topical Anti-Inflammatory Potential of *Mentha piperita* L. Extract by Formulation of Microemulgel. *Journal of Young Pharmacists*, 16(3).
- [26] Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., & Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International journal of cosmetic science*, 28(5), 359-370.

ANNEXES

01) - Etudes de stabilité approfondie de la formulation finale avec huile d'amande amère :

Jo :



Figure III.38 :
Observation macroscopique juste après préparation.

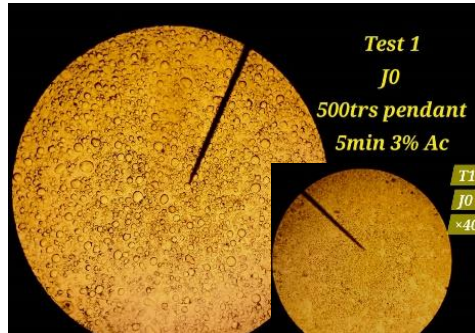


Figure III.40 : Observation microscopique (JO).

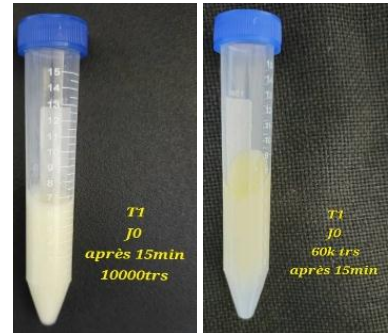


Figure III.39 : Stabilité à la centrifugation pendant 15min à 10k trs/min et 60k trs/min (JO).

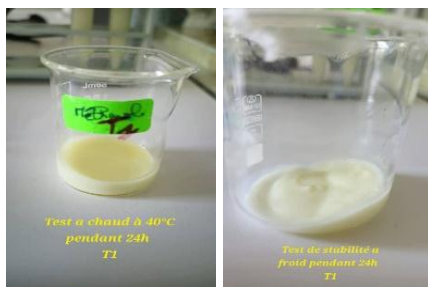


Figure III.41 : Test de déshabilité à 4°C et à 40°C après 24h.

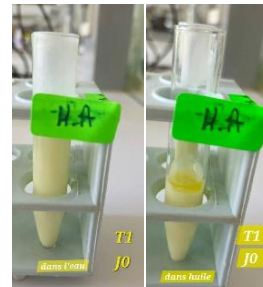


Figure III.42 : Sens de l'émulsion (JO).

J1 :

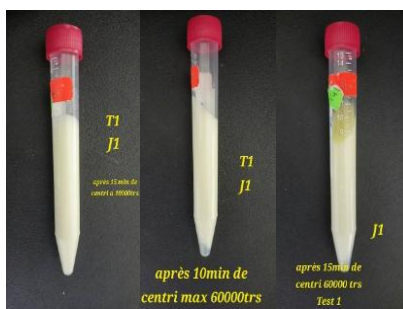


Figure III.45 : Stabilité à la centrifugation respectivement pendant 15min à 10k trs/min et pendant 10 et 15min à 60k trs/min (J1).

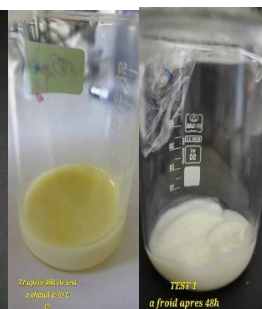


Figure III.44 : Test de déshabilité à 4°C et à 40°C après 48h.

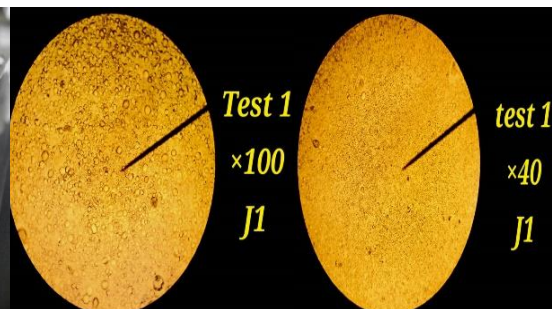


Figure III.43 : Observation microscopique (J1).

J3 :



Figure III.47 : Sens de l'émulsion (J3)

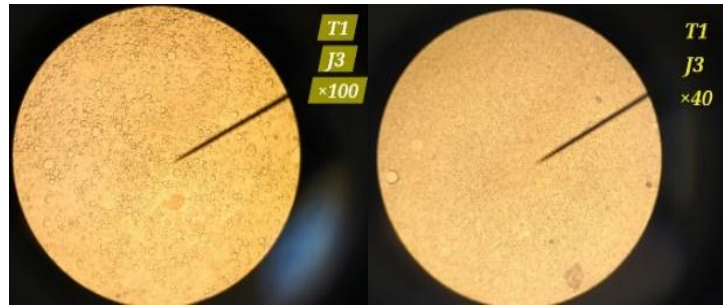


Figure III.46 : Observation microscopique (J3).



Figure III.48 : Stabilité à la centrifugation respectivement pendant 5,10 et 15min à 10k trs/min (J3).



Figure III.49 : Stabilité à la centrifugation respectivement pendant 5,10 et 15min à 60k trs/min (J3).

J8 :

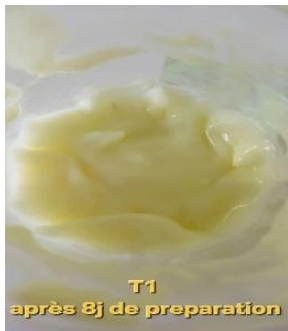


Figure III.50 : Observation macroscopique J8.

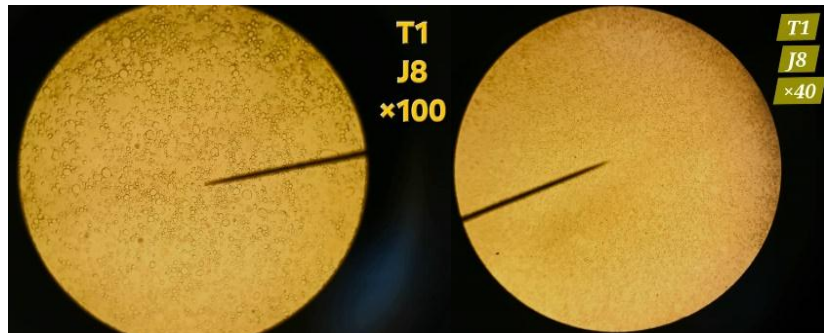


Figure III.53 : Observation microscopique (J8).

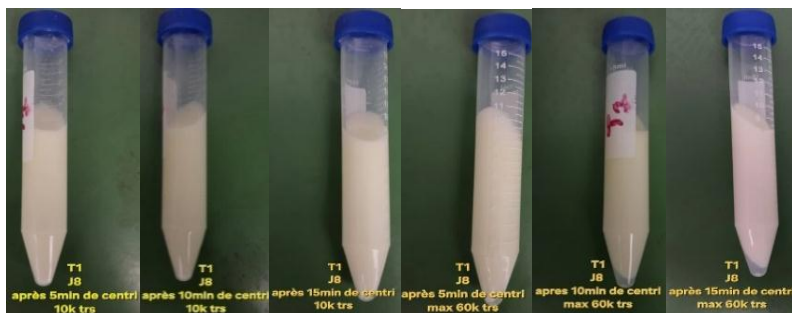


Figure III.52 : Stabilité à la centrifugation respectivement pendant 5,10 et 15min à 10k trs/min et 60k trs/min (J8).



Figure III.51 : Sens de l'émulsion (J8).

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude physico-chimique, biologique et galénique de l'huile essentielle de menthe poivrée (HEMP), en vue de développer une crème topique à effet anti-inflammatoire. Deux marques d'HEMP ont été analysées selon les normes de qualité en vigueur. L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode DPPH n'a pas révélé d'effet significatif. En revanche, une activité antibactérienne partielle ainsi qu'une activité anti-inflammatoire notable ont été mises en évidence *in vitro*. La formulation a ensuite été optimisée à travers une série d'essais portant sur les paramètres technologiques de l'émulsion. Une formulation finale stable contenant 1% d'HEMP a été obtenue, présentant de bonnes performances physico-chimiques. Ce travail ouvre des perspectives intéressantes pour l'exploitation de l'HEMP en dermatologie, malgré l'absence d'effet antioxydant marqué.

Mots-clés : Huile essentielle de menthe poivrée, activité anti-inflammatoire, activité antibactérienne, formulation topique, crème, stabilité, caractérisation physico-chimique, DPPH, émulsion, HLB

Abstract

This study focused on the physicochemical, biological, and formulation aspects of peppermint essential oil (PEO), with the aim of developing a topical anti-inflammatory cream. Two commercial PEO samples were analyzed according to pharmacopoeial standards. Antioxidant activity assessed using the DPPH method showed no significant inhibition, with values below 50%. However, HEMP exhibited selective antibacterial activity and a noteworthy anti-inflammatory effect *in vitro*. The formulation phase included optimization of emulsifiers, co-emulsifier, mixing time and speed. A stable final cream containing 1% PEO was successfully developed and passed all stability tests. These findings highlight the therapeutic interest of PEO for topical anti-inflammatory applications, while confirming the absence of relevant antioxidant properties.

Keywords: Peppermint essential oil, anti-inflammatory activity, antibacterial activity, topical formulation, cream, stability, physicochemical characterization, DPPH, emulsion, HLB.