

*Quand l'amitié est si merveilleuse elle est un don du ciel
Quand une relation amicale est si forte, elle est fraternelle*

A nos chères copines :

*MOHAND SAIDI Katia, TAFATH Hanane,
ZELLALI Lila, KHEMAR Katia, ADBELLAOUI Ouiza, AIT
BRAHAM Lilya, TEMIME Dehbia, OUSMER Katia,
AMROUCHENE Djouher et enfin FEGHOUL Rosa*

*C'est avec un grand plaisir qu'ont tiens à vous
dédier concrètement, notre amitié, notre
reconnaissance pour votre gentillesse et votre
fidélité; vous étiez toujours là pour nous. Une
présence chaleureuse, bienveillante. Sans être
sœur de sang, devenons sœur de cœurs,
partageons nos joies et soucis, et nos pires douleurs
et que ces instants partagés, deviennent notre
fortune.*

La réussite appartient à tout le monde.

C'est au travail d'équipe que

Revient le mérite !

« Franck Piccard »

Warri et Zirri...

Dédicace

Je dédie ce travail qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers parents ma mère et mon père qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que dieux vous protège

A mon frère YUVA et ma petite sœur LYNA

A la mémoire de mes grands-parents que dieu tout puissant puisse vous avoir en sa sainte miséricorde

A mon oncle Smaïl et sa femme Samia

A mes tantes Salîha, Fatîha et Kahîna

A mes cousins et cousines Damia, Thiziri, Haki, Lahcen, Akcel, Milléna, Léa et Djouher

A ma copine Yasmine

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.

A tous ceux que j'aime

THIZIRI

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ceux qui, quel que ce soit les termes utilisés, je n'arriverai jamais à leur exprimé mon amour s'incère

A ma chère mère, à mon cher père ;

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel. Ils n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs. Que ce modeste travail Soit le fruit de vos innombrables sacrifices, puisse dieu, le très haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive

A la mémoire de mon grand-père ;

Qui a toujours été dans mon esprit et dans mon cœur, je te dédie aujourd'hui ma réussite. Que dieu, le miséricordieux, t'accueille dans son éternel paradis

A ma grand-mère,

Que ce modestes travail soit l'expression des vœux que tu n'as cessé de formuler dans tes prières. Que dieu te préserve santé et longue vie.

A ma sœur Nadia et mon beau-frère Hakim, à mes frères Mohamed Arezki, Lyes et Dehame et à mes belles sœurs : Fariza, Nadia et Naima ;

Qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail et de m'avoir encouragé tous au long de mon parcours

A mes amies de toujours : Tinhinaine, Kahina, Thanina ;

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès

A tous ceux que j'aime...

Merci !

Guardia...

Remerciements

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à « Dieu le Tout Puissant » de nous avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Un grand merci à nos familles, pour leur amour, leurs conseils ainsi que leur soutien inconditionnel, à la fois moral et économique, qui nous ont permis de réaliser les études qu'on voulait et par conséquent ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à notre promotrice Dr TOUZOUIRT et à notre Co-promotrice Dr KESSAL pour nous avoir fait confiance et pour nous avoir encouragés tout au long de ce projet.

Nous remercierons Pr T. AHMED ZAID de l'école nationale polytechnique El-Harrach pour son accueil, sa confiance, sa générosité, ses conseils et l'aide qu'il nous a apporté pour la réalisation de notre travail.

Nos profondes gratitudes vont également au Pr H. CHADER et au Dr H. BENOUTTAS du département pharmaco-toxicologie du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutique (LNCPP) pour leur accueil chaleureux, leur confiance, leur générosité et qui ont toujours été à notre disposition et qui nous ont aidés de manière très cordiale.

Nous désirons aussi remercier les ingénieurs de Laboratoire de chimie organique (Mr A. KHECHIDI, Mme S. BOUHRAOUA, Mme C. KACI) et ceux du laboratoire de pharmacie galénique (Mme O. BOUZAR, Mme Z. HADJEM, et Mlle O. SEBAOUI) ainsi que ceux du laboratoire de chimie pharmaceutique (Mme D. KOULOUGLI et Mlle T. BELAZIZ) qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de ce mémoire.

Nous exprimons nos sincères remerciements au Pr H. CHADER qui nous a honoré de sa présence en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

Nos remerciements s'adressent également au Pr D. MEZIANE et à Mme A. KORD, qui ont accepté d'examiner ce travail.

Nos plus grands remerciements vont également à Mme BOUABDALLAH coordinatrice des laboratoires de chimie et Mr FETMOUCHE responsable du magasin des produits chimiques (UMMTO).

Nous remercions aussi Mr HADJSADOK et Mme BELHADJI du Département de Génie des procédés de l'université de Blida.

On tient à exprimer nos sincères remerciements pour tous nos enseignants en particulier Mme AYATI pour leur qualité d'enseignement.

On guise de reconnaissance nous tenons à témoigner nos sincère remerciement au Pr K. SADI du département Tamazight et au Mr A. HADJ-SAID directeur de la promotion culturelle/HCA pour leur traduction

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos sincères remerciements vont à tous ceux et celle qui de loin ou de près, ont permis par leurs conseils et leur aide pour la réalisation de ce mémoire.

Glossaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

Etude bibliographique

1. Emulgel	2
1.1. Définition.....	2
1.2. Composition.....	2
1.3. Voies d'administration	3
1.4. Caractérisation des emulgels	3
1.5. Types d'emulgel	3
1.6. Procédé de formulation d'emulgel.....	4
1.6.1. Généralité sur les émulsions.....	4
1.6.1.1. Définition.....	4
1.6.1.2. Caractéristiques des émulsions	4
1.6.1.3. Technique de formulation d'une émulsion stable.....	4
1.6.2. Gel	5
1.6.2.1. Définition.....	5
1.6.2.2. Préparation des gels	5
2. Généralités sur la rhéologique	5
2.1. Définition.....	5
2.2. Viscosité	6
2.3. Types de fluides	6
3. Généralités sur les plans d'expériences.....	7
3.1. Définition.....	7
3.2. Plan factoriel.....	7
4. Rosmarinus Officinalis. L	7
4.1. Habitat	7
4.2. Origine de la plante.....	7
4.3. Classification botanique.....	7
4.4. Composition chimique de Rosmarinus Officinalis L	8
4.5. Propriétés médicinales du romarin	8
5. L'huile essentielle du romarin	8

5.1.	Définition d'une HE	8
5.2.	Modes d'extraction des HE	8
5.3.	Différent type d'huile essentielle du Romarin.....	9
6.	Activités antibactérienne et pharmaco-toxicologique	10
6.1.	Etude antibactérienne.....	10
6.2.	Etude pharmaco-toxicologique.....	10
6.2.1.	Activité anti-inflammatoire	10
6.2.2.	Activité anti-oxydante	10
6.2.3.	Étude toxicologique.....	10

Matériels et méthodes

1.	Produits et matériels utilisés	11
2.	Méthode d'optimisation.....	13
2.1.	Méthodologie des plans d'expérience	13
2.1.1.	Choix des facteurs	13
2.1.2.	Choix des réponses	13
2.2.	Construction du plan.....	13
3.	Procédé de formulation	14
4.	Caractérisation d'emulgel et d'émulsion.....	15
4.1.	Taille des gouttelettes	15
4.2.	Test de résistance à la centrifugation.....	15
4.3.	Mesure de pH.....	15
4.4.	Mesure de la viscosité.....	15
4.5.	Etude rhéologique.....	15
5.	Incorporation du PA.....	15
5.1.	Tests phyto-chimiques	16
5.2.	Procédé d'extraction de l'huile essentielle	17
5.3.	Calcul du rendement	17
5.4.	Mesure de la densité	17
6.	Etude antibactérienne et pharmaco-toxicologique	17
6.1.	Etude antibactérienne.....	17
6.1.1.	Préparations	18
6.1.2.	Ensemencement.....	18
6.1.3.	Lecture.....	18
6.2.	Analyse toxico-pharmacologie	18

6.2.1.	Activité anti-inflammatoire	18
6.2.2.	Test antioxydant	20
6.2.3.	Toxicité aigue	22

Résultats et discussions

1.	Etude statistique des résultats.....	23
1.1.	Validation du modèle.....	23
1.1.1.	Adéquation du modèle.....	23
1.1.2.	Facteurs significatifs.....	24
1.1.3.	Analyse de la variance.....	25
1.1.4.	Etude des résidus	26
1.2.	Modélisation à l'aide du logiciel Modde.6	27
1.3.	Optimisation de la formule	27
2.	Caractérisation d'emulgel et l'émulsion	28
2.1.	Etude des paramètres physico-chimique	28
2.2.	Etude rhéologique	28
3.	Test phyto-chimique	30
4.	Caractérisation d'HE du romarin.....	31
a.	Caractères organoleptiques de l'huile.....	31
5.	Etude antibactérienne et pharmaco-toxicologique	32
5.1.	Activité antibactérienne	32
5.2.	Analyse pharmaco-toxicologique	32
5.2.1.	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	32
5.2.2.	Activité antioxydante d'HE du romarin	36
5.2.3.	Toxicité aigue	38
	Conclusion générale.....	39

BIBLIOGRAPH

IE ANNEXE

Amphiphile : espèce chimique possédant à la fois un groupe hydrophile et lipophile.

Antibactérienne : substance utilisée pour lutter contre les bactéries (êtres composés d'une seule cellule, dont certaines espèces sont capables de provoquer des affections).

Antibiogramme : analyse permettant de déterminer la sensibilité d'une bactérie à divers antibiotiques.

Bactérie : microorganisme formé d'une seule cellule, sans noyau, à structure très simple. Invisible à l'œil nu.

Chimiotypes : désigne une entité chimique distincte au sein d'une même espèce

Degré de liberté (DDL) : le nombre de variable aléatoires qui ne peuvent être déterminées ou fixées par une équation (notamment les équations des tests statiques).

Escherichia coli : Un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. Également appelée colibacille et abrégée en E, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie.

Fluide : c'est un milieu matériel parfaitement déformable (liquide).

Facteurs : On qualifie de facteur toute variable, obligatoirement contrôlable, susceptible d'influer sur la réponse observée.

Gélose MH : milieu de base qui permet la culture des bactéries non exigeantes.

Hydrophile : composé ayant une affinité pour l'eau et tendance à s'y dissoudre, il est également ionique.

Hydrophobe : substance non dissoute dans l'eau et qui n'a pas d'affinité polaire avec elle

Liaison covalente : c'est une liaison chimique dans laquelle deux atomes se partagent deux électrons d'une de leurs couches externes afin de former un doublet d'électrons liant les deux atomes.

Liaisons physiques intermoléculaire : c'est une liaison qui s'établit, comme son nom l'indique, entre deux molécules, de manière à maintenir une certaine cohésion entre celles-ci.

Principe actif : Substance possédant un effet thérapeutique

Réponse : grandeur mesurée afin de connaître les effets des facteurs sur le système. Il convient bien sûr que la réponse soit représentative du phénomène observé.

Staphylocoques : autrement appelé Staphylocoque à coagulase positive c'est une bactérie à gram positif de forme arrondie, très présente au niveau des fosses nasales et des mains.

Test de Fisher ou **Test F** : test statistique utilisé pour tester l'hypothèse nulle que deux lois

normales ont la même variance.

Test de Student (test t) : c'est un ensemble de tests statistiques paramétriques où la statistique de test calculée suit une loi de Student lorsque l'hypothèse nulle est vraie.

Valeur-p : appelée aussi p-value, est la probabilité pour un modèle statistique donnée sous l'hypothèse nulle d'obtenir la même valeur ou une valeur encore plus extrême que celle observée

Vitesse de cisaillement : La vitesse de cisaillement ou « gradient de vitesse » ou « taux de cisaillement», décrit la variation spatiale de la vitesse d'écoulement et mesure le cisaillement appliqué au sein d'un fluide. Elle dépend de la contrainte de cisaillement et de la nature du fluide

ABRÉVIATIONS

A.G : Agent gélifiant

B.M: Boumerdés

cP : Centipoise

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DDL : Degrés de liberté

E/H : Eau dans l'huile

F_{crit} : F critique

F_{obs} : F observé

HE : huile essentielle

H/E : Huile dans l'eau

HLB : Hydrophilic-Lipophilic Balance

HEC : Hydroxyéthylcellulose

MH : Mueller-Hinton

Pa.s : Pascal.Second

PA : principe actif

T.O : Tizi Ouzou

T.A : tension actif

y : Réponse

η_0 : Viscosité à cisaillement nul

η_∞ : Viscosité à cisaillement infini

$\dot{\gamma}$: Vitesse de cisaillement

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Procédé de formulation d'emulgel	14
Figure 2. Evaluation de l'activité anti oxydante à l'aide du DPPH.....	21
Figure 3. Représentation graphique des valeurs résultantes de la résistance à la centrifugation et de la viscosité respectivement	24
Figure 4. Histogrammes de l'influence des facteurs sur la résistance de à la centrifugation et la viscosité	25
Figure 5. Evaluation des résidus pour la résistance à la centrifugation et la viscosité.....	26
Figure 6. Courbe d'écoulement des emulgels formulés.	29
Figure 7. Courbe d'écoulement de la formule optimale.....	30
Figure 8. Le pourcentage de réduction d'œdème de l'oreille chez les souris traitées avec des différentes substances	35
Figure 9. Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.....	37
Figure 10. Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'HE de BM et de TO.....	37

Tableau 1. Principaux produits utilisés pour la préparation des émulsions.....	3
Tableau 2. Types d'émulsion.....	3
Tableau 3. Types des fluides.....	6
Tableau 4. Classification botanique de la plante du Romarin.....	7
Tableau 5. Chimiotypes de l'HE du Romarin et leurs compositions.....	9
Tableau 6. Produits et matériels utilisés.....	12
Tableau 7. Facteurs étudiés et leurs niveaux exprimés en valeurs codés et réelles.....	13
Tableau 8. Protocoles des tests phyto-chimiques.....	16
Tableau 9. Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.....	18
Tableau 10. Matériels utilisés pour l'activité anti-inflammatoire.....	19
Tableau 11. La matrice d'expérience et les réponses obtenues.....	23
Tableau 12. Valeurs de R^2 , R^2_{adj} et Q^2 pour les deux réponses étudiées.....	24
Tableau 13. Analyse de la variance pour les deux réponses.....	26
Tableau 14. Propriétés désirées pour la formule.....	27
Tableau 15. Solutions renvoyées par le logiciel Modde 6.....	27
Tableau 16. Résultat des tests phytochimique des deux plantes étudiées.....	30
Tableau 17. Caractères organoleptiques et physiques des huiles étudiées et ceux donnés par la monographie.....	31
Tableau 18. Résultats de l'analyse antibactérienne.....	32
Tableau 19. Résultats du lot témoin (xylène) et du lot test (Diclofénac 1%).....	33
Tableau 20. Résultats du lot test (l'HE de TO et l'HE de BM).....	34
Tableau 21. Résultats du lot test (émulsion avec l'HE de TO et HE de BM).....	34
Tableau 22. Activité antioxydant exprimée par l' IC_{50} (mg/ml).....	38
Tableau 23. Résultat du test préliminaire.....	38
Tableau 24. Tensions actifs pour la phase aqueuse.....	Annexe 1
Tableau 25. Tensions actifs pour la phase huileuse.....	Annexe 1
Tableau 26. Les huiles.....	Annexe 1
Tableau 27. Agent gélifiant.....	Annexe 1
Tableau 28. Les types d'émulsion.....	Annexe 2
Tableau 29. Différentes concentrations des émulsions selon la taille des gouttelettes.....	Annexe 2
Tableau 30. Classification des gels.....	Annexe 3

Introduction
Générale

Depuis la nuit des temps, les hommes ont su développé les extraordinaires vertus médicinales que recèlent les plantes, dont la connaissance et l'utilisation thérapeutique basée sur l'analyse et l'observation.

L'OMS a élaboré une stratégie pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023 dans le but de mettre à profit la contribution potentielle de la médecine traditionnelle (phytothérapie) pour la santé [1].

En effet, le territoire Algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines et les montagnes. L'Algérie recèle un grand nombre d'espèces classées en fonction de leur degré de rareté : 289 espèces assez rares, 647 espèces rares, 640 espèces très rares, 35 espèces rarissimes et 168 espèces endémiques[2]. Malheureusement, sa part du marché mondial est presque inexistante.

Ces dernières années, les huiles essentielles ont beaucoup attiré l'attention des scientifiques grâce à leur ressource naturelle et leur bienfait sur la santé, parmi elles on retrouve l'huile essentielle de romarin qui a fait l'objet de plusieurs études en raison de ses nombreuses propriétés telle que l'activité : antioxydant, antibactérienne, anti-inflammatoire...etc. Ces propriétés justifient son utilisation dans un large éventail d'application.

Les huiles essentielles possèdent un inconvénient commun, leur grande volatilité. Cependant, parmi les moyens d'éviter ce problème serait de l'utiliser sous forme de système dispersé tel que l'émulgel.

Les émulgels sont des systèmes complexes qui combinent l'émulsion et le gel. Ce sont généralement des formulations topiques à administrer sur la peau, c'est la voie la plus simple et la plus facile de délivrance de médicament.

L'objectif de ce travail est de formuler un emulgel à base de l'huile essentielle de romarin en utilisant les plans d'expériences qui nous permettra de varier plusieurs facteurs tel que: la concentration de l'agent gélifiant et celle des tensions actifs ainsi que la vitesse de formulation de l'émulgel afin d'aboutir à la meilleure formulation.

Tout au long de ce travail, plusieurs études sont élaborées à fin d'évaluer la stabilité et le comportement de notre emulgel telle que l'étude rhéologique, la viscosité et la résistance à la centrifugation. D'autre part, des tests pharmaco-toxicologiques : anti-inflammatoire, antibactérien et anti oxydant ont été effectués sur l'huile essentielle seule et sur l'émulgel afin de prouver leur efficacité thérapeutique. Notre travail développera deux grandes parties dont la première est la recherche bibliographique et la seconde est la partie expérimentale. Cette dernière est divisée à son tour en deux parties : matériels et méthodes, résultats et discussions.

Etude
bibliographique

1. Emulgel

1.1. Définition

L'emulgel est une combinaison entre un gel et une émulsion. L'agent gélifiant en phase aqueuse convertit l'émulsion en emulgel. Les systèmes huile dans eau sont conçus pour piéger les médicaments lipophiles alors que des systèmes eau dans huile sont utilisés pour encapsuler des médicaments hydrophiles. Les émulsions ont une grande capacité à pénétrer la peau, K.M. Hosny et al. ont démontré que cette pénétration est encore meilleure dans le cas des émulgels.[3]

Les emulgels présentent de nombreux avantages comme l'apparence agréable, l'étalement et le lavage facile, thixotrope, émollient, non tachant, et une durée de vie plus longue. [4-6]

1.2. Composition

L'emulgel est un mélange d'émulsion et du gel donc il est composé des phases suivantes [7]:

- **La phase aqueuse** : constituée généralement de l'eau ou d'alcool et des agents tension actifs. L'agent gélifiant est généralement dispersé dans cette phase.
- **La phase huileuse** : la phase huileuse doit de préférence être un bon solvant pour le principe actif qui assure une grande capacité de chargement du médicament de la formulation.
 - **Émulsifiants** : les agents émulsifiants sont utilisés à la fois pour favoriser l'émulsification au moment de la fabrication et pour contrôler la stabilité pendant une durée de conservation.
 - **Agent gélifiant** : le choix de l'agent gélifiant dépend de sa capacité à obtenir le profil de libération souhaité, et de ses propriétés muco-adhésives. Ces agents sont utilisés pour augmenter la consistance de toute forme posologique. Ils peuvent également être utilisés comme agents épaississants.

Les principaux produits utilisés pour la préparation des emulgels sont présentés dans tableau 1, les caractéristiques de ces produits sont détaillées dans l'annexe 1.

Tableau 1. Principaux produits utilisés pour la préparation des émulgels.

Pour l'émulsion		Pour le gel	
Phase aqueuse	Phase huileuse	Agent gélifiant	Solvant utilisé
Solvant utilisé : Eau, L'alcool	Huiles utilisé : Huile d'amande douce huile de soja, huile de ricin,	Les dérivés de cellulose	Eau
Tension actifs : Tween 20, 40, 60, 80	Tension actifs : Span 20 , 60, 40 , 80	Les carbomères	l'alcool

1.3. Voies d'administration

Les émulgels permettent un contact prolongé avec la surface qu'ils couvrent. C'est pour cette raison, qu'ils sont utilisés pour l'administration de médicaments par différentes voies telles que la voie cutanée, la voie vaginale, la voie ophtalmique.

1.4. Caractérisation des émulgels

Plusieurs tests peuvent être réalisés pour caractériser l'émulgel.[6, 7]

- Caractères organoleptiques
- pH
- Mesure de la viscosité
- Indice de gonflement
- Etude d'extrudabilité
- Etude rhéologique

1.5. Types d'émulgel

La classification des émulgels est résumée par le tableau 2.[8, 9]

Tableau 2. Types d'émulgel

Micro-émulgel	Nano-émulgel
Composé d'une microémulsion et d'un gel	Composé d'une émulsion nanométrique et un système gélifiant
Caractérisé par des propriétés non grasse, bonne consistance, facilement étalable,	Caractérisé par des propriétés non grasse, non irritante et de meilleure libération de médicament.
L'absorption et la portion d'huile augmentent la biodisponibilité en améliorant la perméabilité du médicament	En dépit de plusieurs avantages, la nanoémulsion est confrontés à des problèmes liés à une faible viscosité et une mauvaise rétention sur la peau

1.6. Procédé de formulation d'emulgel

La formulation de l'emulgel se fait en 3 étapes : [6]

- ❖ Formulation de l'émulsion H / E ou E / H.
- ❖ Formulation de la base de gel.
- ❖ Incorporation de l'émulsion dans une base de gel avec agitation continue.

1.6.1. Généralité sur les émulsions

1.6.1.1. Définition

Les émulsions sont des préparations généralement liquides, destinées à être administrées telles quelles ou à être utilisées comme excipient. Elles sont constituées par la dispersion d'un liquide sous forme de globules dans un autre liquide non miscible. La dispersion est généralement assurée grâce à la présence d'un ou de plusieurs émulsifiant qui sont le plus souvent des agents de surface ou des polymères hydrophiles.

Les émulsions peuvent être classées selon la taille des gouttelettes et la nature de la phase dispersée. La classification est donnée dans l'annexe 2.

1.6.1.2. Caractéristiques des émulsions [10]

a. Aspect

L'aspect des émulsions dépend de trois paramètres :

- ✚ La taille des gouttelettes de la phase dispersée,
- ✚ La concentration de l'émulsion,
- ✚ Le rapport d'indice de réfraction entre phase dispersante et phase dispersée.

b. Stabilité

La stabilité des émulsions est telle que leur aspect macroscopique reste inchangé au cours de la conservation. Exceptionnellement, suivant la densité des phases, un léger crémage ou une faible sédimentation peut apparaître ; dans ce cas les émulsions doivent reprendre leur aspect initial après agitation manuelle.

1.6.1.3. Technique de formulation d'une émulsion stable

Une émulsion est formée grâce à l'homogénéisation de deux phases liquides en présence d'un tension actif.

Afin de réaliser une émulsion stable il, faut tenir compte de l'échelle HLB qui permet de classer les tensioactifs selon leur lipophilie et leur hydrophilie. Ainsi, on attribue à chaque tensioactif un indice HLB, compris entre 0 et 20, traduisant le caractère du tensioactif :

- Si l'indice HLB < 8, l'amphiphile est lipophile.

- Si l'indice HLB > 12 l'amphiphile est hydrophile. (Plus la valeur est proche de 20, plus la solubilité dans l'eau est grande) [11]

La valeur HLB d'un mélange binaire est donnée par la formule suivante :

$$\text{HLB}_{\text{mélange}} = X_A \text{HLB}_A + X_B \text{HLB}_B \dots\dots\dots(1)$$

Où :

X_A : la fraction massique de tensioactif A dans la formulation.

X_B : la fraction massique de tensioactif B dans la formulation.

1.6.2. Gel

1.6.2.1. Définition

Le gel est un état de la matière. Il s'agit généralement d'une solution ou une suspension colloïdale qui subit une transformation physique ou chimique conduisant à un état semi-solide tout en conservant une grande partie du solvant à l'intérieur de sa structure.

Les gels peuvent être classés selon plusieurs critères en gel physique, chimique, micro et macrogel. Les détails de la classification sont donnés dans l'annexe 3.

1.6.2.2. Préparation des gels

L'état de gel est un état dans lequel une grande quantité de solvant est placée entre les réseaux de polymère qui sont formés par réticulation.

La structure réticulée peut être formée soit par des liaisons covalentes ou par des liaisons physiques intermoléculaires. [12]

2. Généralités sur la rhéologique

2.1. Définition

La rhéologie (rheo = couler et logos = étude) est la science de l'écoulement et de la déformation d'un fluide sous l'effet de contraintes qui lui sont appliquées. Elle se consacre à l'étude des matériaux viscoélastiques qui comportent à la fois des propriétés relatives aux liquides et aux solides.

La rhéologie est une science qui traite des propriétés mécaniques de la matière sous l'effet de la déformation. Cette technique nous permet d'accéder à des grandeurs physiques propres au matériau telles que la viscosité en écoulement et les modules viscoélastiques en régime dynamique linéaire.

La rhéologie se décompose en plusieurs sortes d'études [13, 14]:

- Rhéologie expérimentale : détermination expérimentale des relations de comportement (entre contraintes et déformation ou vitesse de déformation)

- Rhéologie structurale : explication des comportements à partir de la structure du matériau
- Rhéologie théorique : fournir des modèles mathématiques en nombre limité des comportements indépendamment de la structure microscopique

2.2. Viscosité

La viscosité joue un rôle essentiel en rhéologie, elle sert à mesurer la résistance d'un liquide à l'écoulement. Un fluide qui a une viscosité élevée s'écoule très lentement, et lorsqu'un fluide a une viscosité faible s'écoule très vite. Cette mesure peut être effectuée à l'aide d'un viscosimètre.

2.3. Types de fluides

En termes d'écoulement de fluide, on distingue deux grandes familles de fluides : le fluide newtonien et le fluide non-newtonien. [14]

Tableau 3. Types des fluides

	Fluide newtonien	Sa viscosité dynamique « η » est indépendante de la contrainte appliquée et de la durée de cisaillement
Fluide non newtonien	Fluide rhéofluidifiant	Sa viscosité diminue quand la contrainte de cisaillement ou la vitesse de déformation augmente
	Fluide rhéoépaississant	La viscosité augmente en fonction de la contrainte de cisaillement (ou la vitesse de déformation)
	Corps plastique	Caractérisé par une contrainte de cisaillement seuil τ_c en dessous de laquelle l'écoulement n'est pas possible. Lorsqu'il est soumis à une contrainte très faible, sa viscosité est tellement forte qu'il ne peut pas s'écouler.
	Thixotropie	La viscosité, à vitesse de cisaillement constante, diminue au cours du temps à condition que ce phénomène soit réversible
	Viscoélasticité	La réponse du fluide à une déformation présente à la fois un aspect élastique (contrainte proportionnelle à la déformation) et un aspect visqueux (contrainte proportionnelle à la vitesse de déformation).

3. Généralités sur les plans d'expériences

3.1. Définition

La méthodologie des plans d'expériences se base sur le fait qu'une expérience convenablement organisée, conduira fréquemment à une analyse et à une interprétation statistique relativement simple des résultats. Elle permet une recherche expérimentale planifiée pour aider l'expérimentateur à structurer sa démarche expérimentale de manière différente, à confronter et à valider ses propres hypothèses, à mieux comprendre les phénomènes étudiés et à résoudre les problèmes.[15, 16]

3.2. Plan factoriel

Ce sont les plus utilisés car les plus simples et les plus rapides à mettre en œuvre. Ils sont notés 2^k où le 2 correspond aux niveaux maximal et minimal qui délimitent le domaine d'étude d'un facteur et k est le nombre de facteurs étudiés. Pour un plan factoriel complet à k facteurs, il va donc falloir mener 2^k expériences. Le principe consiste alors à répartir, de façon optimale, les essais dans le domaine expérimental. [15, 16]

4. Rosmarinus Officinalis. L

4.1. Habitat

Le Romarin est une plante qui pousse naturellement dans les régions méditerranéennes, il apprécie les climats chauds ou modérément secs. Elle est cultivée dans le monde entier au printemps.[17, 18]

4.2. Origine de la plante

Le nom latin du Romarin est *Rosmarinus officinalis* L dont le nom rose de mer vient simplement du fait qu'il pousse spontanément au bord de la mer.[17, 18]

L'épithète spécifique "officinalis" rappelle que le Romarin est une plante médicinale.

4.3. Classification botanique

La classification botanique du Romarin est donnée par le tableau 4.[19]

Tableau 4. Classification botanique de la plante du Romarin

Classe	Famille	Ordre	Espèce	Genre
Plante	Lamiacée	Lamiales	Rosmarinus officinalis.L	Rosmarinus

4.4. Composition chimique de *Rosmarinus Officinalis* L

La composition chimique de la plante dans son ensemble dépend du lieu de croissance et de récolte ainsi que du moment de la récolte dans le cycle végétatif.

Le Romarin est composé des acides phénoliques, Diterpènes phénoliques tricycliques, Triterpènes, Flavones méthylées, Huile essentielle.

D'après la Pharmacopée Européenne, la feuille entière séchée de *Rosmarinus officinalis* L doit avoir une teneur minimale de :

- 3% de dérivés hydroxy-cinnamiques totaux, exprimés en acide rosmarinique.
- 12 ml/kg d'HE

4.5. Propriétés médicinales du romarin

Le Romarin est une plante médicinale qui possède plusieurs effets pharmacologiques : [17]

- Effet antioxydant : contre le vieillissement cellulaire.
- Contre les affections de la peau : infections, plaies, nettoyage de la peau.
- Accélère la pousse des cheveux.
- Permet de lutter contre certains agents pathogènes : antibactérien
- Il possède des qualités antiseptiques

5. L'huile essentielle du romarin

5.1. Définition d'une HE

Selon la Pharmacopée Européenne, une huile essentielle est un « produit odorant », généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage.

L'HE est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition.

5.2. Modes d'extraction des HE

Plusieurs procédés peuvent être utilisés pour extraire l'HE d'une matière végétale : [17]

- **L'entraînement à la vapeur d'eau** : il consiste à récupérer l'HE des plantes en faisant passer à travers ces dernières un courant de vapeur d'eau, ces vapeurs saturées en composés organiques volatils sont condensées et récupérées par décantation.

- **L'hydrodiffusion** : Méthode qui consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15bar) à travers la masse végétale, du haut vers le bas.
- **Extraction aux solvants volatils** : L'extraction par des solvants volatils consiste à dissoudre la matière odorante de la plante dans un solvant que l'on fait ensuite évaporer.
- **Extraction au CO₂ supercritique** : Ce procédé consiste à placer les végétaux préalablement broyés dans un extracteur puis les mettre en contact avec le CO₂ super critique qui vient d'être comprimé et chauffé à une température maximale de 40 °C. Ainsi, l'huile essentielle est dissoute et le CO₂, ici à l'état supercritique redevient gazeux et se sépare très facilement de l'huile essentielle obtenue.
- **L'hydro-distillation** : C'est la méthode la plus utilisée pour extraire les HE et pouvoir les séparer à l'état pur mais aussi de fournir de meilleurs rendements. Son principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition, les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité.

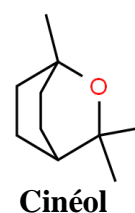
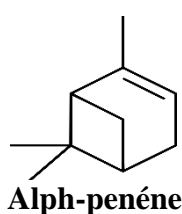
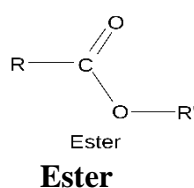
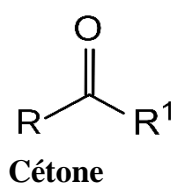
5.3. Différent type d'huile essentielle du Romarin

Il existe différents chémotypes ou chimiotypes (CT) en fonction de l'origine géographique du Romarin. Les chimiotypes et leurs compositions sont présentés dans le tableau 5. [20]

Tableau 5. Chimiotypes de l'HE du Romarin et leurs compositions.

	Composition chimique principale	Autres composés
HE de Romarin à Verbénone	Cétone (verbénone) 15 à 37% Esters (Acétate de Bornyle) 18% Monoterpènes (alpha-pénène) 15 à 34%	Cétones bornéone 1 à 15% Oxydes traces
HE de romarin Camphré	Cétone (verbénone) 15 à 37% Monoterpènes (alpha-pénène) 15 à 34%	Cétones bornéone 1 à 15%
HE de romarin à Cinéol	Oxydes (Cinéol) 40 à 50 % Monoterpènes (pinène) 25 à 35%	Cétones (Camphre) 8 à 12 %

❖ Structure chimique de certains composés de l'HE de Romarin



6. Activités antibactérienne et pharmaco-toxicologique

6.1. Etude antibactérienne

C'est une étude in vitro qui consiste à évaluer l'activité antibactérienne des différents extraits et de déterminer la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits étudiés. Plusieurs méthodes sont envisageables telles que la méthode de diffusion sur disque.[21]

6.2. Etude pharmaco-toxicologique

6.2.1. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammation est caractérisée par la réponse protectrice du système immunitaire qui implique la reconnaissance de structures pathogènes.

L'inflammation est cliniquement définie comme un processus physiopathologique caractérisé par la rougeur, l'œdème, la fièvre, la douleur et la perte de fonction.[22]

6.2.2. Activité anti-oxydante

Cette étude sert à déterminer l'activité radicalaire d'un composé et évaluer son efficacité par rapport à un antioxydant synthétique de référence (l'acide ascorbique par exemple).[23]

6.2.3. Étude toxicologique

C'est l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences néfastes liées à l'exposition à des agents physiques, chimiques ou de toute autre nature.

Elle est réalisée à partir d'études expérimentales sur l'animal selon des protocoles standardisés.

La toxicité aiguë d'une substance chimique est l'ensemble des effets sur l'organisme provoqués par une exposition de courte durée à une dose (concentration) forte.[24]

Matériels
et
Méthodes

Objectif de l'étude

L'objectif principal de cette étude est de formuler et caractériser une formulation d'émulgel à base de l'huile essentielle de Romarin pour usage pharmaceutique. L'atteinte de l'objectif principal nécessite la réalisation de quatre objectifs spécifiques à savoir :

1. L'optimisation de la composition et du procédé de formulation de l'émulgel pour avoir la formule la plus stable.
2. Évaluation de la stabilité des émulgels à long terme par une étude rhéologique
3. Extraction et caractérisation de l'huile essentielle de Romarin issu de deux régions différentes. Cette HE est utilisée comme principe actif dans la formule optimale de l'émulgel.
4. Étude microbiologique et pharmaco-toxicologique (anti-inflammatoire, anti-oxydante, toxicité aiguë) de l'HE et du produit fini.

1. Produits et matériels utilisés

• Hydroxyéthylcellulose (HEC)

L'hydroxyéthylcellulose est largement utilisée dans les formulations pharmaceutiques et principalement dans le traitement ophtalmique et topique. Il est généralement considéré comme un matériau non toxique et non irritant.

L'HEC est soluble dans l'eau chaude ou froide, formant des solutions claires, lisses et uniformes. Pratiquement insoluble dans l'acétone, l'éthanol (95%), l'éther, le toluène et la plupart des autres solvants organiques.

La poudre d'HEC est un matériau stable mais hygroscopique, ces solutions aqueuses sont relativement stables à pH 2–12. Cependant, les solutions sont moins stables en dessous de pH 5 en raison de l'hydrolyse.

• Huile d'amande douce

L'huile d'amande douce, extraite du noyau du fruit de l'amandier, est riche dans sa composition : elle contient des acides gras, dont des oméga 6 (acide linoléique) et 9 (acide oléique), des vitamines A et E, des minéraux et oligo-éléments, des phytostérols et des alcools terpéniques (qui jouent un rôle protecteur). Elle est adoucissante, émolliente et fortifiante. Elle convient à tous les types de peaux, et notamment à celles des nourrissons. Son seul inconvénient c'est qu'elle n'a pas un grand pouvoir de pénétration.

- **Tween 80**

Dérivés de l'huile d'olive, le Tween 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$) est un tensioactif et (où) émulsifiant non toxique, non ionique. C'est un liquide jaunâtre soluble dans l'eau utilisé comme agent dispersant. C'est un solubilisant et un stabilisateur de parfum ; il lubrifie et apaise la peau. Cet ingrédient est largement utilisé dans les émulsions huile dans eau (lotions, revitalisants, produits de rinçage pour la crème, shampoings, savons liquides, gommages, etc.). Le Tween utilisé dans ce travail est de la marque Biochem Chemopharma.

- **Span 80**

Ce tensioactif non ionique ($C_{24}H_{44}O_6$) peut être utilisé pour former des émulsions huile dans eau, et en combinaison avec des tensioactifs à faible HLB il peut former des émulsions eau dans huile. Le Span utilisé dans ce travail est de la marque Sigma-Aldrich.

Les autres produits et matériels utilisés sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Tableau 6. Produits et matériels utilisés.

Réactifs	Marque	Matériel du laboratoire	Equipement	Marque
Méthanol	VWR Prolabo Chemicals	Bain marie	Agitateur à hélice	(WiseSbir)
DMSO		Thermomètre	Homogénéisateur	Ultra Turrax (Ika T18 Digital)
Milieu	Gélose (MH)	Clévenger	Balance analytique (± 0.1 mg)	Devner Instrument
Matériel biologique			Balance (± 0.1 g)	(KERN 440-45N)
Escherichia Coli	ATCC 25922	Boîtes pétries	pH mètre	Hanna HI 8314
Staphylococcus aureus	ATCC 25923		Rhéomètre	Anton Paar MCR 302
			Microscope optique	Hertel Et Ressus Optic Kassel 55976
			Centrifugeuse	Hettich de type EBA20
			Micropipette	Across Ouaus
			Spectrophotomètre UV visible	Zuzi Spectrophotometer
			Viscosimètre	Brkfield Dv-I + Viscometer
			Réfractomètre	Sopelem France N°3275

2. Méthode d’optimisation

2.1. Méthodologie des plans d’expérience

La méthodologie basée sur les plans d’expérience a été utilisé afin de formuler l’emulgel avec des propriétés désirées. L’étude a été réalisée à l’aide du logiciel Modde 6.[25]

2.1.1. Choix des facteurs

La stabilité d’emulgel dépend de plusieurs facteurs tels que les conditions de préparation ainsi que la composition.

Dans notre cas les quantités en TA et AG ainsi que la vitesse d’homogénéisation sont considérés comme facteurs d’étude de la stabilité d’emulgel.

Les niveaux des facteurs étudiés sont exprimés en valeurs codés [-1 niveau inférieur ; 0 niveau moyen ; +1 niveau supérieur] et en valeurs réelles dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7. Facteurs étudiés et leurs niveaux exprimés en valeurs codés et réelles.

	Niveau		
	-1	0	+1
Tension Actif	2	2.5	3
Agent gélifiant	1	1.5	2
Vitesse d’agitation	3000	4500	6000

2.1.2. Choix des réponses :

La viscosité et la durée de résistance à la centrifugation sont les deux réponses choisies pour étudier la stabilité d’emulgel.

2.2. Construction du plan

Dans notre cas, nous avons trois variables (k) = 3. Le nombre d’essais à réaliser est composé des essais du plan factoriel (N_F), et de trois essais supplémentaires au centre (N₀). Le nombre d’essais total à réalisé est :

$$N_F + N_0 = 2^K + 3 = 11 \dots \dots (2)$$

Ce modèle du plan permet d’avoir des interactions entre les facteurs d’où l’équation du modèle plan factoriel est :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_4x_1x_2 + a_5x_1x_3 + \dots \dots (3)$$

Y : la réponse étudiée

x₁, x₂, x₃ : niveaux des deux facteurs 1, 2 et 3

$a_0, a_1, a_2, a_3, \dots$: Coefficients du modèle

1. Procédé de formulation

La préparation d'emulgel se fait en trois étapes[6]. La figure 1 résume ce procédé.

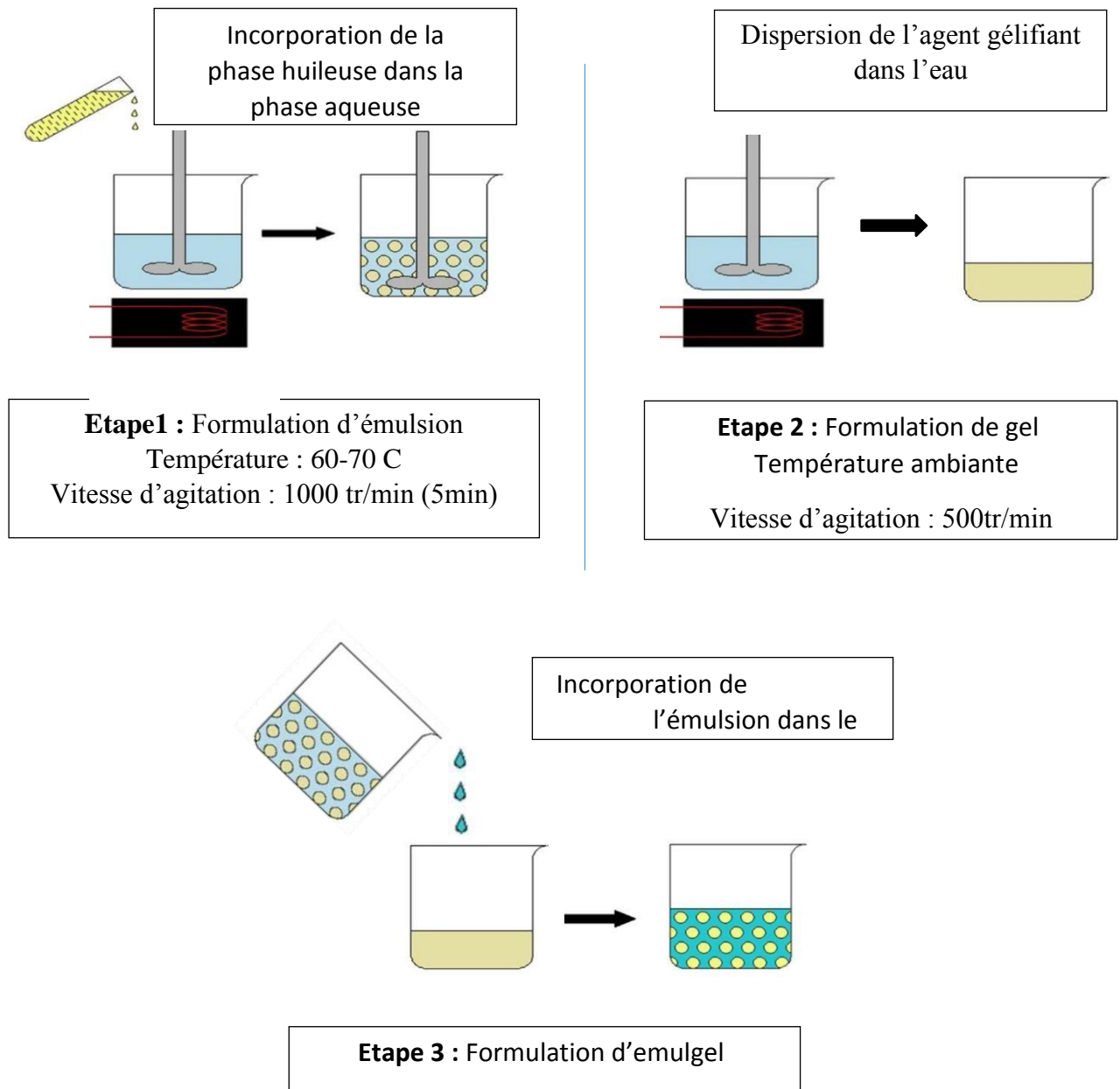


Figure 1. Procédé de formulation d'emulgel

3. Caractérisation d'emulgel et d'émulsion

4.1. Taille des gouttelettes

Pour déterminer la taille des gouttelettes des émulsions, un microscope optique lié à un logiciel Optica a été utilisé.

4.2. Test de résistance à la centrifugation

Le test de la résistance à la centrifugation a été réalisé sur les émulsions et les emulgels à des vitesses (2000, 3000, 5000) tr/min.

4.3. Mesure de pH

Une mesure du pH est réalisée pour chaque formulation d'emulgel à l'aide d'un PH-mètre.

4.4. Mesure de la viscosité

La viscosité des emulgels est déterminée à l'aide d'un viscosimètre en utilisant le mobile S64 avec une vitesse de rotation de 30tr/min à une température ambiante.

4.5. Etude rhéologique

Un rhéomètre a été utilisé pour étudier le comportement rhéologique des emulgels. Le système de mesure utilisé est le con-plan de diamètre 60 mm. Les essais ont été effectués à une température de 20°C.

4. Incorporation du PA

Après avoir fait une optimisation et aboutir à la composition et les conditions optimales de la formulation de l'emulgel, une formulation d'un produit fini a été réalisé en incorporant 1% du principe actif qui est l'huile essentielle de romarin.

L'HE a été ajouté avec les dernières gouttes de la phase huileuse de l'émulsion selon le même protocole.

La plante a été récoltée dans deux willayas différentes :

- Willaya de Tizi-Ouzou : récolté en mois de Mars 2019 plus exactement dans la région de Bouhinoune à une altitude de 300 m.
- Willaya de Boumerdés : récolté en mois d'Avril 2019 plus exactement à Boumerdes centre à une altitude de 2 m.

Les deux plantes ont été identifiées par le Professeur SMAIL du département de biologie (UMMTO)

5.1. Tests phyto-chimiques

Ce sont des réactions qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques. Les protocoles sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8. Protocoles des tests phyto-chimiques

Test	Protocole	Résultat (positif)
Saponosides	Qlq mg d'extrait + 5ml d'eau distillée. Agitation vigoureuse	formation d'une mousse stable de hauteur supérieur à 1 cm, persistant pendant plus de 15min
Stérols	5ml d'extrait + 2 gouttes d'anhydride acétique + 1 goutte d'acide sulfurique	couleur mauve ou violette
Terpenoïdes	5ml d'extrait, sont ajoutés 2ml de chloroforme et 3ml d'H ₂ SO ₄	apparition de deux phases et une couleur marron à l'interface
Flavonoïdes	5ml d'extrait bien mélangés avec 4ml d'éthanol + 1ml de HCl + qlq gramme de Mg	Apparition d'une couleur marronne très claire
Tanins	10ml d'extrait + qlq goutte de FeCl ₃	Apparition d'une couleur verte très foncé ou bleu noir
Alcaloïdes	Macéré + qlq gouttes de réactif de Mayer et de Dragendrrff	formation d'un précipité blanc avec le 1 ^{er} réactif, et un précipité rouge avec le 2 ^{ème}

❖ **Préparation de l'extrait**

10g de plante sont émergés dans l'eau chaude pendant 15 min puis filtrés.

❖ **Préparation du macéra**

1g d'organe végétale est macéré dans 10 ml de la solution de HCl à 1% pendant 24 h. Le macéré est récupéré par filtration.

5.1. Procédé d'extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro distillation type Clévenger.

150g de plante sèche (romarin) sont introduites dans un ballon de 2L rempli à 2/3 de l'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. L'huile essentielle récupérée dans de petits flacons opaques et stockée au réfrigérateur.



5.2. Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse (M') d'huile essentielle obtenue après l'extraction et la masse (M) de la matière végétale utilisée. Le rendement est exprimé en pourcentage par la formule suivante :

$$\text{RHE (\%)} = \frac{M'}{M} * 100 \dots\dots(4)$$

RHE : Rendement en huile essentielle en (%).

M' : Masse d'huile essentielle en gramme.

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme.

5.3. Mesure de la densité :

La densité permet d'avoir une idée sur le caractère physique de l'HE. La densité est donnée par l'expression suivante :

$$d = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \dots\dots(5)$$

m_0 : la masse du flacon vide.

m_1 : la masse du flacon rempli d'eau distillée.

m_2 : la masse du flacon rempli d'HE

6. Etude antibactérienne et pharmaco-toxicologique

6.1. Etude antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée avec la méthode de diffusion sur disque en milieu solide pour les deux huiles essentielles et par la méthode des puits pour les produits finis. Deux souches bactériennes de référence ont été utilisées, Staphylococcus aureus ATCC 25923, et Escherichia coli ATCC 25922.[26]

6.1.1. Préparations

Le milieu de culture (gélose MH) a été réparti dans des boîtes de pétris stériles de sorte d'avoir une épaisseur de 4mm de gélose.

L'inoculum a été préparé par le prélèvement de colonies bien isolées d'une culture jeune de 18h et les suspensionnées dans l'eau physiologique.

6.1.2. Ensemencement

Les suspensions bactériennes ont été étalées à l'aide d'un écouvillon stérile dans chaque boîte en appliquant des stries serrées sur toute la surface de la boîte et dans tous les sens. A l'aide d'une pince stérile, des disques (de 6mm de diamètre du papier Wattman) ont été placés dans les boîtes de pétri. Chaque disque a été imbibé par 5µl des HE, placebo dilué, produit fini dilué et DMSO (témoin négatif), et un volume de 10µl de produit fini a été introduit dans les puits.

Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve pendant une durée de 24 heures à 37°C.

6.1.3. Lecture

La lecture des résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse, et peuvent être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des échantillons étudiés.

Tableau 9. Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition [26]

Sensibilité	Zones d'inhibition
Non sensible (-)	Diamètre < 8mm
Sensible (+)	Diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	Diamètre compris entre 14 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	Diamètre > 20mm

6.2. Analyse toxico-pharmacologie

6.2.1. Activité anti-inflammatoire

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des emulgels et de l'huile essentielle issue de romarin portée sur le modèle d'œdème de l'oreille induit par le xylène chez les souris. Cette activité a été réalisée au niveau du département pharmaco-toxicologie du laboratoire national de contrôle des produits pharmaceutiques (LNCPP).

❖ Principe

L'effet anti-inflammatoire de la substance testé est exprimé par la capacité de cette dernière à réduire le pourcentage de réduction d'œdème au niveau de l'oreille droit sur laquelle sont appliqué de façon topique 30 µl de xylène.

Le poids de l'œdème auriculaire qui apparait chez les souris est déduit en calculant la différence de poids des disques auriculaire de 8 mm de diamètre prélevé respectivement sur l'oreille droit traité par le xylène et oreille gauche non traité. Le pourcentage de réduction de l'œdème est déterminé après avoir appliqué préalablement la substance a testé avant l'induction de l'œdème par le xylène.

Un lot témoin de souris non traité par la substance a testé, mais recevant le xylène est constitué.

La différence entre le poids moyen d'œdème du lot témoin non traité et le poids moyen traité par la substance a testé est apprécié comme étant un effet anti-œdémateux correspondant à l'activité anti-inflammatoire exercé par la substance a testé.

❖ Matériels utilisé

Tableau 10. Matériels utilisés pour l'activité anti-inflammatoire

Réactifs chimique	Réactif animal	Equipement	Petit matériel	Consommable
Xylène	Souris BLBC	Balance pour la pesé des souris	Paire de ciseau	Seringue
Ether de pétrole		Balance analytique pour la pesé des disques	Maillet	Embout
			Emporte pièce	
			Paire de pince	

❖ Préparation des animaux :

Les souris ont été pesées et marqué de 1 à 10 puis remit dans une cage sous forme d'un lot. Lot 1 : Sur lequel est appliqué le produit de référence (Diclofénac 1%)

Lot 2 : œdème témoin

Lot 3 : Sur lequel est appliqué l'échantillon à étudier

❖ Application

A T₀ : Lot 1 : On applique 100 µL de Diclofénac sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris.

Lot 2 : On applique 30µL de xylène

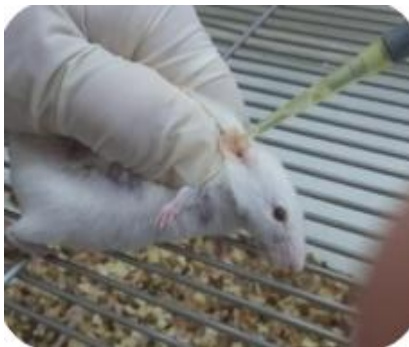
Lot 3 : On applique 100 µL d'échantillon sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris.

A T₀+1h : On applique sur les lots 1 et 2 30 µL de xylène (provoque une inflammation) sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris

Après 4h : Les souris ont été sacrifiées par asphyxie dans une enceinte fermée en utilisant l'éther de pétrole.

❖ Confection des disques :

Les deux oreilles droite et gauche des souris ont été coupées à l'aide d'une paire de ciseaux afin de confectionner des disques à l'aide d'un emporte-pièce et un marteau sur la phase interne de chaque oreille. Les disques ont été pesés avec une balance analytique.



Application



Sacrifice



Disques

6.2.2. Test antioxydant

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier l'activité antioxydant. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration bleue, due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 515-518 nm.[23]

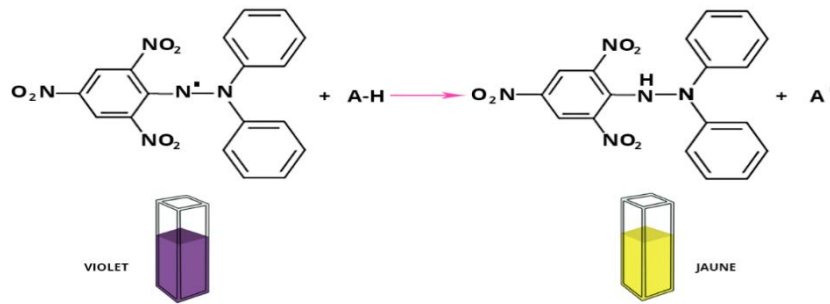


Figure2. Evaluation de l'activité anti oxydante à l'aide du DPPH

❖ Préparation des solutions

Une solution de DPPH a été préparée à une concentration de 0.032mg/ml afin d'avoir une absorbance comprise entre 0.6 et 1.

Les solutions mères ont été préparées dans le méthanol à une concentration de 100mg/ml pour les échantillons d'HE (de T.O et de BM) et une concentration de 1mg/ml pour le témoin positif (acide ascorbique).

Les solutions mères ont été diluées pour aboutir à des solutions filles de concentration 1/2, 1/10 et 1/100 pour les échantillons et à (75, 50, 25, et 12.5) % pour la solution d'acide ascorbique.

❖ Réalisation de l'essai

Le pouvoir antioxydant des échantillons étudiés et de l'échantillon témoin est mis en évidence par le mélange de 50µl de l'échantillon avec 2ml de la solution de DPPH. La lecture de l'absorbance de ce mélange est faite après 30min d'incubation à la température ambiante et à l'abri de la lumière.

❖ Détermination du pourcentage d'inhibition

L'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I%) est calculée en utilisant la formule suivante :

$$I\% = \frac{(A_b - A_e)}{A_b} * 100 \dots (6)$$

A_b : ABS du blanc

A_e : ABS de l'échantillon

Tous les essais ont été effectués en triple. Les courbes du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations sont tracées pour déterminer les concentrations qui donnent 50% d'inhibition IC50.

6.2.3. Toxicité aigue

La dose initiale de l'étude principale est sélectionnée sur la base d'une étude d'orientation dite préliminaire, où des groupes d'animaux d'un seul animal (souris BLBC) et d'un seul sexe (féminin) sont administrés initialement par voie orale avec des doses fixes soit de 5, 50, 300 ou 2000 mg/kg.

La présence ou l'absence de signes de toxicité ou de mortalité détermine l'étape suivante, c'est-à-dire : arrêt de l'essai, administration de la même dose à des animaux supplémentaires (quatre souris) ou administration immédiate d'une dose supérieure ou inférieure à un seul animal. Cette étude a été aussi réalisée au niveau de LNCPP.

❖ Protocole

Les doses de nos extraits sont administrées aux animaux individuellement de poids de 20 ± 2 gr de manière séquentielle, en utilisant une sonde gastrique et après un jeûne de 3 h.

La dose de départ pour l'étude d'orientation est choisie comme une dose qui devrait produire une toxicité évidente.

Après administration orale d'une dose de 50 mg/kg, 300 mg/kg et 2000mg/kg d'HE de T.O à trois souris (lot 1) respectivement et les mêmes doses d'HE de BM à trois d'autres souris (lot 2), ces derniers ont été observés pendant quelques jours où les signes de toxicité et de mortalité sont les deux principaux points recherchés.

Le choix de la dose utilisée dans l'étude principale dépend des résultats de l'étude préliminaire. La concentration de 2000 mg/kg de nos échantillons est choisie pour un test principal sur un lot de 04 souris. Après administration, les lots sont encore mis en observation pendant 14 jours.

Résultats

Et

Discussion

1. Etude statistique des résultats

La matrice d'expérience ainsi que les résultats des mesures réalisées sont donnée par le tableau 11.

Tableau 11. La matrice d'expérience et les réponses obtenues

N°	TA	A	V.F d'emulgel	R.C	Viscosité
1	-1	-1	-1	10	640
2	1	-1	-1	5	580
3	-1	1	-1	25	5900
4	1	1	-1	25	5000
5	-1	-1	1	10	660
6	1	-1	1	10	500
7	-1	1	1	25	5600
8	1	1	1	25	6000
9	0	0	0	20	3000
10	0	0	0	15	2860
11	0	0	0	20	2700

[TA] : Pourcentage en TA, [AG] : Pourcentage en AG, VF : Vitesse de formulation, RC : Résistance à la centrifugation.

1.1. Validation du modèle :

La validation du modèle passe par 4 étapes : l'adéquation mathématique, la détermination des facteurs significatifs et leurs interactions, l'analyse de la variance, et enfin l'étude des résidus.

1.1.1. Adéquation du modèle :

La qualité du modèle polynomial adapté est appréciée par le coefficient de détermination multiple (R^2) et le coefficient de détermination (Q^2).

R^2 mesure l'ajustement de la réponse, plus il est élevé plus le modèle est meilleur et le Q^2 traduit la capacité du modèle à traduire la réponse, plus il est élevé plus le modèle peut prédire la réponse. Pour avoir un bon ajustement, R^2 doit être supérieur à 0,8 et Q^2 doit être supérieur à 0,5.

Tableau 12. Valeurs de R^2 , R^2_{adj} et Q^2 pour les deux réponses étudiées

	R^2	R^2_{adj}	Q^2
Résistance à la centrifugation	0.957	0.892	0.652
Viscosité	0.992	0.979	0.778

Les valeurs des coefficients R^2 et R^2_{adj} indiquent une bonne qualité descriptive du modèle pour les deux réponses résistance à la centrifugation et viscosité. La représentation graphique de ces résultats est illustrée par la figure 3.

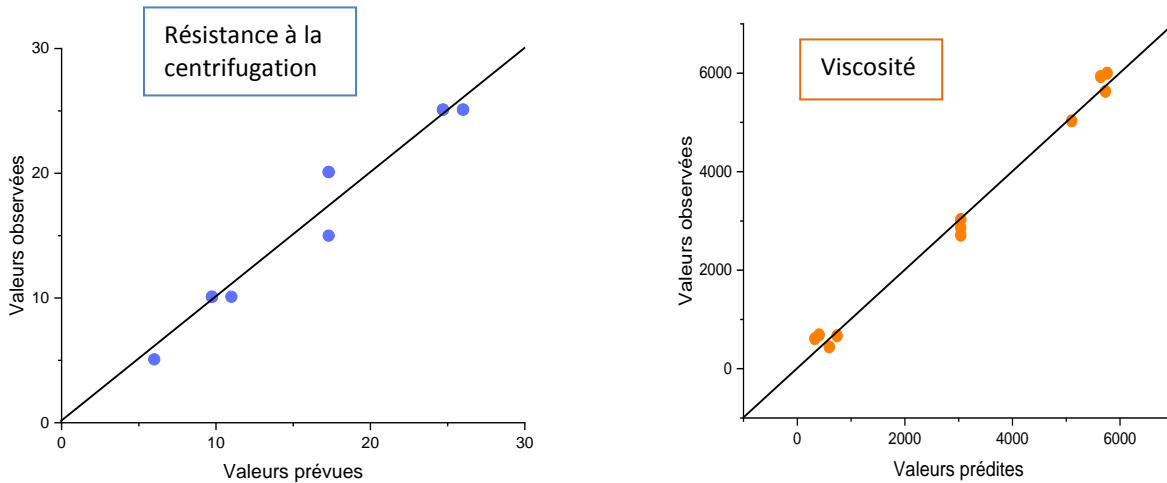


Figure 3. Représentation graphique des valeurs résultantes de la résistance à la centrifugation et de la viscosité respectivement

1.1.2 Facteurs significatifs :

L'effet d'un facteur est défini par la variation d'une réponse lorsque ce facteur passe du niveau inférieur (-1) à son niveau supérieur (1) les autres étant fixés à leurs niveaux moyens (0). Le coefficient est significatif lorsque l'intervalle de confiance (matérialisé par la barre verticale) ne coupe pas l'axe horizontal.

D'après les figures 4, le seul facteur significatif pour les deux réponses est la concentration en agent gélifiant (HEC).

Pour la viscosité ceci est expliqué par l'effet viscosifiant que possède HEC donc entre la viscosité et l'agent gélifiant une relation de proportionnalité s'impose. Ce dernier a un rôle sur la résistance à la centrifugation grâce à sa propriété viscosifiante et gélifiante qui évite la séparation des phases.

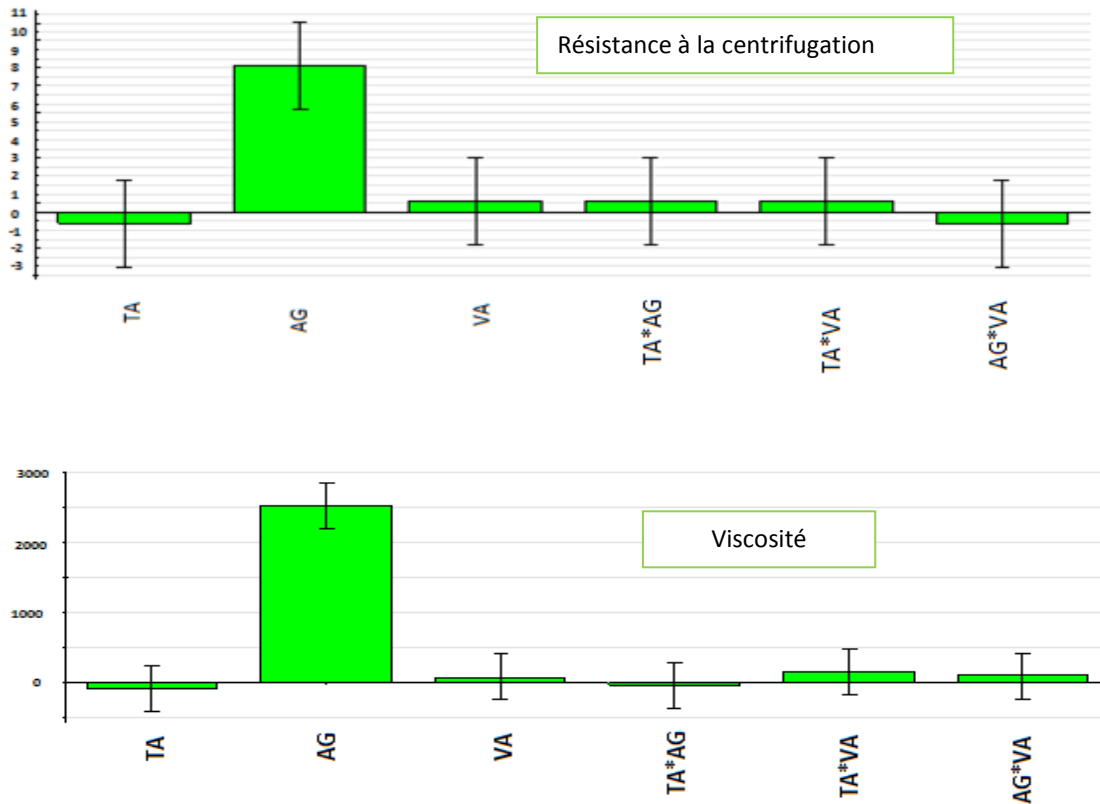


Figure 4. Histogrammes de l'influence des facteurs sur la résistance de à la centrifugation et la viscosité

1.1.3. Analyse de la variance

Les modèles avec des valeurs de p-value (la probabilité que le coefficient du modèle soit nul ou peu significatif) proches de zéro sont statistiquement significatifs et considérés comme appropriés pour décrire la réponse étudiée correspondante.

La valeur F de Fisher se calcule par le rapport du carré moyen du modèle à celui des résidus. Ce paramètre permet de calculer la probabilité que ces deux carrés ne soient pas égaux. Si F de Fisher expérimental (F_{obs}) est supérieur à F de Fisher donné par les tables (F_{crit}), les variations des réponses mesurées sont bien dues aux variations des facteurs, et le modèle est jugé valide.

D'après le tableau 13, les conditions sont respectées pour les deux réponses étudiées (la valeur de p-value est inférieure à 0.05 et F_{obs} est supérieure à F_{crit}). D'où on conclut que le modèle est valide pour ces réponses.

Tableau 13. Analyse de la variance pour les deux réponses

		Sommes des carrés	DDL	Carré moy	F _{obs}	F _{crit}	p-value
Résistance à la centrifugation	Régression	543,75	6	90,625	14.8372	4.534	0.010
	Résidus	24,4318	4	6,10796			
	Total	568,182	10	56,8182			
Viscosité	Régression	5,09798e ⁰⁰⁷	6	8,49663e ⁰⁰⁶	78.3463	4.534	0.000
	Résidus	433799	4	108450			
	Total	5,14136e ⁰⁰⁷	10	5,14143e ⁰⁰⁶			

$F_{crit} = F(\text{régression}/\text{résiduelle}) = F(6, 4, 0.05) = 4.534$ au seuil de signification de $\alpha = 0.05$

1.14. Etude des résidus :

Afin d’avoir une analyse statistique complète du modèle ; il faut s’assurer que les résidus sont distribués d’une façon aléatoire.

D’après la figure 5, on remarque que les résidus de la résistance à la centrifugation et de la viscosité sont normalement distribués.

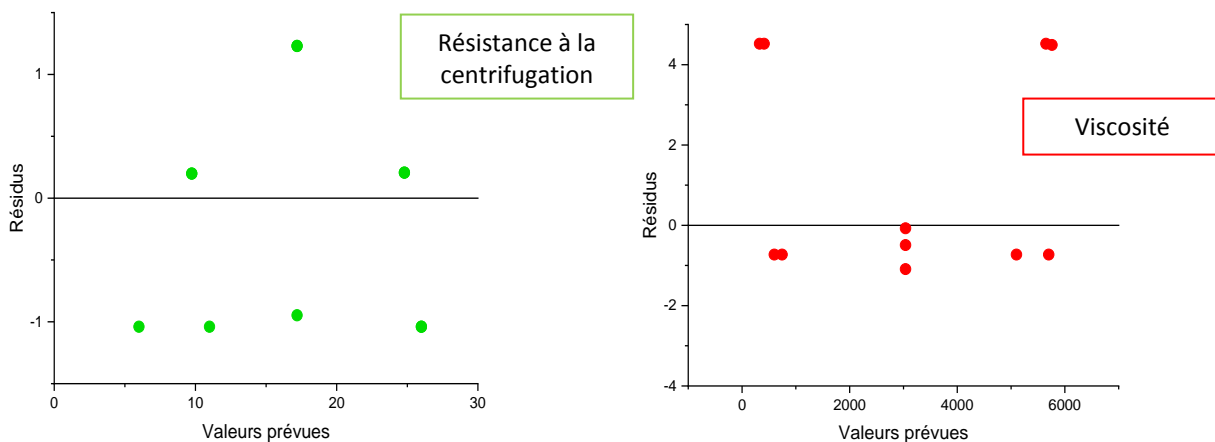


Figure 5. Evaluation des résidus pour la résistance à la centrifugation et la viscosité

D’après ces résultats, on peut conclure que notre modèle est statistiquement validé. Ce qui nous permet de procéder à l’étape de modélisation des réponses et l’optimisation de la formule.

1.2. Modélisation à l'aide du logiciel Modde 6

Les réponses peuvent être décrites par les modèles ci-dessous, où n'apparaissent que les termes significatifs

$$\text{Résistance à la centrifugation (min)} = 7.2727 + 8.125 * \text{AG} \dots \dots (6)$$

$$\text{Viscosité (cP)} = 3040 + 2515 * \text{AG} \dots \dots (7)$$

1.3. Optimisation de la formule :

L'optimisation de la formulation de l'emulgel a été faite avec le logiciel Modde 6 en utilisant le module « optimizer » après avoir validé le modèle mathématique.

Le tableau 14 donne les propriétés désirées pour la formule.

Tableau 14. Propriétés désirées pour la formule.

Réponse	Critère	Min	Valeur cible
Résistance à la centrifugation (min)	Maximum	25.0227	27.0227
Viscosité (cP)	Maximum	5484	6026

Le tableau 15 indique les solutions renvoyées par le logiciel Modde 6.

Tableau 15. Solutions renvoyées par le logiciel Modde 6.

	TA	AG	VH d'emulgel	Résistance à la centrifugation (min)	Viscosité (Cp)
1	-0.9959	0.9986	-0.8823	25.9354	5653.36
2	-1	1	-0.7	25.8352	5662.5
3	-0.9995	0.9966	-0.6726	25.791	5654.63
4	1	1	1	26.0227	5755
5	0.7772	0.9965	0.9877	25.8493	5736.75
6	0.9301	0.9914	0.9707	25.8926	5721.97

Les solutions renvoyées par le logiciel indiquent les niveaux variables de l'agent gélifiant, tension actif et de la vitesse d'agitation.

Le choix de la solution a été fait en prenant en compte :

- Du facteur économique et énergétique,
- Minimiser la quantité du tension actif,
- Avoir une viscosité adéquate pour notre formulation

Le choix a été porté sur la solution « 2 » composée de 2% du TA et de 2% d'agent gélifiant formulée à une vitesse d'agitation de 3450tr/min.

Les résultats expérimentaux de la caractérisation de cette formule optimale ont donné 25min de résistance à la centrifugation et 5700cP de viscosité ce qui indique une excellente conformité entre les modèles théorique et expérimental.

2. Caractérisation d'emulgel et l'émulsion

2.1. Etude des paramètres physico-chimique

- **Aspect** : tous les emulgels ont un aspect brillant, couleur blanche et lisse au touché
- **PH** : compris entre 6 et 6.6
- **Tailles des gouttelettes** : pour toute les émulsions la tailles des particules varient (1 – 10) micron (voir annexe 4)

2.2. Etude rhéologique

La figure 6 représente les courbes d'écoulement de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement des onze formulations des emulgels, le comportement des emulgels apparait la présence de deux zones différentes ; l'une a un comportement newtonien dans la gamme de cisaillement $< 1s^{-1}$, l'autre rhéofluidifiante s'étalent jusqu'à une valeur de cisaillement de $1000s^{-1}$. Les formulations ont un comportement rhéofluidifiant qui répond au modèle de Cross dont la formule est :

$$\eta = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + (\lambda\dot{\gamma})^n} \dots \dots (8)$$

Où λ et n sont des constantes, $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement η_0 et η_{∞} sont les viscosités respectives à cisaillement nul et infini.

Les courbes des onze formulations obtenues après modélisation sont présentées dans l'annexe 5.

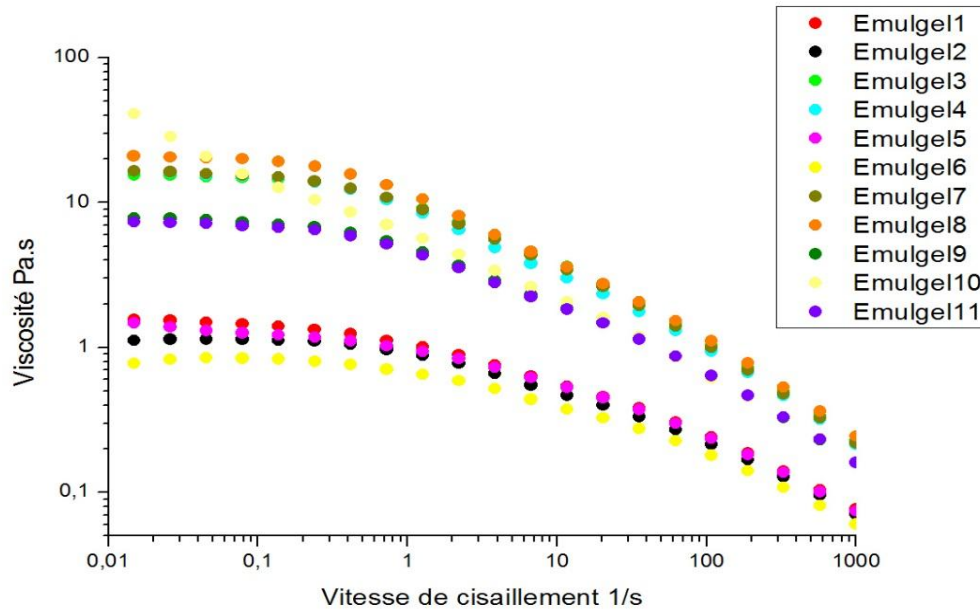


Figure 6. Courbe d'écoulement des emulgels formulés.

Au repos les emulgels 1, 2, 5, et 6 indiquent une faible viscosité de l'ordre de 1 Pa.s, à une vitesse de cisaillement critique ayant une valeur de l'ordre de 10^{-2} s^{-1} , une destruction du produit commence et la viscosité diminue.

Ces formulations sont composées de 1% d'agent gélifiant, elles ont une viscosité zéro très faible de l'ordre de 1 Pa.s. Cette faible valeur minimise la durée de contact avec la peau.

Par contre les autres emulgels étudiés ont une viscosité de l'ordre de 10 allant jusqu'à 40 Pa.s.

D'après le comportement rhéologique des formulations, la quantité en agent gélifiant qui donne les caractéristiques envisagées est 2% qui représente le niveau haut de la matrice. Ce résultat concorde avec l'optimisation faite avec le logiciel.

La figure 7 renseigne sur l'écoulement de la formulation optimale d'emulgel. La courbe d'écoulement confirme que le comportement est rhéofluidifiant, avec une viscosité au repos de 15 Pa.s.

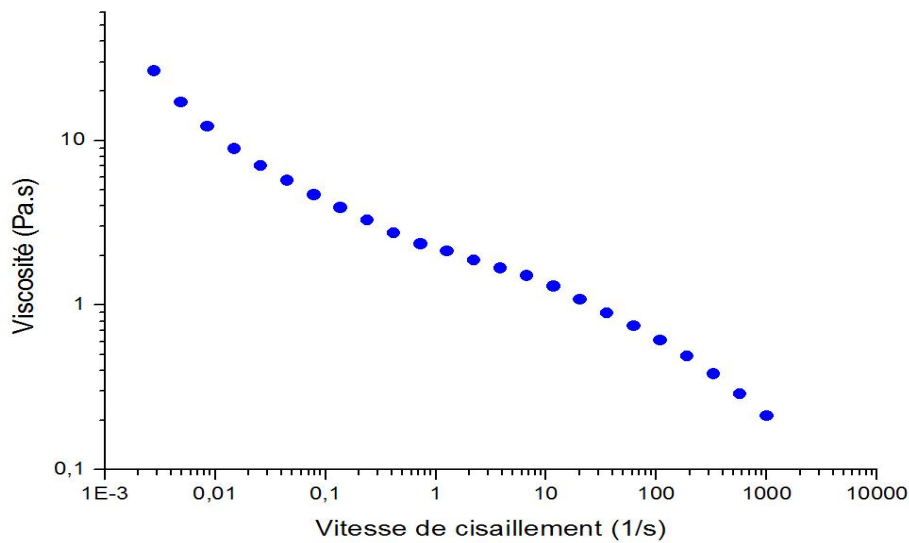


Figure 7. Courbe d’écoulement de la formule optimale

3. Test phyto-chimique

Tableau 16. Résultat des tests phytochimique des deux plantes étudiées

	Romarin de T.O	Romarin de BM
Flavonoïdes	+	+
Alcaloïdes	-	-
Tanins	++	+
Saponosides	+	++
terpènes	++	+
Stérols	-	-

- : absence, + : présence, ++ : forte présence

Parmi les principaux constituants du romarin : on trouve les flavonoïdes, les tanins et les terpènes. Les tests effectués sur nos plantes ont démontré la présence de ces trois composants et l’absence des alcaloïdes et stérol. Les tests ont démontré aussi la présence des saponosides qui ne figure pas dans la liste des principaux constituant.

Nous remarquons que la plante de T.O est riche en tanins et terpène par rapport à celle de BM qui est riche en Saponosides et cette différence est peut-être dû à la différence d’altitude.[18]

4. Caractérisation d'HE de Romarin

a. Caractères organoleptiques de l'huile :

Tableau 17. Caractères organoleptiques et physiques des huiles étudiées et ceux donnés par la monographie

1. Caractères organoleptiques		
	Aspect	Couleur
H.E de T.O	Liquide limpide	jaune pale
H.E de BM	Liquide limpide	Presque incolore à jaune pale
Caractères organoleptiques de l'huile essentielle de Romarin selon la monographie		
H.E à Verbénone	liquide mobile et transparent	incolore à jaune pâle
H.E à Camphré	liquide limpide très fluide	incolore à jaune pâle
H.E à Cineol	liquide limpide	Incolore à jaune pâle
2. Densité et indice de réfraction		
	Densité à 20 C	Indice de réfraction à 20 C
H.E de BM	0.876	1.472
B.E de TO	0.920	1.473
Densité de l'huile essentielle de Romarin selon la monographie		
	Densité à 20 C	Indice de réfraction à 20 C
H.E à vébénone	0,891 - 0,920	1,464 - 1,470
H.E à camphré	0.860 - 0.890	1.465 - 1.475
H.E à cineol	0,891 - 0,917	1,465 - 1,475
3. Rendement en %		Norme AFNOR
HE TO	0.2	0.5-2 %
HE BM	1.1	

D'après les résultats des analyses organoleptique et physicochimique de l'huile essentielle du romarin on constate que les valeurs obtenues sont conformes aux normes.

Le rendement en huile essentielle a été calculé en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne des deux plantes, l'HE de BM a fourni un rendement plus élevé que celle de TO.

Les photos démontrant les résultats des tests phytochimiques sont représenté dans l'annexe 6.

La détermination de la nature de l'HE est délicate en se basant seulement sur la densité et l'indice de réfraction. Pour déterminer la nature de l'HE, une analyse par CG-MS est indispensable.

4. Etude antibactérienne et pharmaco-toxicologique

4.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *R.officinalis.L* est des produits finis est évaluée sur deux germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*,) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C. Cette activité est évaluée par la méthode d'aromatogramme, le pouvoir antibactérien est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (mm) à l'aide d'une règle.

Les résultats de l'aromatogramme sont donnés dans le Tableau 18.

Tableau 18. Résultats de l'analyse antibactérienne

Souches bactériennes	Produits testés	DMSO	HE T.O	HE BM	Produit fini TO	Produit fini BM	placebo
	E.coli	-	10	9	-	-	-
Staphylococcus	-	11	10	-	-	-	

(-) : absence

D'après les résultats des diamètres des zones d'inhibition donnés par le Tableau 18, on remarque que les souches *E.coli* et *staphylococcus aureus* sont des souches sensibles à l'huile essentielle du romarin. ($9\text{mm} < D < 14\text{mm}$)[26]

Le résultat de cette étude pour *E.Coli* est identique à celui trouvé pour l'HE du romarin issue de Blida et de Djelfa, mais cette même étude montre une activité élevée de ces huiles contre *Staphylococcus* (diamètres d'inhibition de 23.75 et 16.75 pour l'HE de Blida et Djelfa respectivement)[26]

Les produits finis n'ont pas d'activité antibactérienne sur les souches étudiées, qui peut être dû à la faible dose des huiles essentielles utilisées ou une mauvaise libération du PA.

4.2. Analyse pharmaco-toxicologique

4.2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'effet anti inflammatoire de l'HE du romarin et de l'emulgel est basé sur la comparaison de la moyenne des différents poids des oreilles droites (OD) oreilles

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

traitées par rapport aux oreilles gauches (OG) oreilles non traitées des souris tests par rapport au moyennes des lots témoins (test de student)

$$\text{le poids d'œdème} = \frac{\sum(POD-POG)}{N} \times 100 \dots\dots\dots(9)$$

Où N : nombre de souris constituant un lot

POG : poids de l'oreille gauche

POD : poids de l'oreille droite

Le pourcentage de réduction de l'œdème est calculé selon la loi suivante :

$$\text{Le \% de réduction} = \frac{(\text{PM d'œdème témoin} - \text{PM d'œdème essai})}{\text{PM d'œdème témoin}} \times 100 \dots\dots (10)$$

Les résultats de l'effet anti-œdémateux sont rapportés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 19. Résultats du lot témoin (xylène) et du lot test (Diclofénac 1%)

	Souris	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)		POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)
Témoin (xylène)	1	2.9	2.1	0.8	Diclofénac 1%	2.8	2.4	0.4
	2	4.9	2.2	2.7		4	2.3	1.7
	3	2.5	1.9	0.6		5	2.9	2.1
	4	3.7	1.8	1.9		3.2	2.6	0.6
	5	3	2	1		3.7	2.3	1.4
	6	3.8	2.1	1.7		3.9	2.5	1.4
	7	6	2.9	3.1		3.2	2.2	1
	8	4.7	2	2.7		2.4	2.4	0
	9	6.8	2.8	4		3.9	3.4	0.5
	10	3.5	2.7	0.8		3.3	3	0.3
		Moyenne	1.93			Moyenne	0.94	
						% de réduction d'œdème	51.29	

Tableau 20. Résultats du lot test (l'HE de TO et l'HE de BM)

	Souris	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)		POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)	
	Huile essentielle de TO	1	2.3	2.4	0.1	Huile essentielle de BM	4.1	2.6	1.5
2		3.1	1.8	1.3	4.1		2.9	1.2	
3		2.1	2.4	-0.3	2.6		3.1	-0.5	
4		1.5	2.3	-0.8	4.4		2.8	1.6	
5		3.8	2	1.8	4		2	2	
6		2	2.5	-0.5	4.8		3.3	1.5	
7		2.6	2.2	0.4	2.4		2.6	-0.2	
8		2.2	2.1	0.1	2.4		2.5	-0.1	
9		2.3	2.7	-0.4	4		3.4	0.6	
10		2.1	1.8	0.3	3.4		2.6	0.8	
Moyenne				0.2	Moyenne				0.84
% de réduction d'œdème				89.63	% de réduction d'œdème				56.47

Tableau 21. Résultats du lot test (emulgel avec l'HE de TO et HE de BM)

	Souris	POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)		POD (mg)	POG (mg)	Différence (mg)	
	Emulgel avec l'HE de TO	1	3.3	2.3	1.3	Emulgel avec l'HE de BM	3.6	2.5	1.1
2		3.8	2.1	1.7	3.4		2.4	1	
3		3.7	2.4	1.3	4.2		2.7	1.5	
4		3.4	2.7	0.7	4.8		2.5	2.3	
5		2.2	2.5	-0.3	4.9		1.6	3.3	
6		3.3	2	1.3	5.4		1.6	3.8	
7		4.3	1.8	2.5	4		1.9	2.1	
8		3.4	2	1.4	3.3		2.7	0.6	
9		2.9	2	0.9	2.6		2.2	0.4	
10		3.3	2.2	1.1	4.8		3.2	1.6	
Moyenne				1.19	Moyenne				1.77
% de réduction d'œdème				38.34	% de réduction d'œdème				8.29

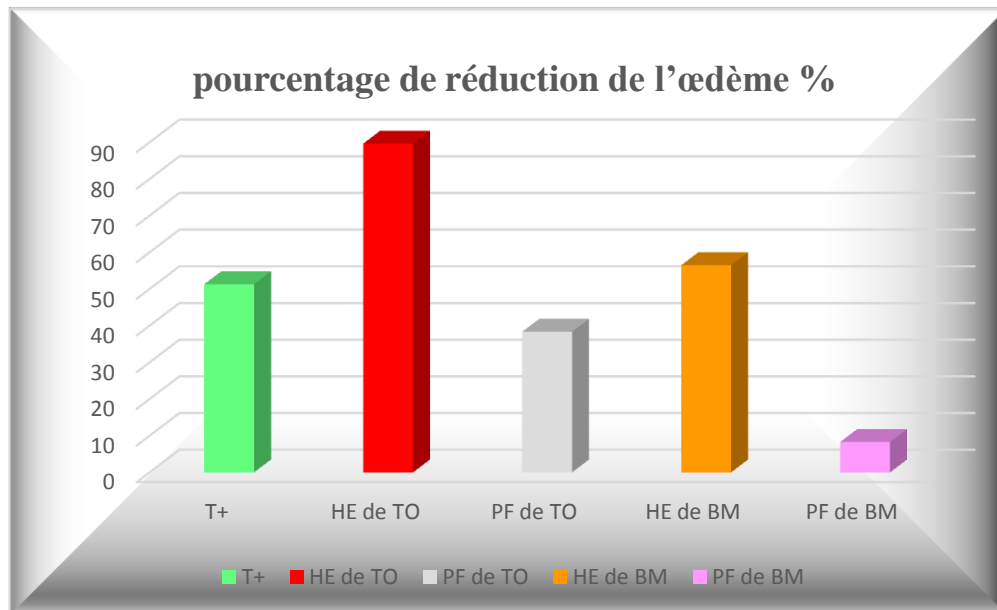


Figure 8. Le pourcentage de réduction d'œdème de l'oreille chez les souris traitées avec des différentes substances

On remarque une diminution du poids moyen de l'œdème des oreilles traitées par le Diclofénac à 1% par rapport au poids moyens de l'œdème des oreilles traitées par le xylène. La réduction d'œdème est de 51.29 %.

D'après l'étude statistique ; le teste de student a confirmé que la différence est significative ($p= 0.031$ et inférieur à 0.05)

Le lot des souris traitées par L'HE de T.O, a connu une diminution très significative ($P < 0.05$ soit $P = 0.001$) du poids moyen du l'œdème de l'oreille comparant au poids moyen du lot témoin. La réduction d'œdème est de 89.63% qui est plus élevée que la réduction donnée par le produit de référence Diclofénac 1%.

La diminution du poids moyen d'œdème des oreilles traitées par l'huile essentielle de BM est aussi significative ($P < 0.05$ soit $P = 0.028$), soit 56.47% de réduction d'œdème.

Concernant les lots de souris traités par les emulgels à base de l'HE de TO et BM, la diminution d'œdème est non significative (test de Student : $P > 0.05$), soit 38.34% et 8.29 de réduction d'œdème respectivement.

Les résultats obtenus démontrent que les deux HE sont dotées d'une activité anti-inflammatoire considérable, cette activité est démontrée avec d'autres protocole d'analyse.[27]

Le pouvoir anti-inflammatoire des HE de TO et de BM est différent malgré qu'elles proviennent d'une même espèce récoltée de deux altitudes différentes. L'étude de la composition des deux HE peut expliquer cette différence d'effet.

L. Sidali et al.[28] ont étudiés l'effet anti-inflammatoire de l'HE du *Thymus fontanesii*, plante médicinale qui appartient à la famille du Romarin (Famille des Lamiacées). Le pourcentage de réduction d'œdème de l'HE de cette plante est de 62.2%, un pourcentage proche de celui de l'HE de BM.

A noter que l'HE de TO donne le meilleur effet anti-inflammatoire, pourcentage de réduction d'œdème de 89.63%. C'est un résultat qui peut être exploité largement dans le domaine pharmaceutique.

L'absence de l'effet anti-inflammatoire pour les produits finis peut être expliquée par la faible dose des huiles essentielles utilisées ou par la mauvaise libération du PA.

4.2.2. Activité antioxydante d'HE du romarin

L'activité antioxydante des huiles essentielles a été évaluée au moyen du test DPPH

❖ Détermination Du Pourcentage D'inhibition

La mesure de l'absorbance a été effectuée par spectrophotométrie à 515 nm et à partir des résultats obtenus, les pourcentages d'inhibition ont été calculés. Les valeurs obtenues ont permis de tracer les courbes représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'acide ascorbique (figure 9), HE de BM de TO (figure 10).

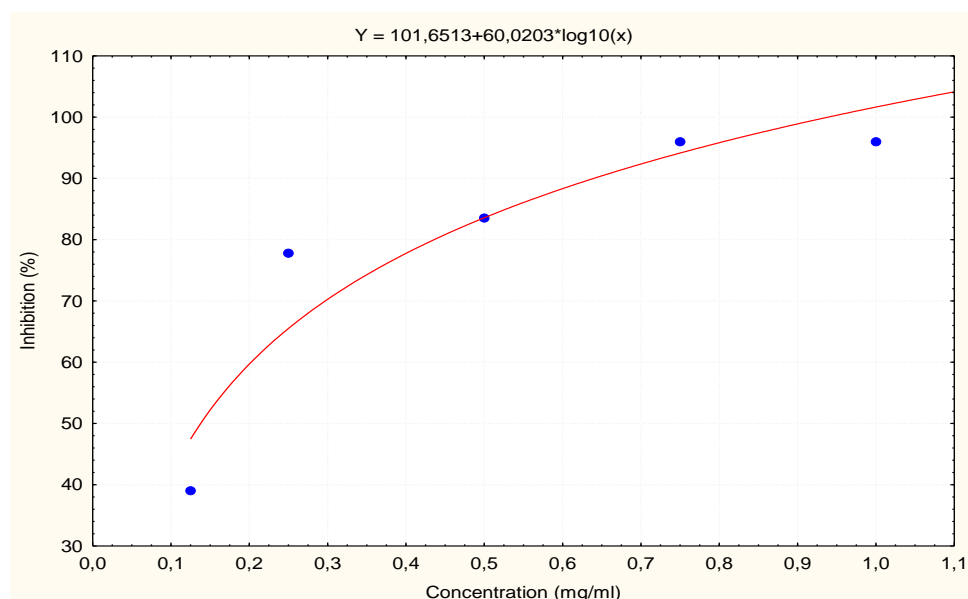


Figure 9. Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.

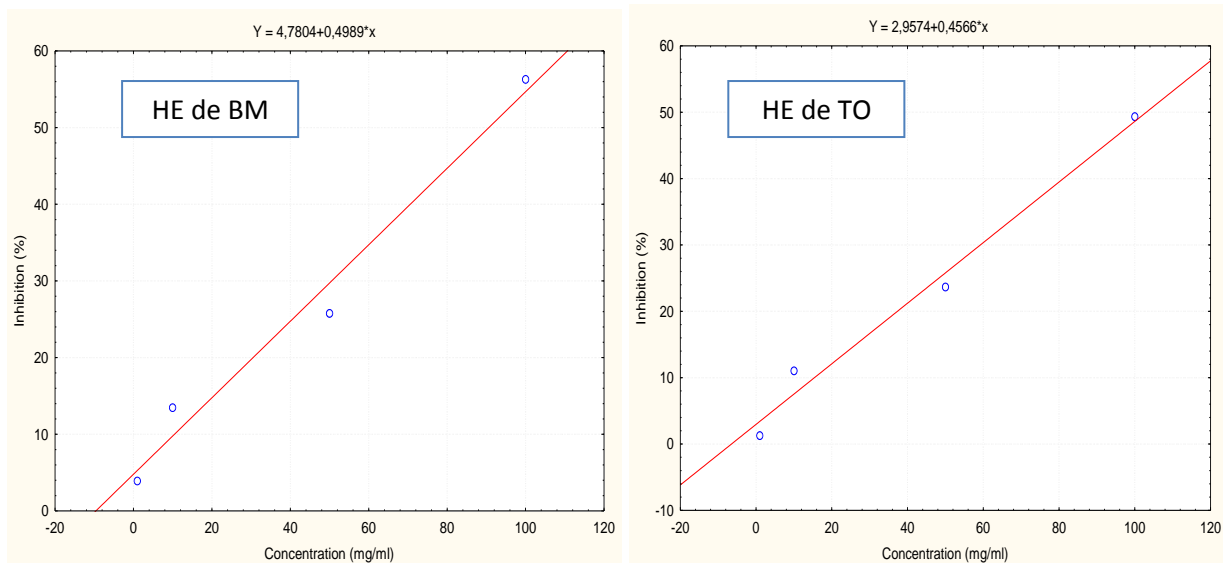


Figure 10. Pourcentage d’inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l’HE de BM et de TO.

❖ Détermination d’IC₅₀

IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydant d’un composé, car il exprime la quantité d’antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d’IC₅₀ est basse, plus l’activité antioxydant d’un composé est grande.

Les concentrations qui fournissent 50% d’inhibition (IC₅₀) sont calculées à partir des courbes des figures 9 et 10. Elles sont présentées dans le tableau 22.

Tableau 22. Activité antioxydant exprimée par l’IC₅₀ (mg/ml)

	IC₅₀ (mg/ml)
Acide ascorbique	0.1378
Huile essentielle de BM	90.637
Huile essentielle de TO	103.02

Le pouvoir antioxydant de l’acide ascorbique (témoin) avec l’IC₅₀ de 0.1378mg/ml reste supérieur à celui des deux espèces étudiées.

L’effet antioxydant de l’HE de TO et de BM avec IC₅₀ de (103.02 et 90.637) mg/ml respectivement est faible devant l’activité antioxydante de l’huile essentielle du romarin de la ville de Kala wilaya d’El Taref avec IC₅₀ de 3.09mg/ml.[29]

Ces concentrations sont significatives d'après le test de Student ($P < 0.05$ soit 0.016 et 0.26 pour l'HE de BM et de TO respectivement).

D'après ces résultats et selon la méthode du radical libre DPPH on remarque que nos huiles essentielles possèdent une activité antioxydante.

4.2.3. Toxicité aigue

❖ Résultats du test préliminaire

Tableau 23. Résultat du test préliminaire

Dose d'orientation en mg/kg par un animal par lot	Lot 1 HE T.O	Lot 2 HE BM
50	Pas de mortalité	Pas de mortalité
300	Pas de mortalité	Pas de mortalité
2000	Pas de mortalité	Pas de mortalité

Après 14 jours d'observation, aucune mortalité ni signe de toxicité n'est observé pour les doses fixes préliminaires au niveau des deux lots, pour cela, la dose de 2000 mg/kg est choisie pour l'étude principale.

❖ Résultats de l'étude principale

Aucune mortalité ni signe de toxicité n'est observé au niveau des deux lots après 14 jours d'observation, ce qui prouve l'innocuité de la dose de 2000 mg/kg des deux huiles essentielles

❖ Discussion

Les résultats de l'étude de la toxicité aiguë d'HE de TO et BM, montrent que la dose de 2000 mg/kg est non létale, donc cette dose pourra être utilisée comme une dose thérapeutique non toxique d'une forme pharmaceutique par voie orale, sachant que DL50 de l'huile essentielle du romarin est \geq à 5000 mg/kg.[30]

De ce fait on déduit que la dose de 2000 mg/kg des deux huiles essentielles pourra être utilisée comme une dose thérapeutique non toxique d'une forme pharmaceutique par voie orale.

*Conclusion
Générale*

Le présent travail est consacré à la formulation et la caractérisation d'émulgel le plus stable, ainsi la détermination des propriétés antibactérienne et pharmaco-toxicologique de l'huile essentielle de romarin utilisée comme principe actif. L'HE est extraite de la plante *Rosmarinus officinalis* L. récoltée dans deux villes différentes Tizi-Ouzou et Boumerdes.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons commencé par l'étude de la stabilisation de l'émulgel en étudiant l'influence de sa composition et des conditions opératoires ; puis une étude rhéologique des émulgels est réalisée pour déduire leur comportement.

Une fois la composition optimale est définie, le produit fini est formulé à base de l'HE et enfin des études microbiologique et pharmacotoxicologique sont réalisés.

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que :

- parmi les facteurs étudiés, le seul facteur influant est la quantité en agent gélifiant,
- L'émulgel a un comportement rhéofluidifiant,
- Les huiles essentielles de romarin issus des deux régions ont un pouvoir antioxydant et un effet anti bactérien sur *Escherichia coli* et *staphylococcus*,
- L'HE de Tizi-Ouzou possède un effet anti-inflammatoire meilleur que celle de Boumerdes,
- La dose de 2000mg/kg est une dose non létale pour les deux HE étudiées.

En perspective à la poursuite de ce travail, nous entrevoyons les points suivants :

- Caractérisation de l'huile essentielle par CG-MS,
- Réalisation du test d'irritation cutanée,
- Optimiser l'effet anti-inflammatoire pour la formule emulgel,
- Approfondir l'étude de l'activité antibactérienne en envisageant d'autres souches bactérienne et en évaluant la concentration minimale inhibitrice (CMI).
- Etudier la toxicité aigüe pour des doses supérieures à 2000mg/kg afin de déterminer la dose toxique ou mortelle.

1. *Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023*, O.m.d.l. Santé, Editor. 2013.
2. H. Ilbert, et al., *Le marché des plantes aromatiques et médicinales: Analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en Albanie et en Algérie*, in *Options méditerranéennes* 2016, Ciheam: France.
3. K.M. Hosny, et al., *Ketoprofen emulgel: preparation, characterization, and pharmacodynamic evaluation*. Int J Pharm Sci Rev Res, 2013. **20**(2): p. 306-310.
4. K. C. Ashara, K.C., et al., *Micro-emulsion based emulgel: a novel topical drug delivery system*. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 2014. **4**: p. S27-S32.
5. R. Khullar, et al., *Emulgel: A surrogate approach for topical used hydrophobic drugs*. Vol. 1. 2011. 117-128.
6. D. N. Tanaji, *Emulgel: A Comprehensive Review for Topical Delivery of Hydrophobic Drugs*. Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm, 2018. **12**(02).
7. S. Jagdale, et S. Pawar, *Gellified Emulsion of Ofloxacin for Transdermal Drug Delivery System*. Advanced pharmaceutical bulletin, 2017. **7**(2): p. 229-239.
8. K. Ashara, et al., *Microemulgel an overwhelming approach*. 2016.
9. P. Sengupta, et B. Chatterjee, *Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs*. International journal of pharmaceutics, 2017. **526**(1-2): p. 353-365.
10. P. Becher, *Emulsions; theory and practice*. American Chemical Society Monograph series,. 1957, New York,: Reinhold. 382 p.
11. J. Bibette, *Emulsion science : basic principles : an overview*. Springer tracts in modern physics,. 2002, New York: Springer. ix, 140 p.
12. F. Bounouira, *les gels, aspects théoriques et applications*, in *faculté de médecine et de pharmacie* 2015, université Mohammed V - RABAT.
13. B. P. Binks, et al., Whitby, *Rheological behavior of water-in-oil emulsions stabilized by hydrophobic bentonite particles*. Langmuir, 2005. **21**(12): p. 5307-16.
14. G. Couarraze, et J.-L. Grossiord, *Initiation à la rhéologie*. 3e éd. rev. et augm. ed. 2000, Paris: Technique et documentation. xii, 300 p.
15. J. Goupy, et L. Creighton, *INTRODUCTION AUX PLANS D'EXPÉRIENCES*. 3 ed. 2006, Paris: DUNOD. 336.
16. W. Tinsson, *Plans d'expérience: constructions et analyses statistiques*. Vol. 67. 2010: Springer Berlin Heidelberg.
17. A. M. Buronzo, *Grand guide des huiles essentielles*. 2008: Hachette Pratique

18. *La Rousse encyclopédie des plantes médicinales*. 2ème ed. 2001.
19. M. LEPLAT, *Le Romarin, Rosmarinus officinalis L., une Lamiacée médicinale de la garrigue provençale*, Faculte De Pharmacie De Marseille. 2017, Université d'Aix-Marseille: France
20. *Monographie Huile Essentielle, Rosmarinus officinalis*, Myrtéa Editor.
21. F. Denis, et al., *Bactériologie médicale: Techniques usuelles* 2007: Elsevier Masson
22. M. Ait El Cadi, et al., *Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de Zygophyllum gaetulum*. Annales Pharmaceutiques Françaises, 2012. **70**(2): p. 113-116.
23. C. Popovici, et al., *Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH*. Vol. 4. 2009. 25-39.
24. A. Bensakhria, *Toxicité Aiguë*. 2018. p. 21-28.
25. Software, MODDE. 2001, Umetrics AB.
26. Y. MOUAS, et al., *Évaluation De L'activité Antibacterienne De L'huile Essentielle Et De L'extrait Méthanolique Du Romarin Rosmarinus Officinalis L*. Revue Agrobiologia, 2017. **7** (1): p. 363 - 370.
27. I. Takaki, et al., *Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of Rosmarinus officinalis L. Essential Oil in Experimental Animal Models*. Journal of Medicinal Food, 2008. **11**(4): p. 741-746.
28. L. Sidali, et al., *Chemical composition, acute toxicity, antimicrobial and anti-inflammatory activities of Thymus fontanesii essential oil from Algeria*. PhytoChem & BioSub Journal, 2017. **11**(1).
29. A. OUIBRAHIM, *Evaluation de l'effet antimicrobien et antioxydant de trois plantes aromatiques (Laurus nobilis L., Ocimum basilicum L. et Rosmarinus officinalis L.) de l'Est Algérien.*, Faculté de biologie 2015, Université Badji Mokhtar - Annaba.
30. *Fiche technique Huile essentielle de romarin à verbénone*. Ecocert, 2017.

Annexes

Annexe 1 Principaux produits utilisés pour la formulation d'emulgel et leurs caractéristiques :

Tableau 24. Tensions actifs pour la phase aqueuse

	Description	Propriétés physique
Tween 80	Tension actif non toxique ,non ionique	Apparence :liquide jaune pâle à graisser
	C'est un solubilisant et un stabilisateur	Point d'ébullition : 695.00 à 696.00°C
	Soluble dans l'eau et l'alcool	Espace de rangement : conserver dans un endroit frais est sec et à l'abris de la lumière
Tween 60	Emulsifiant et solubilisant H/E	Apparence : pate solide jaune pale
	Améliore la stabilité des formule pharmaceutique	Espace de rangement : conserver dans un endroit frais est sec et à l'abris de la lumière
	Soluble l'eau et l'alcool	
Tween 40	Emulsifiant et agent de conditionnement	Apparence : liquide visqueux jaune pâle à orange
	Agent détoxifiant dans les shampoings (faible irritation)	Espace de rangement : conserver dans un endroit frais est sec et à l'abris de la lumière
	Soluble dans l'eau et l'alcool	
Tween 20	Tensioactif, émulsifiants non toxique, non ionique	Apparence : liquide visqueux claire jaune pale
	Solubilisant et stabilisateur de parfum	Espace de rangement : conserver dans un endroit frais est sec et à l'abris de la lumière
	Soluble dans l'eau et l'alcool	

Tableau 25. Tensions actifs pour la phase huileuse

	Propriétés	Type
Span 60	Formule moléculaire : C ₂₄ H ₄₆ O ₆	Non ionique
	Couleur : jaune pale	
	Forme : flocon	
Span 20	Formule moléculaire : C ₁₈ H ₃₄ O ₆	Utilisé comme émulsifiant, agent mouillant et lubrifiant
	Couleur : jaune pale	
	Forme : liquide visqueux	
Span 80	Formule moléculaire : C ₂₄ H ₄₄ O ₆	Non ionique
	Couleur : jaune pale	
	Forme : liquide visqueux	

Tableau 26. Les huiles

	Aspect	Application pour la santé	Composition
Huile d'argan	Saveur délicate et parfumé	Elle guérit et cicatrise les brulures	20% d'acide gras saturés
	Jaune pale	Elle agit comme antioxydant et ralentissant le vieillissement des cellules	35% d'acide gras polyinsaturés
			45% d'acide gras monoinsaturés
			Riche en vitamine E
Huile d'amande douce	Douce d'une odeur agréable	Active la guérison des brulures	8% d'acide gras saturés
	Sa saveur est extrêmement délicate	Soulage les inflammation et les irritations mineurs	70% d'acide gras monoinsaturés
			17% d'acides gras polyinsaturés
			Riche en vitamine E et A
Huile de jojoba	Couleur jaune doré, pale ou foncé	Jojoba se combine avec le sébum de la peau pour dissoudre la saleté et éliminé les impuretés	72.8% d'acide gadoleique
	Elle a une odeur très douce	Elle convient à tous les types de peau particulièrement pour les peaux sensible	14.1% d'acide érucique
	Elle fige à basse température		9.1% d'acide oléique insaponifiables
			D'acide gras monoinsaturés

Tableau 27. Agent gélifiant

	Caractéristique	type	Propriété galénique
Hydroxyméthylcellulose HPMC	Poudre blanche, incolore et sans gout	Dérivé non ionique	Agit comme agent filmogène, épaississant et émulsifiant
	Soluble dans l'eau et les solvants organique polaire Insoluble dans l'éther, l'acétone		
Hydroxyéthylcellulose HEC	Soluble dans l'eau	Dérivé non ionique	Utilisé comme agent épaississant et viscosifiant
	Hygroscopique		
	Poudre blanche, blanc jaunâtre Incolore et sans gout		
Chitosan	Poudre ou de flocons inodores, blancs ou blancs crème	Dérivé cationique	
Carbomère	Poudre hygroscopique acide, couleur blanche	Dérivés anionique	Formulations des crèmes, gels
	Légère odeur caractéristique		Agent à libération contrôlée, émulsifiant

Annexe 2 : Classification des émulsions

Tableau 28. Les types d'émulsion

Le type de la phase dispersé	Les émulsions simples :
	<p>Emulsion de type huile dans l'eau (H/E) : c.à.d. la phase huileuse est dispersée dans la phase aqueuse, appelé aussi émulsion direct.</p> <p>Emulsion de type eau dans l'huile (E/H) : c.à.d. la phase aqueuse est dispersée dans la phase huileuse, appelé aussi émulsion inverse.</p>
	Les émulsions multiples :
	Ce type d'émulsion se compose soit de deux phases lipophile et une autre hydrophile (L/H/L), ou bien de deux phases hydrophiles et une phase lipophile (H/L/H).
La taille des gouttelettes	Macroémulsions :
	Sont thermodynamiquement instable, la taille des gouttelettes dispersées est $> 1 \mu\text{m}$.
	Nanoémulsions :
	Thermodynamiquement sont aussi instable et la taille des gouttelettes est $< 1 \mu\text{m}$.
	Microémulsion :
	Les gouttelettes sont d'ordre de 10 à 100nm et sont stable thermodynamiquement.

Tableau 29. Différentes concentrations des émulsions selon la taille des gouttelettes

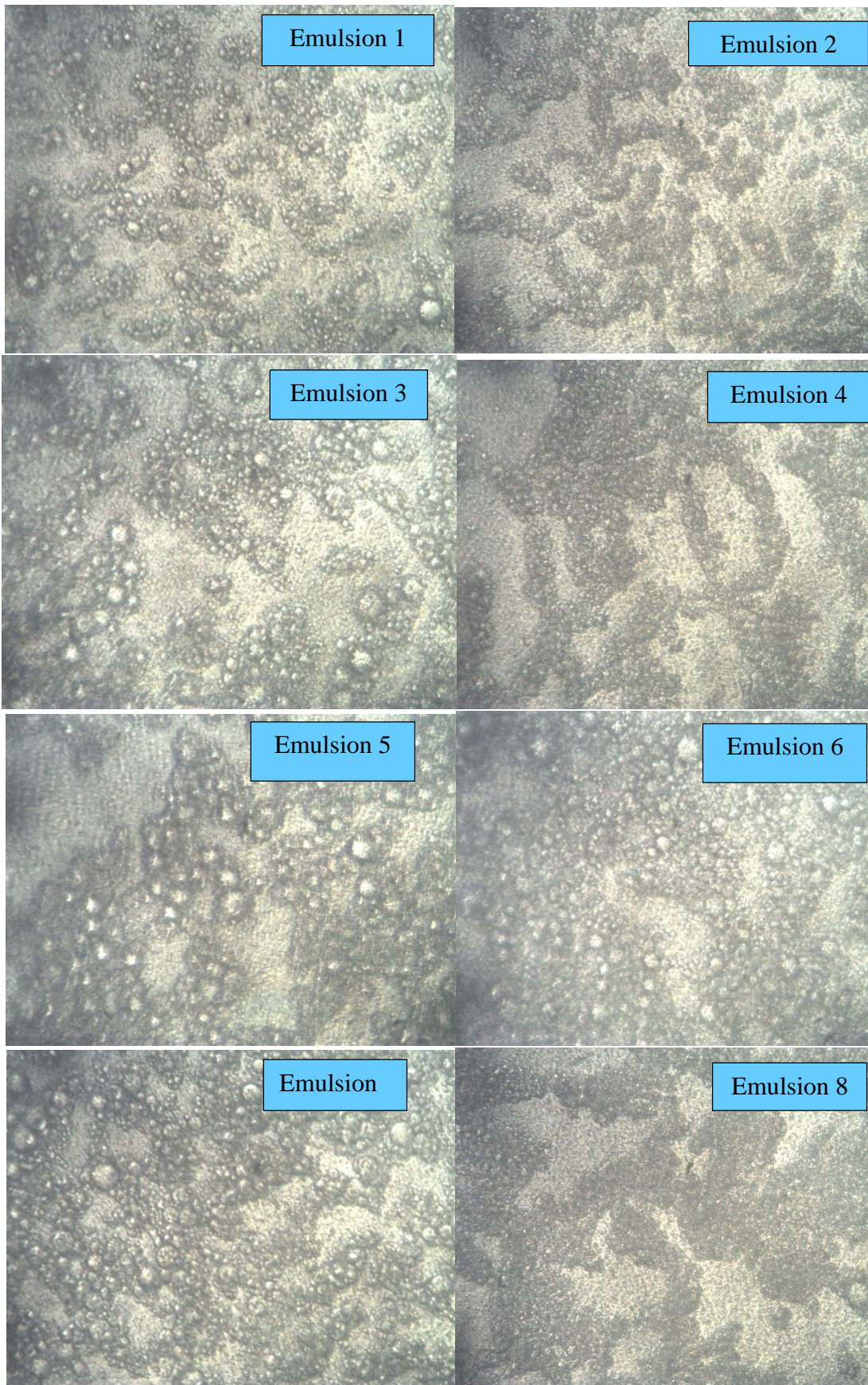
Φ	Type d'émulsion
$< 0,02$	Émulsion diluée
$0,3 < \Phi < 0,74$	Émulsion concentrée
$> 0,74$	Émulsion très concentrée

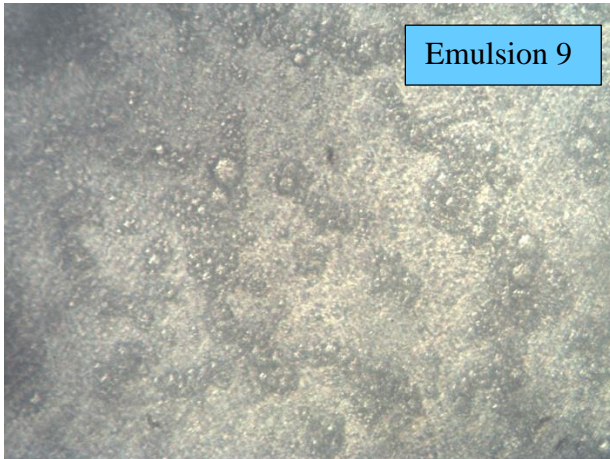
Annexe 3 : Détails de la classification des gels

Tableau 30. Classification des gels

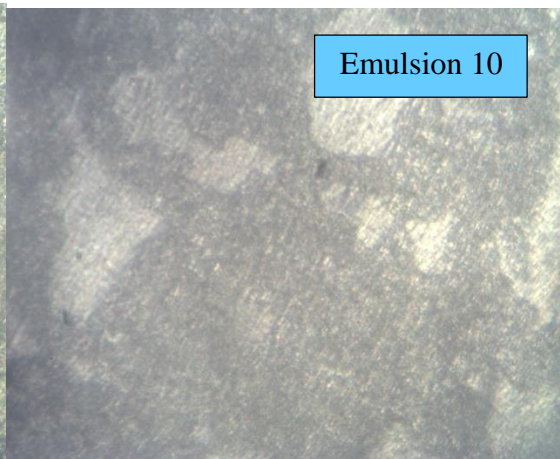
Classification général	Gel physique et gel chimique	Microgels et macrogels
Milieu de gonflement : gaz, liquide, solide	Gel physique : la réticulation n'est pas nécessaire, produite par une réaction chimique	Microgels : ce sont des gels avec la taille particule de diamètre allant de 1 à 100nm
Polymères de constitution : gel naturel, synthétique, hybride Réticulation : liaison covalente, interaction moléculaire	Les gels chimique sont constitué de chaines polymères liée entre elles par des liaisons covalentes	Macrogels : ce sont des gels avec des tailles de pore plus grandes que celle des gels de polymère gonflés

Annexe 4 : Résultats du microscope optique des émulsions

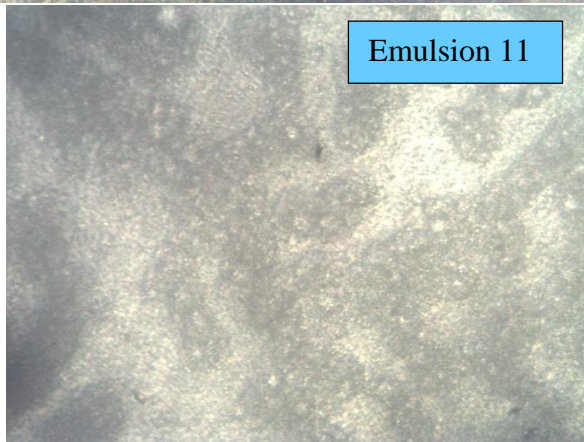




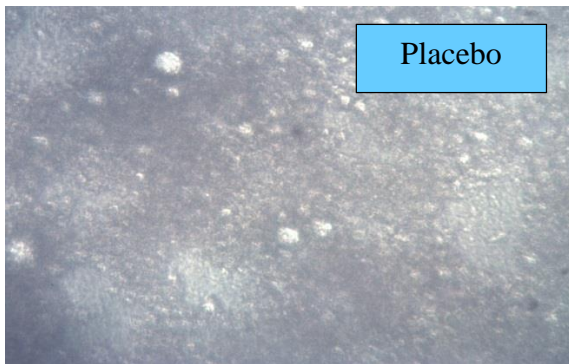
Emulsion 9



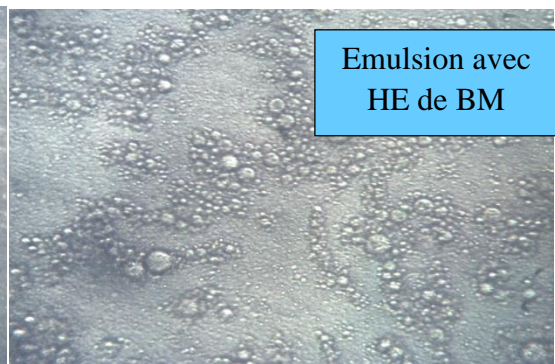
Emulsion 10



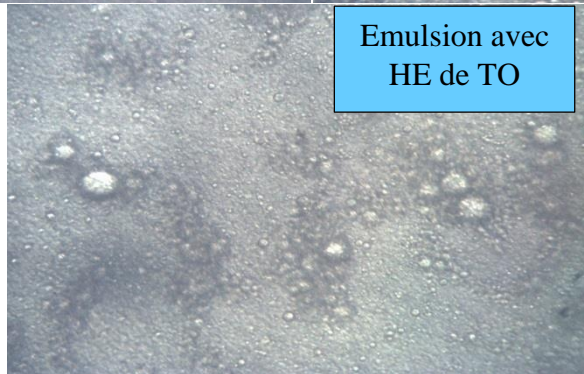
Emulsion 11



Placebo

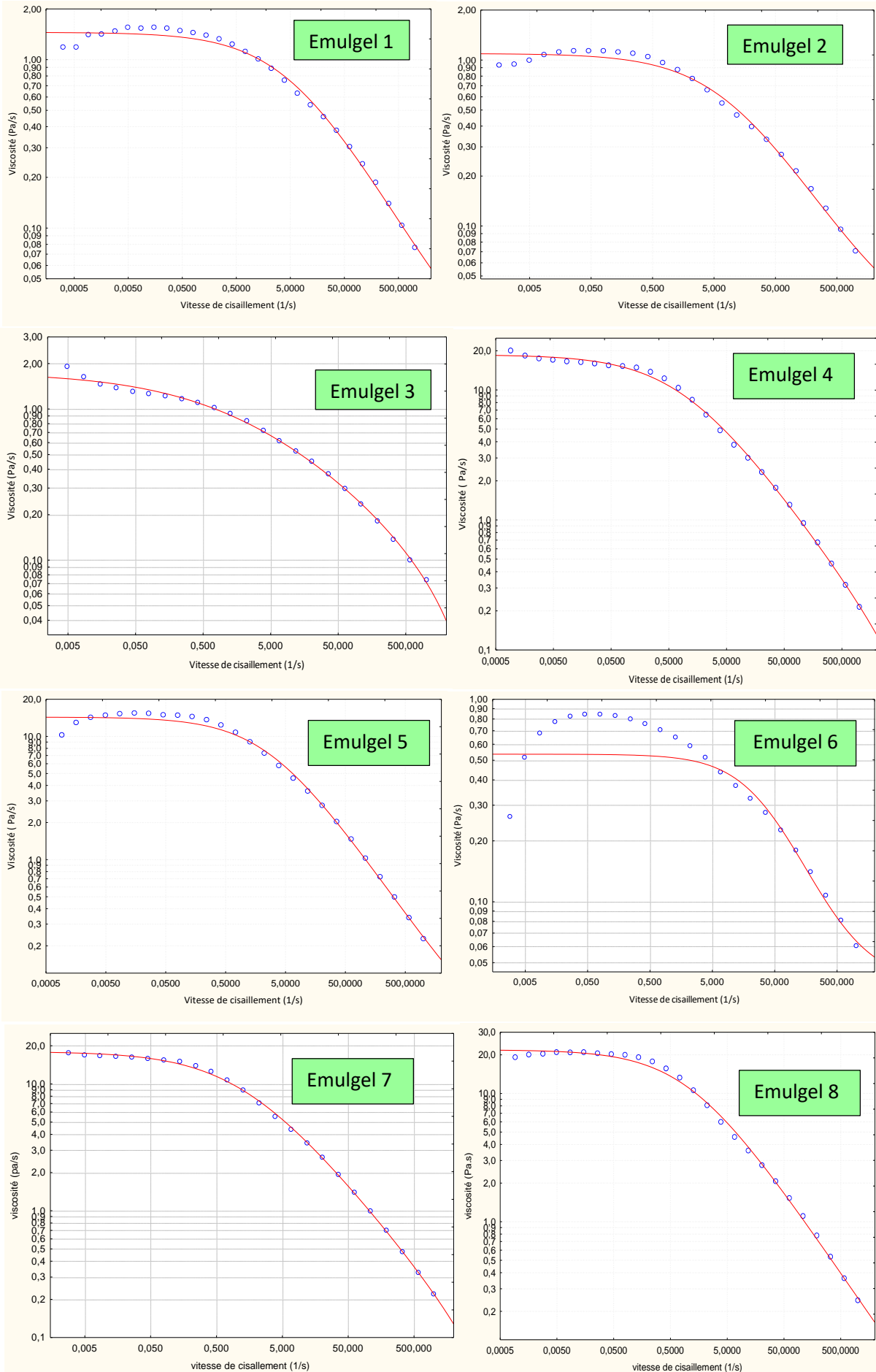


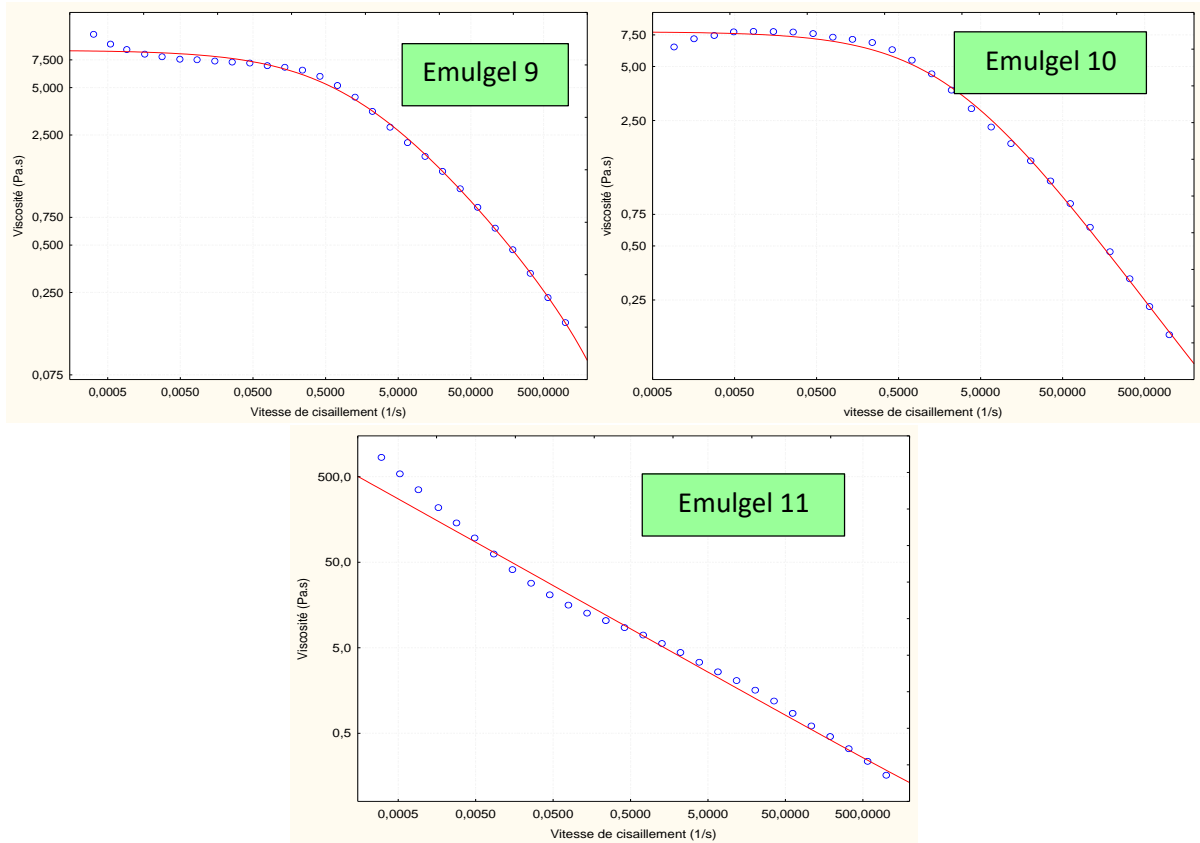
Emulsion avec HE de BM



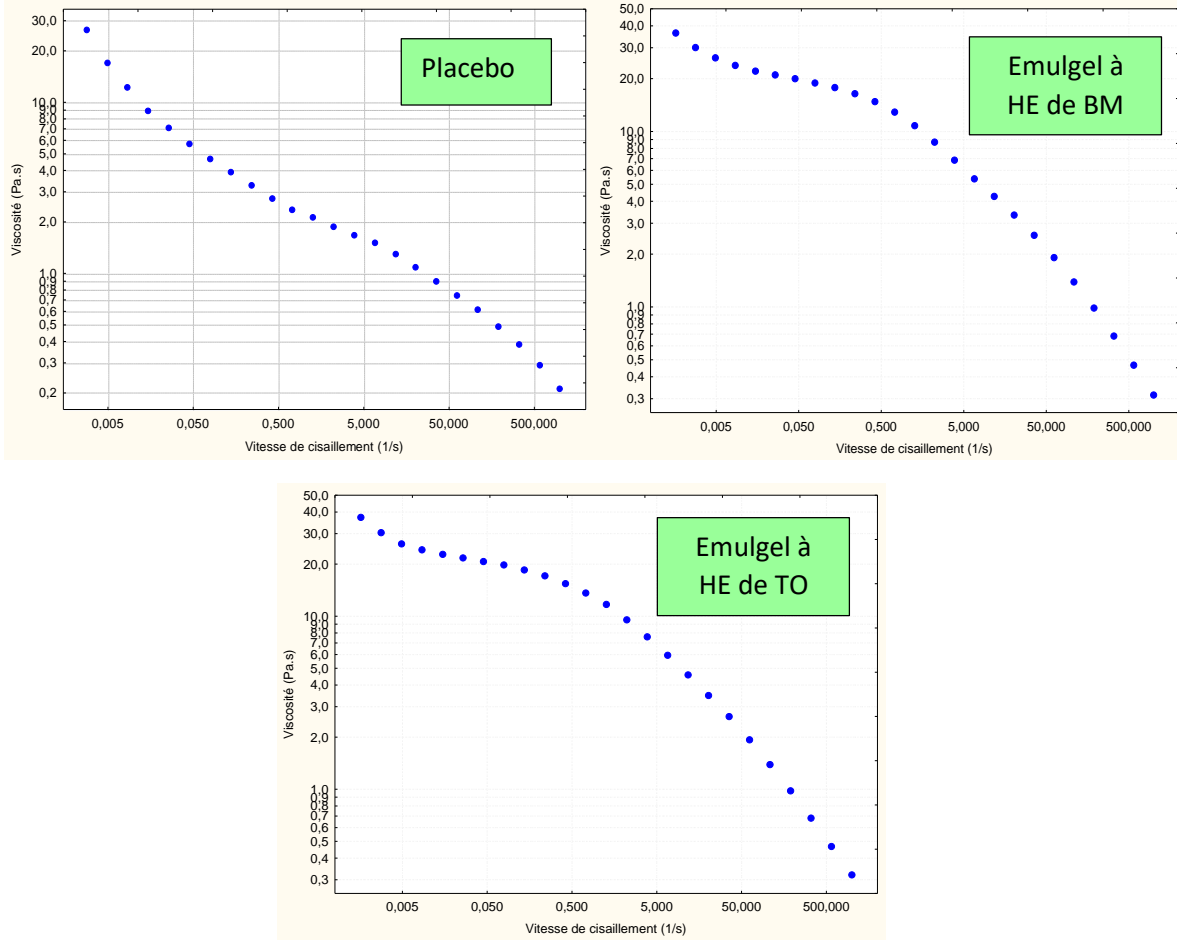
Emulsion avec HE de TO

Annexe 5 : Viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement des emulgels formulés

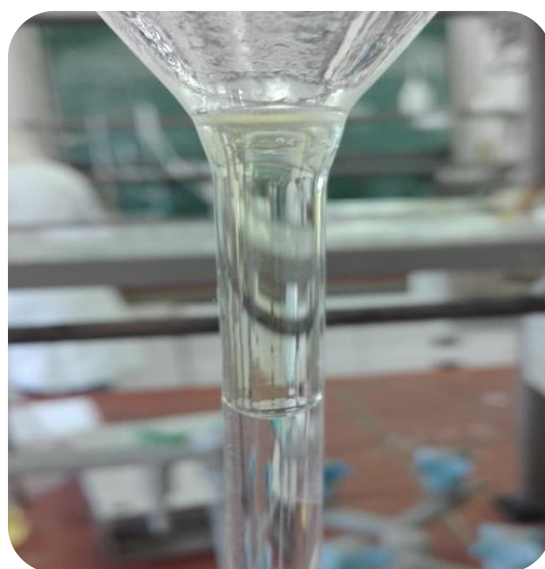




FigureX. Viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement des emulgels formulées



Annexe 6 : Tests phyto-chimiques des deux plantes du romarin et le rendement en huile essentielle



Annexe 7 : Table de Fisher-Snedecor ($\alpha= 5\%$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348
21	4.325	3.467	3.072	2.840	2.685	2.573	2.488	2.420	2.366	2.321
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297
23	4.279	3.422	3.028	2.796	2.640	2.528	2.442	2.375	2.320	2.275
24	4.260	3.403	3.009	2.776	2.621	2.508	2.423	2.355	2.300	2.255
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236
26	4.225	3.369	2.975	2.743	2.587	2.474	2.388	2.321	2.265	2.220
27	4.210	3.354	2.960	2.728	2.572	2.459	2.373	2.305	2.250	2.204
28	4.196	3.340	2.947	2.714	2.558	2.445	2.359	2.291	2.236	2.190
29	4.183	3.328	2.934	2.701	2.545	2.432	2.346	2.278	2.223	2.177
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165
40	4.085	3.232	2.839	2.606	2.449	2.336	2.249	2.180	2.124	2.077
50	4.034	3.183	2.790	2.557	2.400	2.286	2.199	2.130	2.073	2.026
60	4.001	3.150	2.758	2.525	2.368	2.254	2.167	2.097	2.040	1.993
70	3.978	3.128	2.736	2.503	2.346	2.231	2.143	2.074	2.017	1.969
80	3.960	3.111	2.719	2.486	2.329	2.214	2.126	2.056	1.999	1.951
90	3.947	3.098	2.706	2.473	2.316	2.201	2.113	2.043	1.986	1.938
100	3.936	3.087	2.696	2.463	2.305	2.191	2.103	2.032	1.975	1.927
150	3.904	3.056	2.665	2.432	2.274	2.160	2.071	2.001	1.943	1.894
200	3.888	3.041	2.650	2.417	2.259	2.144	2.056	1.985	1.927	1.878
400	3.865	3.018	2.627	2.394	2.237	2.121	2.032	1.962	1.903	1.854

