

N° d'ordre :

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

-----  
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIÈRE  
FILIERE : CHIMIE

## MÉMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

### *THEME*

Caractérisation et optimisation de la formulation d'un sirop  
pharmaceutique à base d'extrait de thym : extraction et  
caractérisation de l'HE de thym

*Présenté par :*      **Ait Fella Djamil**                      **Ait Issad Hakima**

*Soutenu publiquement, le*      06 / 07 / 2017,      *devant le Jury composé de :*

M <sup>me</sup>	<b>BELMEHDI Lila</b>	<b>MAA</b>	<b>UMMTO</b>	<b>PRESIDENTE</b>
M <sup>me</sup>	<b>KHALDI Nacima</b>	<b>MAA</b>	<b>UMMTO</b>	<b>EXAMINATRICE</b>
M <sup>me</sup>	<b>KICHOU Nora</b>	<b>MCA</b>	<b>UMMTO</b>	<b>EXAMINATRICE</b>
M <sup>me</sup>	<b>AYATI Fadila</b>	<b>MCB</b>	<b>UMMTO</b>	<b>PROMOTRICE</b>
M <sup>elle</sup>	<b>TOUZOURT Saida</b>	<b>MCB</b>	<b>UMMTO</b>	<b>CO-PROMOTRICE</b>

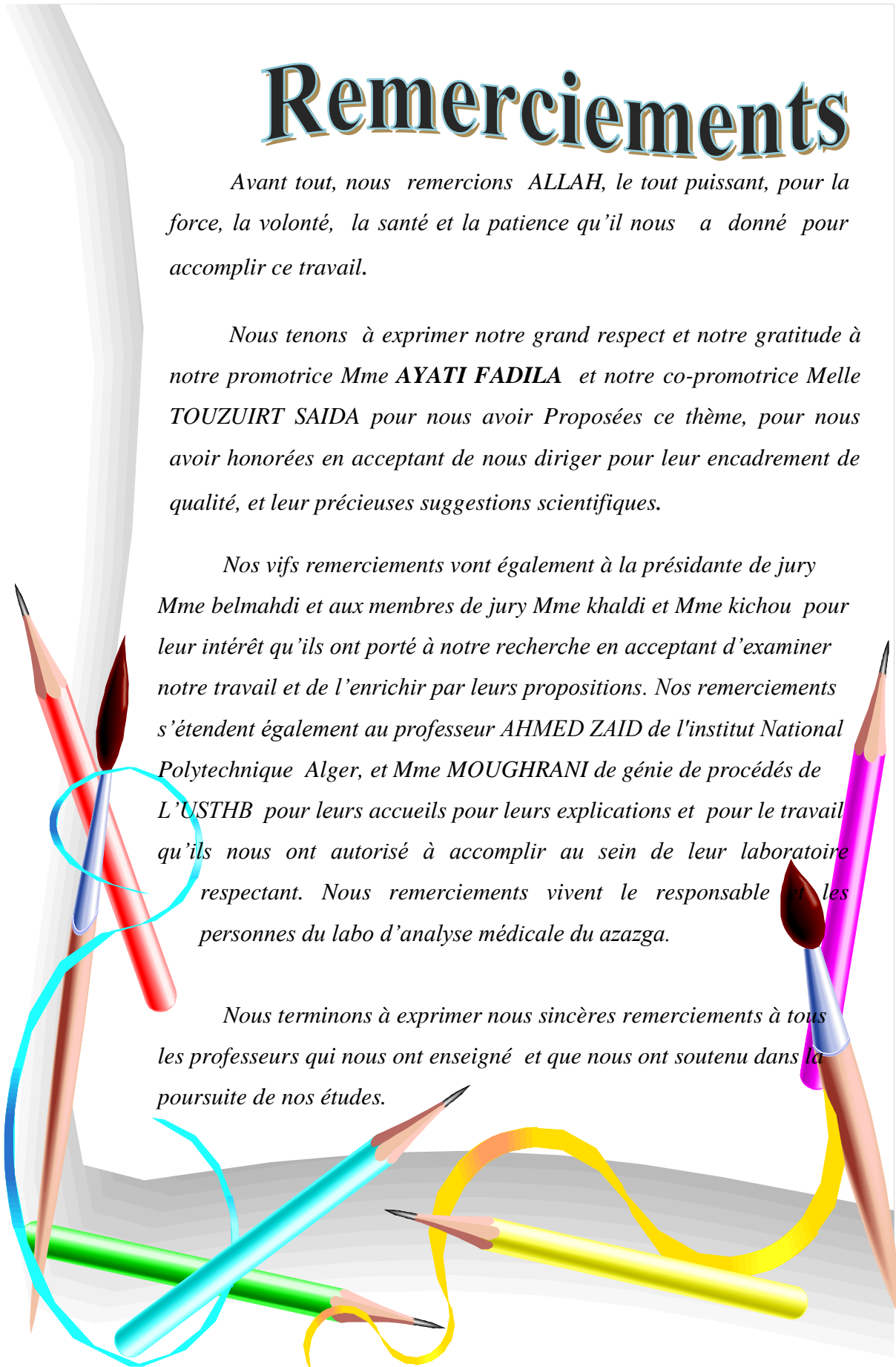
# Remerciements

*Avant tout, nous remercions ALLAH, le tout puissant, pour la force, la volonté, la santé et la patience qu'il nous a donné pour accomplir ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre grand respect et notre gratitude à notre promotrice Mme **AYATI FADILA** et notre co-promotrice Melle **TOUZUIRT SAIDA** pour nous avoir Proposées ce thème, pour nous avoir honorées en acceptant de nous diriger pour leur encadrement de qualité, et leur précieuses suggestions scientifiques.*

*Nos vifs remerciements vont également à la présidente de jury Mme belmahdi et aux membres de jury Mme khaldi et Mme kichou pour leur intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions. Nos remerciements s'étendent également au professeur AHMED ZAID de l'institut National Polytechnique Alger, et Mme MOUGHRANI de génie de procédés de L'USTHB pour leurs accueils pour leurs explications et pour le travail qu'ils nous ont autorisé à accomplir au sein de leur laboratoire respectant. Nos remerciements vivent le responsable et les personnes du labo d'analyse médicale du azazga.*

*Nous terminons à exprimer nous sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et que nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.*





## Dédicace

*Je dédie ce travail :*

- *A mes parents, qui ont été toujours présents pour Me soutenir et m'encourager ;*
- *A mes frères et sœurs ;*
- *A toutes ma famille ;*
- *A tous mes amis.*
- *A mon binôme et toute sa famille*

***AIT ISSAD HAKIMA***





## Dédicace

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail a mes chères parents qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleurs conditions et qui m'ont appris à donner le maximum pour réaliser un bon travail.

Je dédie aussi ce travail à:

**Mes chères frères et sœurs que j'estime beaucoup**

**Mon époux qui ma toujours soutenu, et à ma belle  
famille.**

**Mes amis sourtout Zahra**

**Mon très cher binôme Hakima, ainsi qu'à toute sa  
famille**

***AIT fella djamila***



# SOMMAIRE

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
 <b>CHAPITRE 1 Etude Bibliographique</b>	
1. Généralités sur les Sirops .....	3
1.1 Définition .....	3
1.2. Composition du sirop.....	3
1.3. Avantages et inconvénients des sirops .....	3
1.3.1. Avantages des Sirops .....	3
1.3.2. Inconvénients des Sirops.....	4
1.4. Formulation des sirops .....	4
1.4.1. Préparation .....	4
1.4.2. Cuite des sirops.....	5
1.5. Contrôles de qualité du sirop .....	5
1.5.1. Contrôle des caractères organoleptiques .....	5
1.5.2. Contrôle des caractéristiques physico-chimiques et biologiques .....	5
1.6. Formule quantitative.....	6
1.7. Altération et conservation du sirop .....	6
2. Plan d'expérience .....	7
2.1 Définition .....	7
2.2. Les plans de surface de réponse .....	7
2.2.1. Plans factoriels complets à deux niveaux ( $2^k$ ) .....	7
2.2.2. Les plans composites centrés .....	8
2.3. Optimisation .....	8
3. Huile essentielle de thym .....	8
3.1. Huile essentielle .....	8
3.1.1. Composition chimique des huiles essentielles .....	8
3.1.3 Procédé d'obtention des HEs .....	9
3.1.4. Analyse physico-chimique des HEs.....	9
3.2 Genre Thymus.....	10

3.2.1. Description .....	10
3.2.2 Répartition géographique.....	10
3.3. HE de thym.....	10
3.4. Activité biologique d'HE de thym .....	10
3.4.1 Activité antimicrobienne .....	10
3.4.2 Toxicité .....	11

## **CHAPITRE 2 Etude expérimentale**

### **Partie 1 Matériels et Méthodes**

1 Matériels .....	12
1.1. Matériels chimiques .....	12
1.2. Matériels biologiques .....	13
1.2.1 Matériel végétal .....	13
1.2.2 Matériel animal et milieu de culture .....	13
1.3. Matériels de laboratoire .....	13
2. Méthodes .....	14
2.1. Plan d'expérience .....	14
2.1.1. Construction des plans d'expériences .....	14
2.1.1.1 Choix de plan d'expériences.....	14
2.1.1.2 Choix des facteurs.....	15
2.1.1.3 Choix des réponses.....	16
2.1.1.4 Construction du plan composite.....	16
2.2 Expérimentation : Préparation du sirop simple .....	17
2.2.1 Mode opératoire .....	17
2.3 Caractérisation du sirop .....	18
2.3.1 Densité .....	18
2.3.2 Viscosité .....	19
2.3.3 Turbidité.....	19
2.4 Extraction d'huile essentielle de thym .....	20
2.4.1 Mode opératoire .....	20
2.4.2 Calcul de rendement .....	20
2.5 Caractérisation de l'huile essentielle (HE) extraite .....	21
2.5.1 Tests organoleptiques .....	21
2.5.2 Analyse chromatographique .....	21

2.5.3 Tests d'identification chimique de thymol dans l'huile essentielle de thym .....	21
2.6 Test microbiologique d'HE (Evaluation qualitative de l'activité anti bactérienne) .....	21
2.6.1 Préparation des disques .....	21
2.6.2 Préparation des cultures .....	22
2.6.3 Préparation des suspensions bactériennes .....	22
2.6.4 Tests de l'activité antibactérienne .....	22
2.6.5 Ensemencement .....	22
2.6.6 Lecture .....	23
2.7 Formulation de sirop à base d'extrait de thym .....	23
2.7.1 Test organoleptique et physico-chimique du sirop .....	23

## **Partie 2 Résultats et discussion**

1. Etudes statistiques des résultats .....	24
1.1 Validation de modèle.....	24
1.1.1 Adéquation de modèle .....	24
1.1.1.1 Viscosité.....	25
1.1.1.2 Densité.....	26
1.1.1.3 Turbidité.....	26
1.1.2. Facteurs significatifs .....	26
1.1.2.1 Densité.....	26
1.1.2.2 Viscosité.....	27
1.1.3 Analyse de la variance .....	28
1.1.3.1 Densité.....	28
1.1.3.2 Viscosité.....	28
1.1.4 Etude de résidus .....	28
1.1.4.1 Densité.....	29
1.1.4.2 Viscosité.....	29
1.2 Modélisation des réponses à l'aide du logiciel modde 6 .....	30
1.2.1 Modélisation de la viscosité .....	30
1.2.2 Modélisation de la densité .....	31
1.3 Phase d'optimisation .....	32
2. Etude Analytique De l'huile Essentielle .....	33
2.1 Rendement d'extraction .....	33
2.2 Résultats d'analyse d'HE de thym .....	34

2.2.1 Caractéristiques organoleptiques .....	34
2.2.2 Caractéristiques physico-chimique .....	34
2.2.3 Analyse chromatographique .....	34
2.2.4 Résultat d'identification chimique de thymol .....	34
2.3. Résultats de test microbiologiques .....	35
2.3.1. Les bactéries et les levures .....	35
3 Résultats de Tests organoleptiques et physico-chimique de la formulation finale.....	36
Conclusion.....	36
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>38</b>
<b>Bibliographie</b>	
<b>Annexes</b>	

## Liste des abréviations et des symboles

**BPF** bonne pratique de fabrication

**Con** Concentration

**CG/SM** Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

**Cp** centi-poise

**CPG** chromatographie en phase gazeuse

**D** Diamètre

**E.coli** Escherichia coli

**Fobs** F observé

**Fcrit** F critique

**HE** Huile essentielle

**HEs** Huiles essentielles

**M-H** Mülleur Hinton

**NTU** Unité de Turbidité Néphélométrique

**PA** Principe Actif

**Phar.Eur** pharmacopée européenne

**Tem** température

**tr/min** tour par minute

**Tr** Temps de rétention

**UFC** Unité Faisant Colonie.

**Vit** vitesse d'agitation

**μL** Microlitr

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> thym.....	10
<b>Figure 2:</b> Montage pour formulation d'un sirop simple.....	18
<b>Figure 3:</b> viscosimètre rotatif .....	19
<b>Figure 4:</b> Turbidimètre.....	19
<b>Figure 5:</b> Montage d'hydro distillation utilisé.....	20
<b>Figure 6:</b> Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées de la densité et de la viscosité.....	25
<b>Figure 7:</b> Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées de la turbidité.....	26
<b>Figure 8:</b> Histogramme de l'influence des coefficients sur la densité.....	27
<b>Figure 9:</b> Histogramme de l'influence des coefficients sur la viscosité.....	27
<b>Figure 10:</b> Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour la densité.....	29
<b>Figure 11:</b> Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour la viscosité.....	29
<b>Figure 12:</b> valeurs de $R^2$ et $Q^2$ en fonction des réponses.....	30
<b>Figure 13:</b> Courbe iso-réponse de la viscosité en fonction de la température et de la concentration en saccharose.....	31
<b>Figure 14:</b> Courbe iso-réponse de la densité en fonction de la température et de la concentration en saccharose.....	32
<b>Figure 15:</b> Rendement en huiles essentielles de T.Numidicus de différentes régions .....	33

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Caractéristique d'une bonne huile essentielle de Thym à Thymol.....	6
<b>Tableau 2:</b> Matériels de laboratoire utilisé.....	14
<b>Tableau 3:</b> Facteurs étudiés avec leurs niveaux.....	15
<b>Tableau 4:</b> plan d'expérience en valeur réel.....	17
<b>Tableau 5:</b> Matrice du plan composite centré et les réponses enregistrées.....	24
<b>Tableau 6:</b> Analyse de la variance pour la densité.....	28
<b>Tableau 7:</b> Analyse de la variance pour la viscosité.....	28
<b>Tableau 8:</b> Propriétés souhaitées pour la formule du sirop simple.....	32
<b>Tableau 9:</b> Solutions fournies par l'optimiseur du logiciel Modde 6.....	33
<b>Tableau 10:</b> Caractéristique d'HE de thym .....	34
<b>Tableau 11:</b> valeurs des diamètres de la zone d'inhibition et le pourcentage d'inhibition de l'HE pure .....	35

# *Introduction*

## *générale*

## Introduction générale

L'industrie pharmaceutique est le secteur le plus développé grâce à la diversité de ses activités qui regroupe les activités de recherche, de fabrication et de commercialisation des produits pharmaceutiques pour la médecine humaine ou vétérinaire. Le médicament est l'un des produits délicats pour l'homme, sa conception, sa fabrication et sa consommation doivent répondre à des normes strictes, de telle sorte que son utilisation ne doit comporter aucun risque pour les malades [1], les préparations liquides pour usage orale font partie de ces produits qui sont classés en solutions, émulsions et suspensions buvables, gouttes buvables, sirops, poudres et granulés pour sirops etc....

Le principe actif (PA) de ces préparations peut être d'origine naturelle (extraits des plantes), ou synthétique.

La préparation des formes liquides s'effectue généralement dans des conditions données internes telle que la quantité de principe actif et externes comme la température, dans des réacteurs et autres installations de production adéquates pour chaque forme.

Le réacteur en chimie est présenté comme une enceinte utilisé pour la réalisation et l'optimisation des réactions chimiques et des procédés de transformation de la matière . Le but recherché est l'homogénéité du milieu réactionnel du point de vue de la température et du mélange des réactifs. Cet avantage nous a permis d'exploiter le mini-réacteur, conçu et réalisé par des étudiantes en chimie pharmaceutique de la promotion précédente [2], dans le domaine pharmaceutique et plus particulièrement pour les préparations de sirops qui ne requièrent pas des vitesses d'agitation élevées.

Dans ce contexte l'objectif de ce travail est de rechercher l'impact et l'effet, de la température, de la concentration de saccharose et de la vitesse d'agitation sur les propriétés physico-chimiques d'une forme sirop en utilisant le plan d'expérience comme outil mathématique et le mini-réacteur comme outil d'expérimentation chimique.

Notre étude est donc répartie en deux chapitres, initiée par une recherche bibliographique, la première traite des généralités sur les sirops et des généralités sur le plan d'expérience. Les

huiles essentielles, leurs compositions, ainsi que leurs méthodes d'extractions, font l'objet de la fin de ce chapitre

Le second chapitre est consacré à la partie pratique qui est subdivisée en deux parties :

- ✓ La première présente les méthodes, le matériel et les techniques utilisées pour la réalisation des essais de formulation et de caractérisation du sirop. sont également donné dans cette première partie, les essais d'extraction, de caractérisation et d'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle.
  
- ✓ La deuxième partie aborde dans un premier lieu la présentation et l'interprétation des résultats d'analyse du modèle mathématique utilisé puis, dans un second lieu, traite les résultats des tests de caractérisation, d'identification ainsi que les résultats tests antimicrobiens effectués sur l'huile essentielle extraite.

Enfin, une conclusion générale résume l'ensemble des résultats obtenus

# *Chapitre I*

**Etude Bibliographique**

## 1. Généralités sur les Sirops

### 1.1 Définition

Les sirops sont des préparations aqueuses caractérisées par leur saveur sucrée et leur consistance visqueuse. Ils peuvent contenir du saccharose à une concentration au moins égale à 45 pourcent m/m. La saveur sucrée peut également leur être conférée par d'autres polyols ou édulcorants. Ils contiennent généralement des aromatisants ou autres agents de sapidité [3]. Ils sont administrés par voie orale.

A une concentration voisine de 65% en masse (une densité de l'ordre de 1,32 à 20°C), le saccharose assure, sous certaines conditions, une protection antimicrobienne. La densité des sirops est comprise entre 1.26 et 1.32 [4].

### 1.2. Composition du sirop

Les sirops peuvent contenir un ou plusieurs principes actifs et des substances auxiliaires (colorant, aromatisants, agents antimicrobien). Le nom et la concentration des édulcorants et des polyols doivent être indiqués sur l'étiquette [5].

**Conservateurs anti microbienne :** Les conservateurs sont ajoutés dans le cas des préparations qui n'ont pas elle-même des propriétés antimicrobiennes suffisantes pour se protéger de la prolifération de microorganismes.

**Les colorants:** Les colorants sont des entités chimiques bien définies [6], ils permettent d'augmenter l'acceptabilité et l'attraction esthétique de la formulation.

**Aromatisants :** Les arômes sont, dans le domaine pharmaceutique des substances destinés à être introduites dans certains médicaments pour en masquer ou améliorer la saveur ou l'odeur.

### 1.3. Avantages et inconvénients des sirops

#### 1.3.1. Avantages des Sirops

- Le P.A. est en solution, à l'état moléculaire et donc directement disponible à l'absorption [7], forme facile à avaler, goût des PA caché par le sucre.

- Bonne conservation du fait de la grande quantité de sucre, Généralement bien toléré (notamment par les enfants), pas de problème de délitement ou de dissolution dans le tractus gastro-intestinal (TGI), la répartition du PA est homogène dans l'espace.

### 1.3.2. Inconvénients des Sirops

Les altérations principales des sirops sont généralement dues à une concentration en sucre trop forte ou trop faible.

- Instabilité, contamination microbienne (solvant : eau ou sirop)
- Conditionnement lourd et fragile (verre).

## 1.4. Formulation des sirops

La formulation consiste à fabriquer des produits homogènes stables et possédants des propriétés spécifiques, en mélangeant différentes matières premières, sous une forme pharmaceutique définie.

Avant la formulation d'un sirop il est nécessaire de:

- Définir les caractéristiques physico-chimiques des matières premières,
- Définir les consignes de sécurités à prendre lors de la manipulation des produits.

### 1.4.1. Préparation

Elle nécessite deux substances:

**Le véhicule :** c'est un liquide dans lequel le sucre est dissout. Il peut être de 3 natures, eau distillée, solution ou hydrolat.

**Le sucre :** le sucre le plus utilisé est le saccharose ou le sucre blanc ; il est issu de la betterave sucrière. Pour les diabétiques, des édulcorants tels que le sorbitol ou le polyol, et des édulcorants intenses comme l'aspartam ou la saccharine sont souvent utilisés.

- **Préparation à froid :** 180g de sucre pour 100g d'eau, les deux substances sont en contactes, la densité du sirop est 1,32. Cette méthode est longue à réaliser mais elle permet d'éviter la décomposition du sucre par la chaleur.
- **Préparation à chaud :** 165g de sucre pour 100g d'eau. Les deux substances sont en contactes, ces dernières sont maintenues au bain-marie. L'eau évaporée est compensée en cours de préparation. L'intérêt de cette méthode est sa rapidité, mais il y a des risques de décomposition au cours de laquelle le sirop prend une légère coloration.

### 1.4.2. Cuite des sirops

C'est une opération qui consiste à amener le sirop à une concentration précise en sucre et elle s'apprécie avec un densimètre [8]. Si la densité à chaud est inférieure à 1,26 alors il faut continuer de faire chauffer pour faire évaporer l'eau. Si la densité est supérieure à 1,26 alors il faut rajouter de l'eau avec précaution.

## 1.5. Contrôles de qualité du sirop

Le contrôle qualité est une partie des BPF qui concerne les procédures relatives à l'échantillonnage, aux spécifications, aux analyses et à la documentation [9].

Le contrôle de qualité consiste à analyser les paramètres organoleptiques et physicochimiques du sirop.

### 1.5.1. Contrôle des caractères organoleptiques

La détermination de caractères organoleptiques consiste en l'analyse de l'odeur, de la couleur et de la saveur.

### 1.5.2. Contrôle des caractéristiques physico-chimique et biologiques

**Densité :** La densité d'un corps se traduit par le rapport de sa masse sur son volume. Plus un sirop est dense, plus il est susceptible d'empêcher certaines incompatibilités, de les retarder ou de les atténuer [10].

**Viscosité :** La viscosité d'un liquide est la propriété caractérisée par la résistance qu'opposent ses molécules au déplacement des molécules voisines.

**Fermentation :** Le sirop fermenté se reconnaît par la formation ou dépôt de moisissures à sa surface (prolifération de moisissures, de levures dans le sirop). Une observation à l'œil nu permet de déceler la formation de moisissures.

**Limpidité :** Elle se traduit par la capacité de transmission de la lumière par le sirop et l'absence de substance en suspension dans le sirop. La limpidité de sirop peut être contrôlée par l'observation à l'œil nu.

**Potentiel d'hydrogène (pH) :** Le pH du sirop doit être constant dans le temps, la méthode la plus utilisée pour déterminer le PH est celle du PH mètre.

**Stabilité :** La stabilité d'une préparation est son aptitude à conserver ses propriétés chimiques, physiques, microbiologiques et biopharmaceutiques dans des limites spécifiées pendant toute sa durée de validité [11]. La stabilité du sirop est vérifiée par la coloration, la formation de précipité par la variation de pH et par la séparation des constituants.

### 1.6. Formule quantitative

**Saccharose :** Le saccharose, ou saccarose, est un sucre à la saveur douce et agréable. Extrait de certaines plantes, principalement de la canne à sucre et de la betterave sucrière, il est très largement utilisé pour l'alimentation humaine.

**Eau distillée :** L'eau distillée est une eau qui a subi une distillation, donc exempte de certains sels minéraux et organismes que l'on pourrait retrouver dans l'eau « naturelle ». Elle contient idéalement des molécules H<sub>2</sub>O, des gaz dissous comme O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>. Elle est qualifiée d'eau purifiée.

**HE de thym à thymol :** Une bonne huile essentielle de Thym à Thymol doit avoir les caractéristiques suivantes :

**Tableau 1 :** Caractéristique d'une bonne huile essentielle de Thym à Thymol [3]

Caractéristiques biochimiques	Thymol 36 à 55%	Paracymène 8 à 28%	Gamma terpinène 6 à 14%	Carvacrol 1 à 13%
Caractéristiques physiques	Densité à 20°C 0,915 à 0,935	Indice de réfraction à 20°C 1,490 à 1,505	Pouvoir rotatoire à 20°C -10° à +10°	Point éclair +60°C
Caractéristiques organoleptiques	Aspect liquide, A température < 20°C risque de précipitation	Couleur jaune à rouge brun	Odeur forte et épicée à greste, aromatique	

### 1.7. Altération et conservation du sirop

L'altération d'un sirop peut être due à une trop faible ou à une trop forte concentration en sucre:

- S'il est trop concentré (trop cuit), le saccharose cristallise. Il suffit d'ajouter la quantité d'eau nécessaire pour ajuster la densité.
- S'il est trop dilué, la teneur en sucre est insuffisante d'où la prolifération des microorganismes, levure, moisissures.

Pour la conservation il est conseillé de mettre les sirops en flacons bien bouchés dans des endroits frais.

## 2. Plan d'expérience

### 2.1. Définition

Le plan d'expérience constitue essentiellement une stratégie de planification d'expériences afin d'obtenir des conclusions solides et adéquates de manière efficace et économique [12]. Le plan d'expérience est une méthode statistique d'optimisation fondée sur le postulat d'un modèle mathématique préalable à la mise en œuvre de l'expérimentation et au traitement des données collectées.

### 2.2. Les plans de surface de réponse

Le plan d'expérience est une techniques qui permet de quantifier les effets de divers facteurs sur une réponse et de les optimiser dans des domaines expérimentaux bien déterminés. Afin de décrire la méthode permettant d'obtenir la réponse optimale une suite d'essais consistant à manipuler les facteurs est organisée. La méthodologie de surface de réponse fait partie du plan d'expérience utilisé pour l'optimisation. C'est une modélisation empirique technique consacrée à l'évaluation de la relation d'un ensemble de facteurs expérimentaux contrôlés et observés avec les résultats [13].

#### 2.2.1. Plans factoriels complets à deux niveaux ( $2^k$ )

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.

### 2.2.2. Les plans composites centrés

Utilisés en complément d'un plan factoriel quand le modèle linéaire précédent ne donne pas satisfaction, le principe est de rechercher les expériences ou les valeurs des facteurs qui permettent de résoudre le modèle mathématique avec un maximum de précision par une fonction polynomiale de second degré.

### 2.3. Optimisation

L'optimisation consiste à atteindre les spécifications imposées et ce, de façon optimale, en suivant les variables qui correspondent aux paramètres opératoires du système étudié.

Quand un modèle mathématique est construit pour décrire un phénomène, il peut être utilisé pour prédire les réponses dans le domaine d'étude ou pour trouver les conditions expérimentales qui conduisent à la réponse optimale [14].

L'optimisation de la formulation pharmaceutique a pour objectif d'aboutir à un degré de qualité acceptable quant aux objectifs de sécurité, d'efficacité et de qualité. Pour y arriver il faudra respecter certaines contraintes imposées aux niveaux de la fabrication par les bonnes pratiques, le contrôle par le comportement in vitro et in vivo de la forme réalisée, et le prix de revient [15].

## 3. Huile essentielle de thym

### 3.1. Huile essentielle

Est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie.

#### 3.1.1. Composition chimique des huiles essentielles

Chaque HE contient de nombreuses molécules actives, chacune possédant des propriétés spécifiques, ce qui rend une huile essentielle unique et polyvalente. En effet, contrairement à un médicament, généralement constitué d'une seule substance active, une HE renferme des aldéhydes, cétones, esters, éthers, phénols, alcools, terpènes... en quantités variables. Elle agit sur plusieurs cibles et dévoile ainsi ses nombreuses propriétés. La composition d'une HE demeure extrêmement complexe [16].

Toutefois, les constituants des HE peuvent être classés en 3 groupes provenant de trois voies de biosynthèse bien distinctes : Les terpénoïdes, les dérivés du phénylpropane et les composés divers.

### 3.1.3 Procédé d'obtention des HEs

Selon les plantes utilisées, l'extraction des huiles essentielles se fait par différents procédés, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, ou par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition [3].

Permettant d'obtenir un rendement appréciable en minimisant les pertes, l'hydro distillation de type Clevenger, est parmi les méthodes les plus utilisées. Le principe de cette dernière consiste à porter à ébullition, dans un ballon, un mélange d'eau et de plante dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient [17].

### 3.1.4. Analyse physico-chimique des HEs

Plusieurs contrôles sont prévus afin d'identifier et d'assurer la qualité des huiles essentielles. Cette évaluation est accomplie par la mesure d'un certain nombre d'indices physiques et chimiques ainsi qu'une caractérisation par des techniques physico-chimiques:

- **Indices physiques** : densité relative, indice de réfraction, angle de rotation optique, point de solidification, résidu d'évaporation, solubilité dans l'alcool...
- **Indices chimiques** : indice d'acide, indice d'esters, indice de peroxyde...
- **Analyses chromatographiques** : La méthode couramment utilisée pour l'identification des huiles essentielles est le couplage Chromatographie en Phase Gazeuse/ Spectrométrie de Masse (CPG/SM).
- **Analyse microbiologique** : étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles.

## 3.2. Genre *Thymus*

### 3.2.1. Description

Les thymus sont des sous arbrisseaux pouvant atteindre jusqu'à 40 cm de longueur. Ils possèdent des petites feuilles vertes recourbées sur les bords et des petites fleurs roses pâles ou blanches. Elle est appelée communément Zaâitra par populations locales [18].



Figure 1 : Thym

### 3.2.2 Répartition géographique

Le Thym, se retrouve principalement dans la région méditerranéenne, l'Asie, l'Europe du Sud et l'Afrique du Nord dont il existe près de 350 espèces [19,20]. L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Le thym de la famille de lamiacées, comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides. Il est présenté en Algérie par des nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination en raison de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement. Ce genre est représenté principalement par onze espèces, réparties dans le nord du pays. [21,18].

## 3.3. HE de thym

L'HE du thym est extraite principalement à partir des feuilles et des sommités fleuries. La tige fleurie du thym contient en plus de l'HE des flavonoïdes et des acides-phénols, des tannins et une résine. Toutes les HE de Thym ont des propriétés antibactériennes et antifongiques. L'huile essentielle de cette plante entre dans les formulations de diverses spécialités tels que les pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops pour traitement des affections des voies respiratoires, préparation pour inhalation [18, 22].

Les principaux principes actifs du Thym sont les acides phénoliques, Les flavonoïdes[23] et les phénols.

## 3.4. Activité biologique d'HE de thym

### 3.4.1 Activité antimicrobienne

La plupart des composés chimiques des HE sont dotés de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés

inhibitrices les plus importantes, en particulier les phénols [24]. L'efficacité antibactérienne de l'HE de thym à thymol dépend de sa composition chimique non seulement en thymol, mais aussi en d'autres molécules. Le carvacrol par exemple, de même que le thymol, est capable d'augmenter la perméabilité membranaire facilitant ainsi l'accès des autres métabolites secondaires dans la cellule [22].

### **3.4.2 Toxicité**

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Contenant surtout des phénols et des aldéhydes, les huiles essentielles de Thym à thymol peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses [25].

De même, l'usage externe de l'HE de Thym à Thymol pur est déconseillé en raison de l'effet dermo-caustique.

# *Chapitre II*

**Etude Expérimentale**

## Introduction

La qualité d'un sirop dépend essentiellement de la valeur de sa densité, la pharmacopée préconise une valeur comprise entre 1,26 et 1,32 à une température de 20°C. Cette densité est étroitement liée aux conditions de formulation à savoir la vitesse d'agitation, la température de préparation et la concentration en sucre.

Dans cette partie, l'objectif visé est d'abord la formulation d'un sirop simple optimum, puis celle d'un sirop pharmaceutique à base d'extrait de thym.

Le sirop simple optimum est obtenu suite à une série de formulation, le nombre d'essai à réaliser étant obtenu grâce à l'outil informatique, plan d'expérience. Nous formulons 17 sirops simples variant selon leur concentration en saccharose, la vitesse d'agitation et la température de formulation. Chaque sirop est caractérisé par la mesure de sa densité, de sa viscosité ainsi que de sa turbidité.

Les facteurs influençant la formulation et les réponses à ces facteurs sont introduits dans le logiciel, plan d'expérience, pour une optimisation des caractéristiques du produit fini. Le sirop pharmaceutique est formulé en injectant dans le sirop optimum obtenu une quantité d'huile essentielle extraite à partir du thym.

## Partie I Matériels et méthodes

### 1. Matériels

#### 1.1. Matériels chimiques

Nous avons utilisé deux principaux produits qui sont : l'eau distillée et le saccharose, dans le but de préparer un sirop simple ; l'acide acétique glacial, l'acide sulfurique monohydraté pour l'identification de thymol.

## 1.2. Matériels biologiques

### 1.2.1- Matériel végétal

Les échantillons de la partie aérienne (tiges, feuilles et fleurs) de *Thymus numidicus* ont été récoltés au mois d'avril 2017 durant l'étape de la floraison (pleine) dans la région Draa Ben Khedda ouest de Tizi-Ouzou. L'identification botanique a été faite par M. Ben Ghanem Abd el Kadar enseignant au sein du département de biologie de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'UMMTO.

Après la récolte, les parties aériennes sont isolées et séchées à l'ombre dans un endroit bien aéré pendant 10 à 15 jours, puis sont conservées dans des sacs propres jusqu'à leur utilisation pour extraction.

### 1.2.2- Matériel animal et milieu de culture

**Souche bactérienne :** *E. Coli*, stréptocoque, bacille pyocyanique, *klebsiella oxytoca*.

**Levure :** *candida albicans*.

**Milieux de culture :** milieu de MEULLEUR HINTON, milieu SABOURAUD, sang avec MEULLER HINTON. La composition détaillée est donnée en Annexe 3.

## 1.3. Matériels de laboratoire

Le matériel utilisé pour mener les différentes étapes de la formulation du sirop et de la caractérisation de ce dernier est donné dans le tableau 2. Les caractéristiques des appareils de mesure sont données en annexe 4.

**Tableau 2** : Matériels de laboratoire utilisés.

Equipements	Verreries	Appareils de mesure	Matériels d'analyse
Balance de précision Plaque chauffante Chauffe ballon Bain thermostatique Thermomètre Mini-réacteur Agitateur magnétique (Barreau aimant de 4cm) Autoclave, Etuve.	Réfrigérant, bécher de 250 mL, erlenmeyer, fiole jaugé de 100 mL, pycnomètre de 5mL, entonnoir, cristalliseur de 250 mL, ampoule à décanté, micro pipette, tubes à essai, seringue. Boîtes de pétri, Pipettes pasteur.	Viscosimètre Turbidimètre Réfractomètre	CPG

## 2. Méthodes

### 2.1. Plan d'expérience

#### 2.1.1. Construction de plan d'expériences

L'outil mathématique utilisé pour déterminer le nombre d'essai à réaliser pour la formulation du sirop est le plan d'expérience. Cette méthodologie permet une meilleure planification des essais de formulation de manière à obtenir le maximum d'informations pour un minimum d'expériences tout en assurant à l'expérimentateur plus de sûreté et de précision sur les résultats attendus.

Elle a pour objectif d'optimiser les niveaux de facteurs étudiés pouvant influencer les caractéristiques de notre sirop. La génération de la matrice d'expériences ainsi que l'analyse statistique des résultats ont été faites au moyen du logiciel Modde, version 6. [26]

##### 2.1.1.1 Choix de plan d'expériences

L'objectif étant d'optimiser les caractéristiques du système étudié, à savoir, la viscosité, la densité et la turbidité. Nous avons choisi un plan de surface du type composite centré car il permet d'étudier les facteurs extérieurs et intérieurs qui influent considérablement

sur la formulation. Ce plan permet d'obtenir une meilleure précision sur la modélisation des résultats, l'étude du mode d'action des facteurs sur les réponses, et permet également la prédiction et l'optimisation de réponses.

### 2.1.1.2 Choix des facteurs

La qualité d'un sirop dépend de plusieurs facteurs tels que la composition (concentration du sucre), la température et la vitesse d'agitation.

La concentration du saccharose est l'un des facteurs les plus importants qui confère au milieu une viscosité requise. Le deuxième facteur est la température de formulation, en effet l'élévation de la température lors de l'étape de préparation de sirop contribue à diminuer la densité du mélange ainsi que sa viscosité. Le dernier facteur est la vitesse d'agitation, une mauvaise agitation peut conduire à la caramélisation du sucre.

Le Tableau 3 regroupe les niveaux des facteurs étudiés en valeurs codées, (-1) désignant le niveau bas, 0 le niveau moyen et 1 le niveau haut, et en valeurs réelles. L'effet d'un facteur est défini comme la variation d'une réponse lorsque ce facteur passe du niveau inférieur (-1) à son niveau supérieur (1).

**Tableau 3:** Facteurs étudiés avec leurs niveaux

Facteurs étudiés		Niveaux		
		-1	0	1
X <sub>1</sub>	Concentration du saccharose (%)	60	70	80
X <sub>2</sub>	Vitesse d'agitation (tr/min)	100	300	500
X <sub>3</sub>	Température (C°)	80	90	100

Le choix des niveaux est basé :

- Pour la concentration en saccharose :
  - un pourcentage inférieur à 60% rend le sirop un très bon nutriment pour les micro-organismes .
  - un pourcentage supérieur à 80% provoque la cristallisation du saccharose.
- Pour la vitesse d'agitation :
  - Une vitesse d'agitation supérieure à 500 tr/min peut endommager le réacteur

- Pour la température
  - La préparation des sirops s'effectue généralement entre 80 C° et 100 C°

### 2.1.1.3 Choix des réponses

La qualité d'un sirop se traduit par la constance des caractères organoleptiques (goût, couleur, odeur et saveur) et physico chimiques telles que la viscosité, la densité et la turbidité. Dans notre cas le nombre de réponses à étudier est limité à trois : La viscosité, la densité et la turbidité.

### 2.1.1.4 Construction du plan composite

Avec un plan composite centré, il est possible de déterminer des surfaces de réponse, ce qui permet de rechercher les réponses optimales et de repérer les valeurs des facteurs étudiés qui conduisent à cet optimum. La méthodologie permet de modéliser les réponses en fonction des facteurs, en vue de prédire le comportement du système dans des conditions opératoires données [27].

Pour notre étude, le nombre de facteurs (k) est égal à 3 (la température, la concentration du saccharose, la vitesse d'agitation); le nombre d'essais à réaliser est composé des essais du plan factoriel (NF), auquel on ajoute trois points supplémentaires au centre (N0) pour évaluer la reproductibilité des mesures et l'erreur expérimentale, et deux points « axiaux » pour chaque facteur (Na), avec  $\alpha = 1$ .

Le nombre total d'essais à réaliser est :

$$NF + N0 + Na = 2^k + 3 + 2*k = 17 \quad (1)$$

La réponse étudiée en fonction des facteurs expérimentaux est donnée par l'équation 2 qui est une équation du second ordre de la forme:

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3 \quad (2)$$

$x_1, x_2, \text{ et } x_3$  : les niveaux des facteurs 1, 2, 3

$a_{ij}$  : sont les coefficients du modèle. Avec  $i = 0, 1, 2, 3$  et  $j = 1, 2, 3$

La matrice d'expériences correspondant aux valeurs réelles des facteurs influençant la formulation du sirop, obtenu par le logiciel, est donnée dans le tableau 4

**Tableau 4** : plan d'expérience en valeurs réelles

N° D'EXP	Température(C°)	Concentration du saccharose(%)	Vitesse d'agitation (tr/min)
1	80	60	100
2	100	60	100
3	80	80	100
4	100	80	100
5	80	60	500
6	100	60	500
7	80	80	500
8	100	80	500
9	80	70	300
10	100	70	300
11	90	60	300
12	90	80	300
13	90	70	100
14	90	70	500
15	90	70	300
16	90	70	300
17	90	70	300

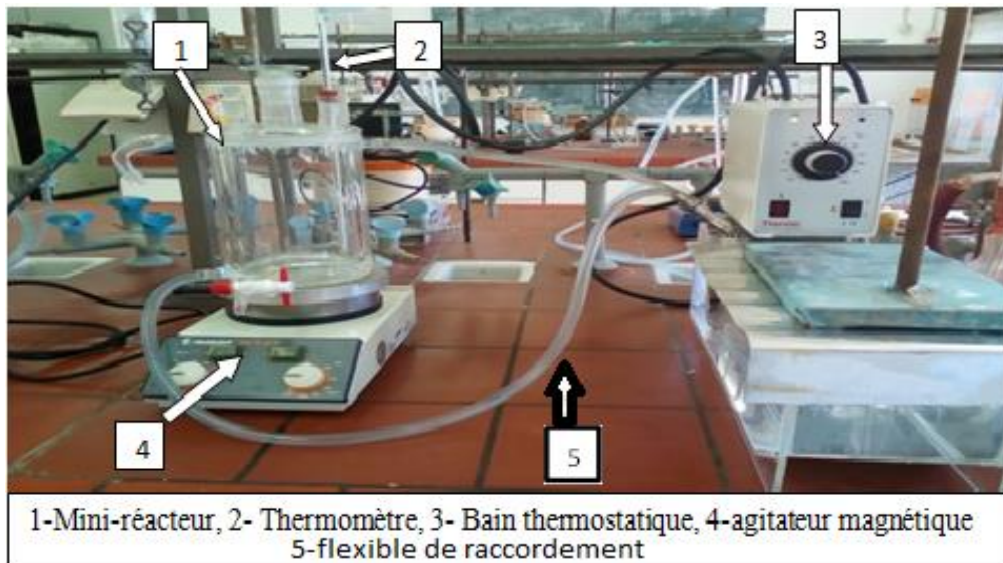
## 2.2 Expérimentation : Préparation du sirop simple

Pour pouvoir formuler le sirop simple, on a utilisé un réacteur à double paroi fermé [2].il est de capacité 1L, en verre borosilicaté, avec une hauteur de 12cm, le diamètre de la paroi intérieure est de 10,5 cm, et le diamètre de la paroi extérieure est de 12 cm. Il est constitué d'une double paroi, une paroi intérieure munie d'un robinet de sortie, et une paroi extérieure pourvue de deux ouvertures latérales, permettant l'entrée et la sortie d'un fluide de refroidissement ou de réchauffement. Il supporte les hautes températures (jusqu'à 500 °C sur une courte durée) et résiste mieux aux chocs thermiques et contraintes mécaniques que les réacteurs en verre ordinaire.

Ce mini réacteur à double paroi fermé (figure2) nous a permis de maintenir une température et une concentration homogènes pour la formulation du sirop.

### 2.2.1 Mode opératoire

Après avoir branché le mini réacteur au bain thermostat, au moyen de flexible résistant à la chaleur, nous réglons la température du bain, en parallèle nous préparons un sirop en diluant une quantité de saccharose, pesée au préalable, dans une fiole jaugée.



**Figure 2 :** Montage pour formulation d'un sirop simple

Cette préparation est versée dans le mini réacteur chauffé. La formulation du sirop commence dès le début de l'agitation et se termine après dissolution totale du saccharose. Le réglage de la température, la quantité du saccharose ainsi que la vitesse d'agitation sont conformes au tableau 4. Les sirops obtenus sont à une température élevée, nous laissons refroidir jusqu'à 20°C, puis nous mesurons les réponses (la densité, la viscosité et la turbidité). Ce mode opératoire est répété 17 fois, nous obtenons 17 formules de sirops.

## 2.3. Caractérisation du sirop

### 2.3.1 Densité

La densité de sirop est mesurée à l'aide d'un pycnomètre de 5 ml à la température de 20°C.

$$D = (M_0 - M_1) / V \quad (3)$$

$M_0$  : masse du pycnomètre avec sirop (g)

$M_1$  : masse du pycnomètre vide (g)

$V$  : volume du pycnomètre (ml)

### 2.3.2 Viscosité

Pour mesurer la viscosité nous avons utilisé un rhéomètre de type BROOKFIELD LV-I+ (figure 3), ayant comme accessoire quatre éléments mobiles de formes différentes, on a utilisé le S63 avec la tige numéro 3 à 100 tr/min, l'écran de l'appareil affiche le code de l'élément en cours d'utilisation et s'étalonne pour des mesures de viscosité en Cp.



**Figure 3 :** viscosimètre rotatif

### 2.3.3 Turbidité

La turbidité correspond à la réduction de la transparence d'un liquide due à la présence de particules en suspension. Pour effectuer des mesures de turbidité, nous avons utilisé un turbidimètre de type EUTECH, et de modèle TN-100/T-100 (figure 4), la turbidité est donnée en NTU.



**Figure 4 :** Turbidimètre

## 2.4 Extraction d'huile essentielle de thym

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro-distillation dans un appareil de type Clevenger, le schéma du montage est présenté sur la Figure 5



**Figure 5 :** Montage d'hydro distillation utilisé

### 2.4.1 Mode opératoire

35g de la matière végétale sont introduites dans un ballon de un litre, imprégnés d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition pendant deux heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, en traversant le réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décantation. La quantité d'huile essentielle extraite suite à la décantation est conservée au frais dans des flacons en verre ombré.

### 2.4.2 Calcul de rendement

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue par extraction et la masse totale du matériel végétal traitée. Il est calculé à l'aide la formule suivante:

$$\text{RHE}(\%) = (\text{MHE} / \text{MS}) * 100 \quad (4)$$

RHE: Rendement en huile essentielle (en %).

MHE: Masse de l'huile essentielle (en g).

MS: Masse de la matière sèche (en g).

## **2.5 Caractérisation de l'huile essentielle (HE) extraite**

Les analyses et tests effectués sur l'HE extraite sont inspirés de la pharmacopée Européenne 6<sup>ème</sup> édition.

### **2.5.1 Tests organoleptiques**

L'aspect, la couleur et l'odeur de l'HE ont été déterminés par voie sensorielle.

### **2.5.2 Analyse chromatographique**

Les analyses de la composition chimique de l'huile essentielle de thym ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse de type Perkin Elmer (Clarus 580) (les conditions opératoires sont données en annexe 2). Cette technique permet de déterminer le nombre de constituants de l'essence, et leurs temps de rétention.

### **2.5.3 Tests d'identification chimique de thymol dans l'huile essentielle de thym**

Ce test provient du recueil de la pharmacopée européenne 4<sup>ème</sup> édition. Le thymol peut se caractériser qualitativement en ajoutant à la solution aqueuse de l'huile essentielle de thym un demi-volume d'acide acétique glacial et ensuite, après le mélange, un volume d'acide sulfurique monohydraté ; l'apparition de la couleur rouge indique la présence de thymol [18].

## **2.6 Test microbiologique d'HE (Evaluation qualitative de l'activité anti bactérienne)**

### **2.6.1 Préparation des disques**

Des disques de 6 mm de diamètre sont préparés à partir de papier buvard dans un appareil approprié, puis sont mis dans un tube à essai stérilisé dans l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C, ils sont ensuite stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé).

Pour évaluer l'activité antibactérienne nous avons préparé 15 disques qui sont répartis en trois lots : un lot de 5 disques imprégnés d'huile essentielle, un autre de 5 disques imbibés d'eau distillée et le dernier lot de 5 disques imprégnés d'antibiotique. Nous avons placé dans des boîtes pétris 1 disque de chaque lot.

### 2.6.2 Préparation des cultures

Les souches microbiennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive et incubées pendant 24 h à 37°C afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées.

### 2.6.3 Préparation des suspensions bactériennes

A l'aide d'une anse de platine nous avons prélevé quelques colonies qui sont mises dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de NaCl. La suspension bactérienne est bien homogénéisée et laissée sur la paillasse pendant 30 minutes.

### 2.6.4 Tests de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne est effectuée par diffusion ou par aromatoگرامme.

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide dans une boîte de pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de notre huile essentielle de thym a été étudiée à l'égard de cinq espèces pathogènes : E. Coli, streptocoque, bacille pyocyanique, klebsiella oxytoca, candida albicans.

### 2.6.5 Ensemencement

15 mL de la gélose MH est coulée dans des boîtes de Pétri. Après refroidissement et solidification du milieu de culture, 300µL de suspension bactérienne à tester sont étalées en surface de gélose dans chaque boîte puis on laisse reposer pendant 30 minutes. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, les disques imbibés par l'huile essentielle de thym sont déposés sur la gélose (1disques/boîte), pour le témoin positive nous avons mis des disques avec un antibiotique (1disques/boîte), et pour le témoin négatif nous avons mis un disque imbibés d'eau distillée. Les boîtes sont ensuite fermées et incubées à une température de 37C° pendant 24 heures.

### 2.6.6 Lecture

La lecture se fait par la mesure du diamètre (en mm) de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle. La zone d'inhibition a été évaluée après 24 heures.

Le pourcentage d'inhibition est calculé par la loi suivante [18]

$$\% \text{ Inhibition} = D (\text{test}) / D \text{ boîtes de pétri} \times 100 \quad (5)$$

D (test) : Diamètre de la zone d'inhibition.

D (boîtes de pétri): Diamètre de la boîte de pétri.

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Mutai et al [31], ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance microbienne en 5 classes :

- très fortement inhibitrice :  $D \geq 30\text{mm}$
- fortement inhibitrice :  $21\text{mm} \leq D \leq 29\text{mm}$
- Modérément inhibitrice :  $16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$
- Légèrement inhibitrice :  $11\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$
- non inhibitrice :  $D < 10\text{mm}$

## 2.7 Formulation de sirop à base d'extrait de thym

Ajouter au sirop simple optimum, à l'aide d'une micro pipette, 0.1% d'huile essentielle de thym à thymol à froid [28, 16].

### 2.7.1 Test organoleptique et physico-chimique du sirop pharmaceutique

L'aspect, la couleur et l'odeur de sirop ont été déterminés par vois sensorielle. La densité, la viscosité ont été mesurées.

## Partie II RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

## 1. Etudes statistiques des résultats

Le Tableau 5 représente la matrice d'expériences ainsi que les résultats obtenus après la formulation. Les facteurs étudiés sont exprimés en valeurs codées.

**Tableau 5** : Matrice du plan composite centré et les réponses enregistrées

N° D'EXP	Température	concentration du saccharose	Vitesse d'agitation	Densité (g/cm <sup>3</sup> )	Viscosité(Cp)	Turbidité(NTU)
1	-1	-1	-1	1,24	16,8	0,85
2	1	-1	-1	1,24	16,8	0,5
3	-1	1	-1	1,3	92,4	1,64
4	1	1	-1	1,3	123,6	2,4
5	-1	-1	1	1,24	13,2	0,6
6	1	-1	1	1,23	13,2	0,62
7	-1	1	1	1,298	50,4	0,58
8	1	1	1	1,28	120	0,21
9	-1	0	0	1,28	34,8	1,78
10	1	0	0	1,276	44,4	0,93
11	0	-1	0	1,23	14,4	0,73
12	0	1	0	1,3	112,8	0,33
13	0	0	-1	1,268	37,2	0,37
14	0	0	1	1,268	38,4	0,56
15	0	0	0	1,27	45,6	1,24
16	0	0	0	1,27	42	0,81
17	0	0	0	1,27	42	0,81

## 1.1 Validation de modèle

Pour valider le modèle obtenu dans le domaine étudié, Il faut tout d'abord vérifier l'adéquation du modèle mathématique, puis l'analyse des coefficients du modèle qui nous permettra de déterminer les facteurs significatifs ainsi que les interactions pour pouvoir écrire l'équation du modèle. Et enfin l'analyse de la variance qui validera ou non le modèle.

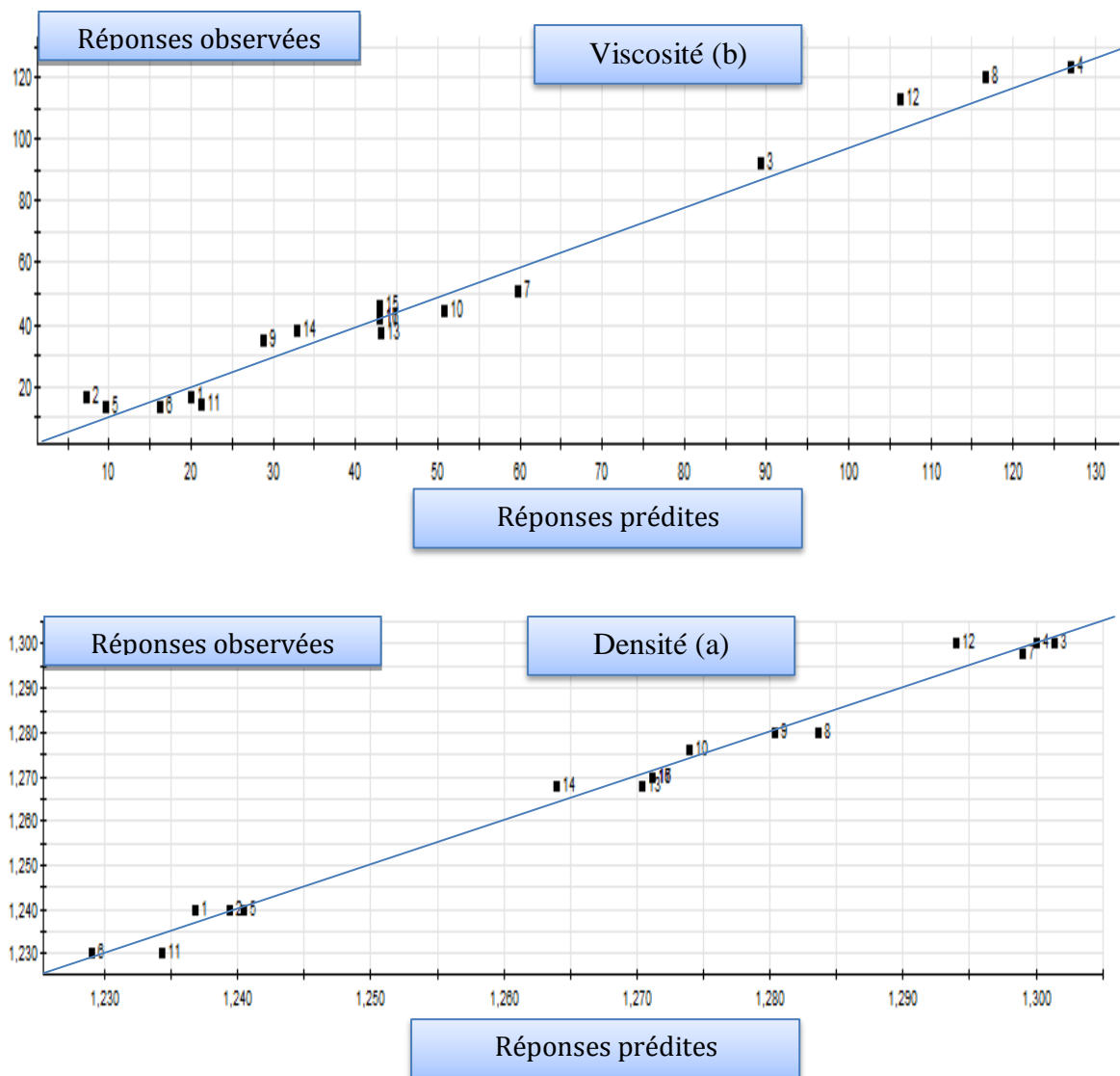
## 1.1.1 Adéquation de modèle

L'adéquation est le degré d'approximation des résultats expérimentaux et ceux de modèle. La qualité du modèle polynomial adaptée est appréciée par le coefficient de détermination multiple ( $R^2$ ) et le  $Q^2$  qui représentent la capacité du modèle de prédire la

réponse (appelé aussi  $R^2$  prédictif). Pour avoir un bon ajustement,  $R^2$  et  $Q^2$  doivent être proche de l'unité [27].

1.1.1.1 Viscosité

La Figure 6 donne une première évaluation du modèle établie. Nous remarquons une dispersion homogène rapprochée de la droite de référence. Ceci est traduit par un coefficient de détermination  $R^2=0.979$  très acceptable et  $Q^2 = 0.705$  acceptable, ce qui confirme la validité du modèle.



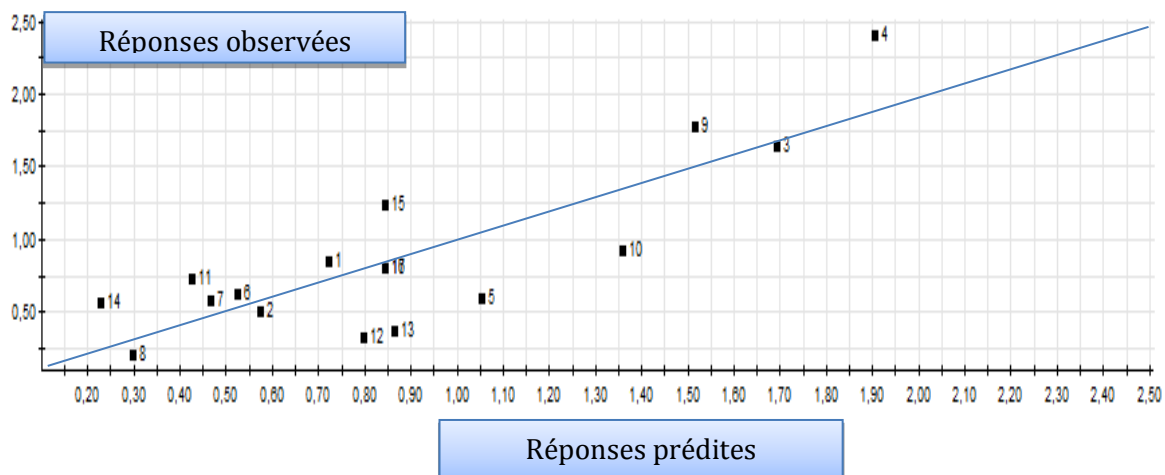
**Figure 6:** Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées(a) de la densité et (b) de la viscosité.

### 1.1.1.2 Densité

La même distribution remarquée pour la densité avec  $R^2 = 0.988$  ;  $Q^2 = 0.849$  les valeurs élevées de ces coefficients indiquent une très bonne qualité descriptive du modèle. Ce qui est bien illustré par la figure 6.

### 1.1.1.3 Turbidité

La Figure 7 montre une distribution non uniforme autour de la droite de référence, et les valeurs faibles de ces coefficients ( $R^2 = 0.704$ ,  $Q^2 = -2.011$ ) indiquent une mauvaise qualité descriptive du modèle. Ce résultat négative peut être expliqué par le fait que plus la température est élevée, plus la dissolution du sucre est grande, par conséquent il n'y a plus de particules en suspension. Puisque le modèle n'est pas validé pour la turbidité la suite de l'étude concernera uniquement la densité et la viscosité.



**Figure 7:** Représentation graphique des valeurs observées en fonction des valeurs estimées de la turbidité.

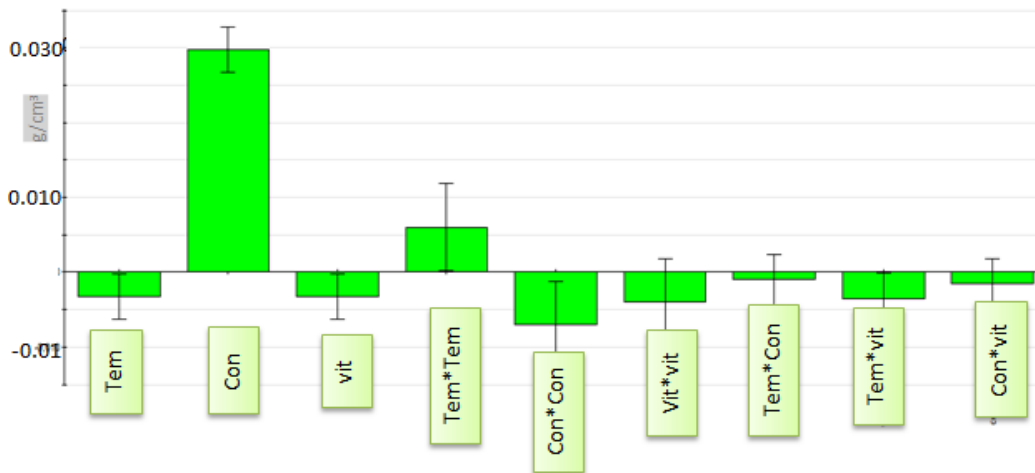
### 1.1.2. Facteurs significatifs

On dit qu'un coefficient est significatif lorsque la barre verticale (son intervalle de confiance) ne coupe pas l'axe horizontal.

#### 1.1.2.1 Densité

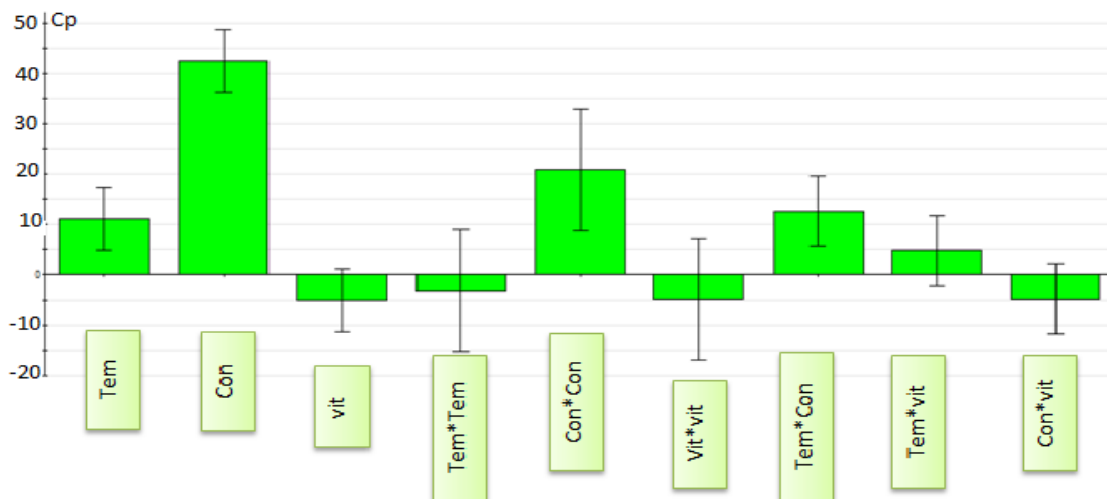
Au seuil de signification de 5%, les facteurs significatifs pour la densité sont les termes linéaire et quadratique de la concentration en saccharose et de la température ainsi que

le terme linéaire de la vitesse d'agitation et de l'interaction (température /vitesse d'agitation). (Figure 8).



**Figure 8 :** Histogramme de l'influence des coefficients sur la densité.

1.1.2.2 Viscosité



**Figure 9 :** Histogramme de l'influence des coefficients sur la viscosité.

Au seuil de signification de 5%, les facteurs significatifs pour la viscosité sont les termes linéaire et quadratique de la concentration en saccharose ainsi que le terme linéaire de la température et l'interaction (température /concentration en saccharose) (Figure 9).

### 1.1.3 Analyse de la variance

L'analyse de la variance nous permet de voir si les variables retenues pour la modélisation ont dans leur ensemble un effet significatif sur la réponse. Les modèles avec des valeurs de p-value proches de zéro sont statistiquement significatifs et considérés comme appropriés pour décrire la réponse étudiée correspondante. Et si le F de Fisher expérimental ( $F_{obs}$ ) est supérieur à F de Fisher donnée par les tables ( $F_{crit}$ ) (annexe1), le modèle est jugé valide. Les résultats de l'analyse de la variance pour chaque réponse sont :

#### 1.1.3.1 Densité

D'après le tableau 6 de l'analyse de la variance (ANOVA), les valeurs de p-value sont inférieures à 0,001 et  $F_{obs} > F_{crit}$ .  $R^2 = 0.957$  donc le modèle est validé.

$F_{crit} = F(\text{régression}/\text{résiduelle}) = F(0.05, 9, 7) = 3.68$  au seuil de signification  $\alpha = 0,05$ .

**Tableau 6 :** Analyse de la variance pour la densité

	Somme des carrés	DDL	Carrée moyen	Fobs	Fcrit	p-Value
Régression	0,00945973	9	0,00105108	64,9675	3.68	0.000
Résidus	0,00011325	7	1,62E-05			
Total	0,00957298	16	0,00059831			

#### 1.1.3.2 Viscosité

D'après le tableau 7 de l'analyse de la variance (ANOVA), les valeurs de p-value sont inférieures à 0,001 et  $F_{obs}$  est supérieure à  $F_{crit}$ .  $R^2 = 0.979$  donc le modèle est validé.

**Tableau 7:** Analyse de la variance pour la viscosité

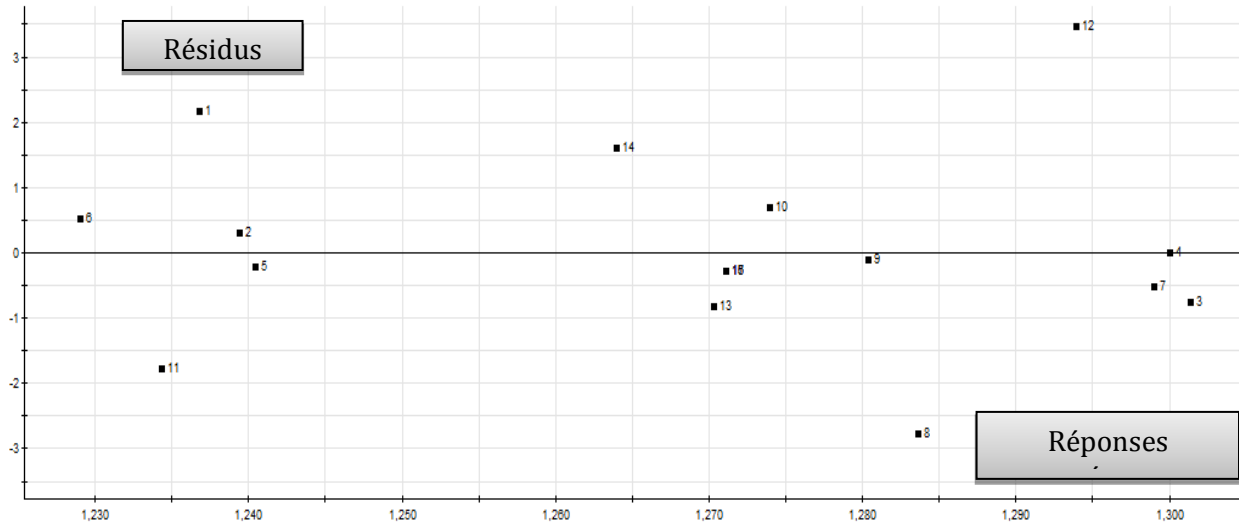
	Somme des carrés	DDL	Carrée moyen	F Obs	F crit	p-Value
Régression	22456,8	9	2495,2	35,8925	3.68	0.000
Résidus	486,63	7	69,5186			
Total	22943,4	16	1433,96			

### 1.1.4 Etude de résidus

Pour compléter l'analyse statistique du modèle. Il faut s'assurer que les résidus ne soient pas anormalement importants [27]. Si le nuage de point est presque aligné le long d'une

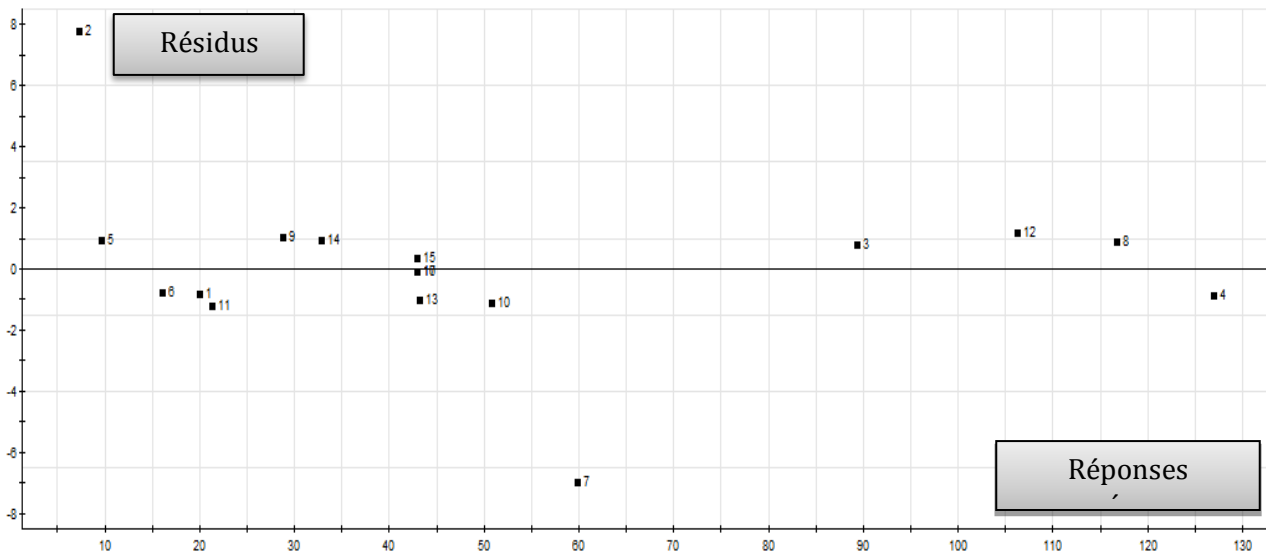
droite on conclut que les résidus sont normalement distribués. Seules des causes aléatoires sont alors à l'origine de la dispersion des résidus autour de leur moyenne. Les résultats obtenus pour chaque réponse sont:

**1.1.4.1 Densité**



**Figure 10 :** Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour la densité.

**1.1.4.2 Viscosité**

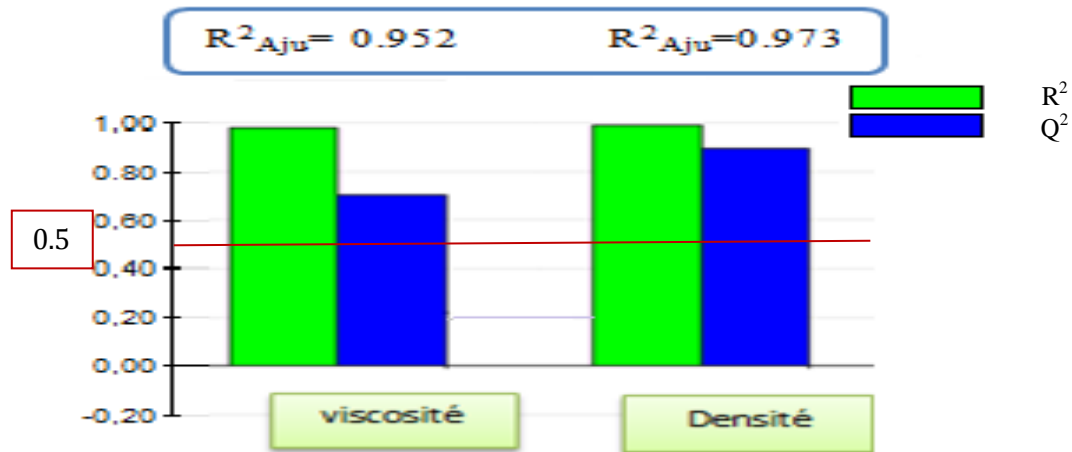


**Figure 11 :** Evolution des résidus en fonction des valeurs prévues pour la viscosité.

Les figures 10, et 11 présentent l'évolution des résidus estimés en fonction des réponses prévues par le modèle estimé respectivement pour la densité et la viscosité. La dispersion des points observés montre une dispersion aléatoire des réponses.

## 1.2 Modélisation des réponses à l'aide du logiciel mode 6

Les valeurs de  $R^2$  et  $Q^2$  en fonction des réponses sont montrées dans l'histogramme suivant :



**Figure 12** : valeurs de  $R^2$  et  $Q^2$  en fonction des réponses.

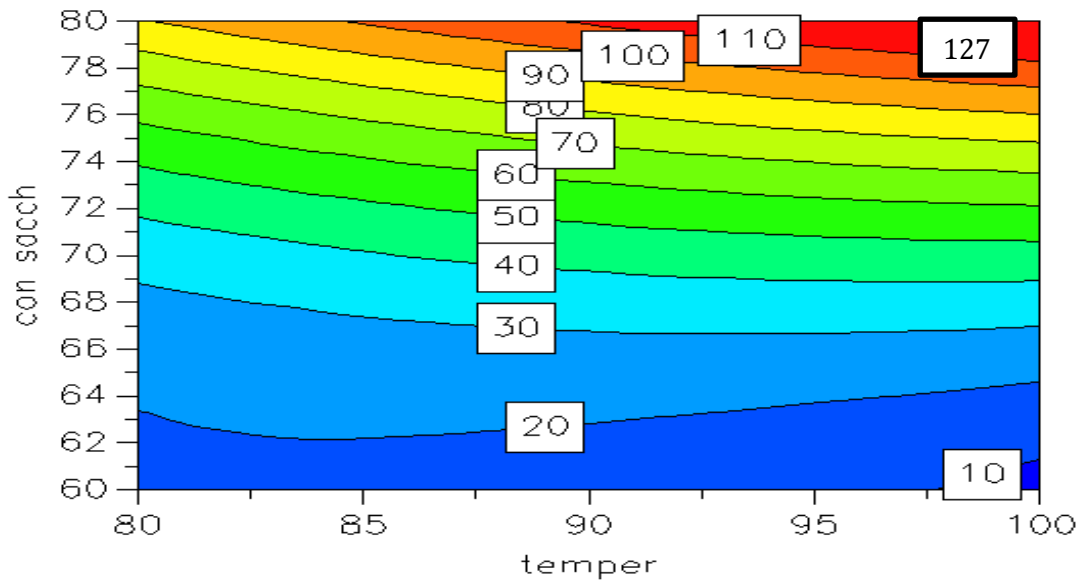
Plus les valeurs des coefficients  $R^2$  et  $Q^2$  sont proches de l'unité plus le modèle est bon et il permet de prédire la réponse. Dans notre cas les valeurs de ces deux coefficients sont acceptables pour la viscosité et la densité comme le montre la figure 12. La valeur de  $R^2$  et  $R^2_{Aju}$  est proche de l'unité et la valeur de  $Q^2$  est supérieure à 0.5 pour toutes les réponses étudiées.

### 1.2.1 Modélisation de la viscosité

La viscosité est décrite par l'équation (6) en éliminant les facteurs non significatifs, elle est en fonction de la concentration en saccharose en termes linéaire et quadratique et de la température et de l'interaction température/concentration.

$$\text{Viscosité} = 42.93 + 11.04 \cdot \text{tem} + 42.48 \cdot \text{con} + 20.87 \cdot \text{con}^2 + 12.6 \cdot \text{tem} \cdot \text{con} \quad (6)$$

D'après cette équation, nous remarquons que la concentration en saccharose a une influence positive sur la viscosité, alors que la température de formulation influe légèrement. La figure 13 présente la surface de réponse de la viscosité en fonction de la température et de la concentration en saccharose, nous constatons que les meilleurs résultats pour la viscosité sont obtenus aux niveaux élevés de la température et concentration en saccharose.



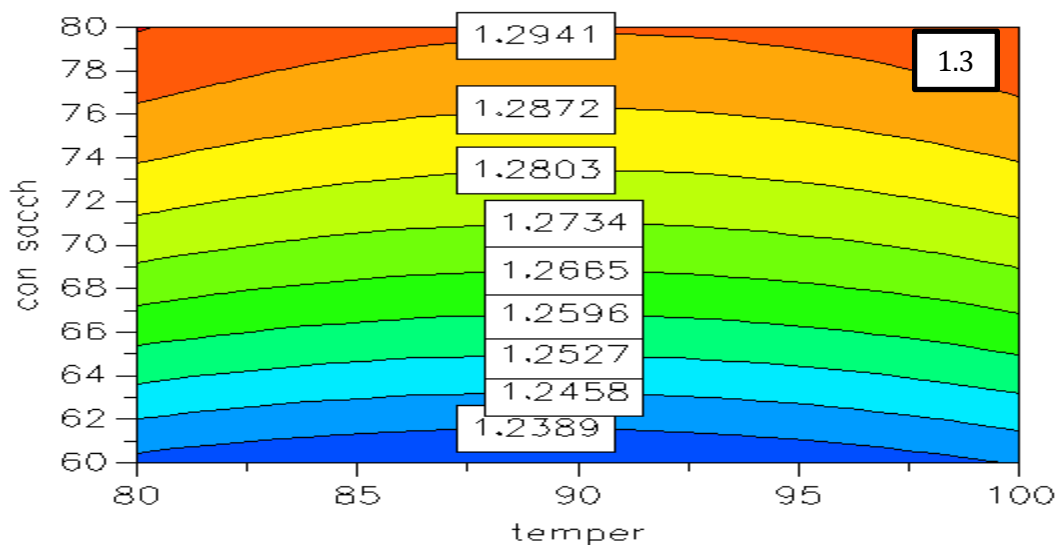
**Figure 13 :** Courbe iso-réponse de la viscosité en fonction de la température et de la concentration en saccharose

### 1.2.2 Modélisation de la densité

Le résultat de la modélisation de la densité est décrit par l'équation (7), elle est en fonction de la température et de la concentration en terme linéaire et quadratique, de la vitesse d'agitation et de l'interaction température/ vitesse d'agitation.

$$\text{Densité} = 1.271 - 0.003 \cdot \text{tem} + 0.0298 \cdot \text{con} - 0.003 \cdot \text{vit} + 0.006 \cdot \text{tem}^2 - 0.0069 \cdot \text{con}^2 - 0.003 \cdot \text{tem} \cdot \text{vit} \quad (7)$$

D'après cette équation, nous remarquons que la concentration en saccharose et la température de formulation ont une influence positive sur la densité, alors que la vitesse d'agitation influe légèrement. La figure 14 de la surface de réponse de la densité en fonction de la température et de la concentration en saccharose, montre clairement que les meilleurs résultats pour la densité sont obtenus aux niveaux élevés de la température et concentration en saccharose.



**Figure 14 :** Courbe iso-réponse de la densité en fonction de la température et de la concentration en saccharose

### 1.3 Phase d'optimisation

Pour avoir la formule optimale du sirop nous avons utilisé le module « optimizer » du logiciel Modde 6. Les propriétés voulues pour la formule sont données le tableau 8:

**Tableau 8 :** Propriétés souhaitées pour la formule du sirop simple.

Réponses	Critère	Min	Target	Max
Viscosité (Cp)	Maximiser	121,041	133,017	
Densité (g/cm <sup>3</sup> )	Maximiser	1,29779	1,30503	

Le module d'optimisation donne un ensemble de solutions possibles. Le tableau suivant donne les solutions possibles données par l'optimiseur du logiciel.

Le tableau 9 montre qu'à l'exception des solutions 2,3 et 7 les autres solutions proposées ont une composition en saccharose proche de 80%, sont formées à une vitesse d'agitation proche de 100 tr/min et sont obtenus à une température de 100 C°.

Au vu de ces résultats et conformément aux données de la pharmacopée européenne, le sirop optimum choisi est celui correspond à la solution 5.

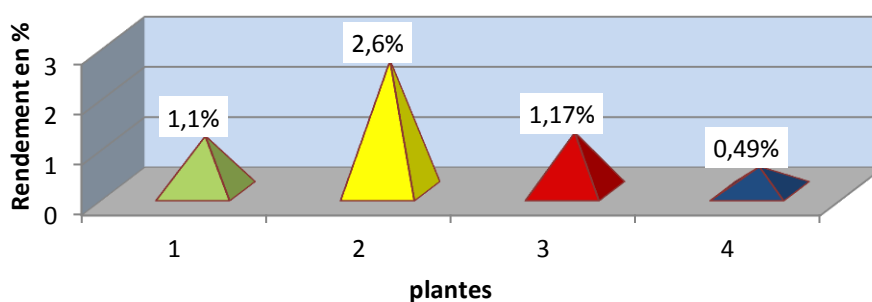
**Tableau 9:** Solutions fournies par l'optimiseur du logiciel Modde 6

	Température (c°)	con saccharose (%)	Vitesse d'agitation (tr/min)	Viscosité (Cp)	Densité g/cm3
1	100	79,7438	133,591	125,109	1,2994
2	82,5579	80	100,011	95,5637	1,2985
3	80,0004	80	100,024	89,3496	1,3014
4	100	79,9744	108,39	126,959	1,3
<b>5</b>	<b>99,9999</b>	<b>79,7195</b>	<b>100,047</b>	<b>124,196</b>	<b>1,2995</b>
6	99,9998	79,9999	100,027	127,029	1,3
7	80,237	80	100,003	89,9423	1,3011
8	100	79,9744	108,39	126,959	1,3

## 2 Etude Analytique De l'huile Essentielle

### 2.1 Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction en HE de thym par hydro distillation de type Clevenger est de 1.17 %. Ce rendement est important comparativement à celui de l'hydro distillation simple (0.49%) et ceux donnée dans la littérature (Figure 15).



**Figure 15** :: Rendement en huiles essentielles de T. Numidicus de différentes régions

- Rendement en HE de T. Numidicus de Berrahal [29] obtenu par Clevenger
- Rendement en HE de T. Numidicus de Yakourene [30] obtenu par distillation à la vapeur
- Rendement en HE de T. Numidicus de DBK obtenu par Clevenger
- Rendement en HE de T. Numidicus de DBK obtenu par hydro distillation simple

## 2.2 Résultats d'analyse d'HE de thym

### 2.2.1 Caractéristiques organoleptiques

Les propriétés organoleptiques et chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Les paramètres organoleptiques de notre HE du Thym sont : Aspect d'un liquide visqueux, de couleur jaune claire et d'odeur très forte, caractéristique de la présence du thymol.

### 2.2.2 Caractéristiques physico-chimique

**Tableau 10:** Caractéristique d'HE de thym

Critère	HE	Référence phar.Eur	Conformité
<b>Indice de réfraction</b>	1.475 à 26C°	1,490 à 1,505 à 20C°	/
<b>Densité relative à 20C°</b>	0.926	0,915 à 0,935	Conforme

Nous remarquons que la densité relative de notre échantillon entre parfaitement dans l'intervalle établi par la norme. Par contre l'indice de réfraction est en dehors de l'intervalle mais reste très proche de la limite inférieure, ceci est probablement lié à la température de mesure.

### 2.2.3 Analyse chromatographique

L'analyse chromatographique de l'HE de thym a révélé la présence de douze composés volatils avec un pourcentage élevé de 84.76% pour le composé C9 (voir annexe 2), les autres composés apparaissent avec des pourcentages faibles et avec des temps de rétention différents.

### 2.2.4 Résultat d'identification chimique de thymol

Le résultat de la réaction d'analyse d'huile essentielle de thym à thymol est positif, l'apparition de la couleur rouge indique la présence de thymol.

### 2.3. Résultats de test microbiologiques

#### 2.3.1. Les bactéries et les levures

Le diamètre moyen de la zone d'inhibition observé autour des disques imprégnés d'HE pure, et de l'antibiotique après 24 h d'incubation à 37 °C pour les bactéries et après 48h à 25°C pour la levure ainsi que leurs pourcentages d'inhibition sont résumés dans le tableau 11.

**Tableaux 11** : valeurs des diamètres de la zone d'inhibition et le pourcentage d'inhibition de l'HE pure

SOUCHE		HE DE THYM		Antibiotique		Eau distillée	
		D(mm)	I%	D(mm)	I%	D(mm)	I%
<b>GRAM (-)</b>	Escherichia coli	14	16.47	34	40	0	0
	Bacille pyocyanique	0.00	0.00	34	40	0	0
	Klebsiella oxytoca	15	17.64	27	31.76	0	0
<b>GRAM (+)</b>	streptocoque	16	18.82	0.00	0.00	0	0
<b>LEVEUR</b>	Candida albicans	18	21.17	/	/	0	0

L'HE de thym à thymol pure à une activité modérée sur la souche bactérienne streptocoque et candida albicans ( $16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$ ) avec un pourcentage d'inhibition (I%) allant de 18.82 jusqu' à 21.17 %, mais pour les autre souches (Escherichia coli et klebsiella oxytoca), elles sont légèrement inhibitrices ( $11\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$ ) à l'exception de bacille pyocyanique qui est non inhibitrice  $D < 10\text{mm}$ . Les diamètres d'inhibition pour HE de thym à thymol varient de 14mm à 18mm. Des résultats négatives sont obtenu pour l'eau distillée.

Le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu pour le témoin positif qui est l'antibiotique (cyprofloxacine) 34mm qui est fortement inhibiteur pour Escherichia coli, et le plus petit avec Klebsiella oxytoca (27mm) donc les résultats obtenus montrent que l'HE de thym à thymol possède un spectre d'activité antibactérienne plus efficace vis avis des bactéries Gram + que les Gram -. L'HE de thym à thymol possède également une activité inhibitrice sur la levure utilisée.

La sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens (voir Annexe 3) a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition comme suit [18] :

- Extrêmement sensible :  $D \geq 20\text{mm}$
- Sensible :  $15\text{mm} \leq D \leq 19\text{mm}$
- Intermédiaire sensible :  $9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$
- Non sensible (résistante) :  $D < 8\text{mm}$

Pour les souches *Klebsiella oxytoca*, streptocoque, et la levure *Candida albicans*, les diamètres des zones d'inhibitions varient entre 15mm à 19mm, elles sont sensibles envers l'HE, à l'exception de *Escherichia coli* qui est intermédiaire sensible à l'HE, mais les souches *Escherichia coli*, *Bacille pyocyanique*, *Klebsiella oxytoca* sont extrêmement sensibles envers l'antibiotique utilisé.

### 3 Résultats de Tests organoleptiques et physico-chimique de la formulation finale

**Aspect** : liquide limpide, incolore à jaune pâle.

**Densité** :  $1.2995 \text{ g/cm}^3$ , **Viscosité** : 122,8 Cp

Ces valeurs sont identiques à celle que nous avons optimisé.

### Conclusion

Dans cette partie du travail, l'influence de trois facteurs à savoir la température, la concentration en saccharose et la vitesse d'agitation sur la formulation d'un sirop a été étudiée. Les sirops préparés ont été caractérisés à l'aide de trois réponses; la densité, la turbidité et la viscosité.

Les résultats d'analyse du modèle mathématique montrent clairement qu'il est bien ajusté pour la densité, et la viscosité mais mauvais pour la turbidité. La modélisation des réponses par le logiciel modde6 nous a permis de constater que les meilleurs résultats pour la viscosité et la densité sont obtenus aux niveaux élevés de la température et de la concentration

en saccharose. La solution optimisée fournie par le logiciel a été choisie par rapport aux normes de la pharmacopée.

Les résultats de notre extraction montrent qu'avec une hydro distillation de type Clevenger nous obtenons un rendement appréciable de 1.17% en huile essentielle, ce procédé peut être rentable à l'échelle industrielle. La qualité de cette huile a été confirmée par le caractère organoleptique et l'analyse physico-chimique qui sont conformes aux normes.

L'activité antibactérienne d'HE de thym à thymol a été étudiée à l'égard de cinq espèces pathogènes : E. Coli, streptocoque, bacille pyocyanique, klebsiella oxytoca, candida albicans. Nous avons constaté que l'HE de thym, composée principalement de thymol, possède un spectre d'activité antibactérienne sur les bactéries Gram + que Gram – ainsi qu'une activité antifongique contre la levure utilisée.

Les caractéristiques de la formulation finale préparée sont identiques à celle obtenues par optimisation.



# *Conclusion*

## *générale*

## Conclusion générale

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à la préparation d'un sirop pharmaceutique à base d'huile essentielle de thym à thymol.

L'objectif scientifique de ce travail est dans un premier temps d'étudier l'influence de la température, de la vitesse d'agitation et de la concentration du saccharose sur la formulation du sirop. Nous avons pour cela utilisé le plan d'expérience dont l'objectif est d'optimiser les niveaux de facteurs étudiés pouvant influencer les caractéristiques de notre sirop, cette méthodologie nous a permis une meilleure planification des essais de formulation et l'obtention d'un maximum d'informations pour un minimum d'expériences. Par conséquent 17 formulations ont été réalisées. La caractérisation de chaque formulation par la mesure de la densité, de la viscosité et de la turbidité a été effectuée.

Les résultats d'analyse du modèle mathématique montrent clairement qu'il est bien ajusté pour la densité, et la viscosité mais mauvais pour la turbidité. La modélisation des réponses par le logiciel modde6 nous a permis de constater que les meilleurs résultats pour la viscosité et la densité sont obtenus aux niveaux élevés de la température et de la concentration en saccharose. La solution optimisée fournie par le logiciel a été choisie par rapport aux normes de la pharmacopée.

Dans un second temps, nous avons extrait le principe actif à rajouter à la formulation finale. L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydro distillation de type Clévenger, le rendement est 1.17% celui-ci peut être rentable à l'échelle industrielle. L'huile obtenue a été caractérisée par la détermination de ses propriétés organoleptiques, ses propriétés physico-chimiques et le nombre de ces composés chimiques, les valeurs enregistrées sont en accord avec les normes de la pharmacopée.

Avant de procéder à l'ajout de l'huile essentielle de thym à la formulation pharmaceutique, nous avons réalisé une étude sur l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de thym à thymol. Cette partie consiste à mettre en évidence le caractère antibactérien de cette huile par la méthode qualitative, en procédant à des tests sur des souches bactériennes connues, et qualifiées, pour la plupart, comme dangereuse pour l'homme et l'animal. Les résultats de cette activité ont montré que l'HE de thym à thymol possède un spectre d'activité antibactérienne plus efficace sur les bactéries Gram + que Gram - et une activité antifongique contre la levure utilisée.

La soumission du produit fini à différents tests de qualité tels que le contrôle du son caractère organoleptique, la mesure de sa densité et de sa viscosité a montré qu'il est conforme aux normes pharmaceutiques.

Comme perspective, étant donné ses propriétés antibactériennes, il serait souhaitable de valoriser l'HE extraite des différentes espèces de thym algérien, d'abord en procédant à son extraction avec de meilleurs rendements puis en l'appliquant dans des formulations pharmaceutiques tels que le sirop optimum que nous avons obtenu.

Les résultats seront, sans aucun doute, prometteur pour l'industrie pharmaceutique dans le traitement de diverses maladies.

# *Bibliographie*

## Bibliographie

- [1] A. Hir, Pharmacie galénique: Bonnes pratiques de fabrication des médicaments, Masson, 8ème Ed, 2001.
- [2] O. Hadj-Moussa, N. Boutaleb, Conception et réalisation d'un mini-réacteur chimique à double paroi, Mémoire de fin d'études, Faculté des Sciences, Chimie Pharmaceutique, UMMTO, 2016.
- [3] Pharmacopée européenne, VI<sup>e</sup> éd. Janvier .2008.
- [4] J. Fonteneau, P. Klusiewicz. Travaux pratiques de préparation et de conditionnement des médicaments, 2008.
- [5] A. Hir, J.-C. Chaumeil, D. Brossard. Pharmacie galénique bonne pratiques de fabrication des médicaments. 9<sup>e</sup> édition. **2009**.
- [6] A. Bianchetti. Maîtrise Universitaire en Pharmacie Travail Personnel de Recherche, Evaluation de l'acceptabilité des formulations de calcium et vitamine D par des enfants. Genève. 2009.
- [7] D. Wouessi Djewe. UE6 - Pharmacie Galénique : Voies d'administration et Formes Pharmaceutiques, Chapitre 5 : Formes galéniques administrées par voies entérales 2011/2012.
- [8] Fibustier, pharmacie galénique chapitre IV/ tome1, les formes pharmaceutiques, 2008.
- [9] Laurence conte. Validation des procédés de nettoyage ; application a un cas concret dans l'industrie pharmaceutique, Université Henri Poincaré. 2003.
- [10] C. Mautrait, R. Raoult. La préparation : mode d'emploi 3<sup>e</sup>édition. 2011.

[11] A. launay. Amélioration des conditions de conservation et de dispensation de la solution buvable de méthotrexate dosée à 2 mg/mL. Thèse Médicaments et Oncopédiatrie réalisée au CHU d'Angers. 2012-2013.

[12] K .Sandrine. Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt. Thèse de docteur de l'université de limoges. 2004.

[13] M. Fadil, A. Farah, B. Ihssane, T. Haloui, S. Rachiq. Optimisation des paramètres influençant l'hydro-distillation de *Rosmarinus officinalis* L par la méthodologie de surface de réponse, J. Mater. Environ. Sci. 6 (8) (2015) 2346-2357.

[14] I. Yahiaoui. Les plans d'expériences Initiation à la construction et l'analyse des plans factoriels complets à deux niveaux et du plan composite centré. Université A. MIRA - Bejaia Faculté de Technologie Département de Génie des Procédés 2014/2015.

[15] T. Kougnassoukou. Développement pharmaceutique d'un comprimé pellicule gastro-résistant en remplacement d'une forme générique dragéifiée. Thèse du doctorat en Pharmacie, université Mohammed faculté de médecine et de pharmacie –rabatannée, 2012.

[16] L. Muther. Utilisation des huiles essentielles chez l'enfant, thèse de docteur en pharmacie, faculté de pharmacie de clermont ferrand université d'auvergne, 2015.

[17] D. Toure. Études chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire, Thèse du Titre de Docteur de L'Université Félix Houphouët- Boigny En Biologie Humaine Tropicale, *Chimie- Biologie*. 2015.

[18] N .MebarkI. Extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse de magister en Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, industrie pharmaceutiques : université m'hamed bougara boumardes. 2010.

- [19] N. Zayyad, A. Farah et J. Bahh. Chemical analysis and antibacterial activity of essential oils from three species of *Thymus* : *Thymus zygis*, *T. algeriensis*, and *T. bleicherianus* .*Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 83, p. 118 – 132.2014.*
- [20] T. Dob, D. Dahmane, T. Benabdelkader, C. Chelghoum. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. *The International Journal of Aromatherapy* (2006) 16, 95–100.
- [21] A. Chikhoun. Huiles essentielles de thym et d’origan étude de la composition chimique, de l’activité antioxydante et antimicrobienne. Thèse de magister en sciences alimentaires, institut national agronomique El Harrache-Alger. 2007.
- [22] Yann-olivier Marie hay. La complexité des simples - caractérisations chimique et biologique de combinaisons hydrolats-huiles essentielles et huiles essentielles-huiles essentielles pour l'objectivation d'effets conservateurs de produits phyto thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de toulouse. 2015.
- [23] S. Jouault. La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse doctorat, université de lorraine faculté de pharmacie. 2012.
- [24] N. Boukhatem, M. Ferhat, K. Abdelkrim, F. Saidi, H. Taibi, and D .Teffahi . Valorisation de l’essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris* L.) en aromathérapie anti-infectieuse, *International Journal of Innovation and Applied Studies* ISSN 2028-9324 Vol. 8 No. 4 Oct. 2014, pp. 1418-1431.
- [25] F. Benayache. Etude photochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret, Mémoire de Magister En chimie organique Université Constantine 1, 2013.
- [26] Umetrics AB, MODDE Pro, Version 6, MKS Datav Data Analytics Solutions, Umeå 2001.
- [27] S. Touzouirt, C. Limani, F. Oukaci, T. Ahmed Zaïd, M. Nabiev. Optimisation de la stabilité d’une émulsion de Pickering H/E à l’aide de la méthodologie des surfaces de réponses, *the canadian journal of chemical engineering*, 95, 1, 77–82. 2016.

[28] D. Laurent. Les Huiles Essentielles à l'officine. Thèse de doctorat en pharmacie, ufr de médecine et de pharmacie de rouen. 2012.

[29] Haddaf Y, Kaloustian J, Giordan Regli P, Chefrour A, Abou L, Mikail C, Portugal H. Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus Vulgaris* L et de *Thymus Numidicus* Poiret d'Algérie 6eme symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales, Grasse, France. (2004)

[30] F .Saidj, S. Rezzoug, F. Bentahar,C. Boutekedjir Chemical Composition and Insecticidal Properties of *Thymus numidicus* (Poiret) Essential Oil from Algeria. Journal of essential oil-bearing plants 11, 4; 397-405; (2008).

# *Glossaire*

## Glossaire

**Antiseptique:** ce qui détruit les microbes et évite l'infection.

**Antibactérienne :** est une substance possédant la capacité de tuer des bactéries.

**Antifongique ou antimycosique :** Se dit d'un médicament qui agit contre les infections provoquées par les champignons ou les levures parasites.

**Aromatogrammes :** est une méthode de mesure in vitro du pouvoir anti-bactérien des huiles essentielles. Cet examen est donc l'équivalent d'un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des huiles essentielles.

**Bacille pyocyanique :** est une bactérie de la famille des pseudomonadaceae, mises en évidence par la coloration Gram -, aérobies stricts (ne pouvant vivre et se multiplier qu'en présence d'oxygène).

**Biopharmaceutique :** Relatif à la biopharmacie, à la partie de la pharmacie liée à la préparation de produits biologiques comme les sérums et vaccins.

**Candida albican:** est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestives.

**Cicatrisant :** Substance favorisant la cicatrisation des plaies cutanées.

**Chromatogramme:** c'est l'image ou le diagramme obtenu par chromatographie

**Dermo-caustique :** Qui entraîne des brûlures de la peau et des muqueuses.

**Escherichia coli :** est un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae. Également appelée colibacille et abrégée en E. coli, est une bactérie intestinale des Mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie

**Inoculum :** Échantillon contenant des germes vivants, destiné à être introduit au sein d'un milieu favorable à sa multiplication, afin de l'identifier, de l'étudier ou d'en produire une quantité supérieure.

**Indice de réfraction** : souvent noté  $n$ , est une grandeur sans dimension caractéristique d'un milieu, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci ; il dépend de la longueur d'onde de mesure mais aussi des caractéristiques de l'environnement (notamment pression et température).

**Klebsiella oxytoca** : est un bacille gram négatif anaérobie de la famille des entérobactéries faisant partie de la flore colique. Il provoque des infections respiratoires, des infections intestinales et urinaires.

**Moisissure** : Champignon de petite taille qui provoque une modification chimique du milieu sur lequel il croît.

**Papier buvard** : est un papier poreux capable d'absorber par capillarité une petite quantité de liquide.

**Point d'éclair ou point d'inflammabilité** : correspond à la température la plus basse à laquelle un corps combustible émet suffisamment de vapeurs pour former, avec l'air ambiant, un mélange gazeux qui s'enflamme sous l'effet d'une source d'énergie

**Pouvoir rotatoire**, également appelé activité optique est la propriété qu'ont certains milieux de faire tourner le vecteur d'un faisceau lumineux les traversant.

**Rendement d'extraction** : Le rendement de l'extraction est exprimé en pourcentage, et correspond au rendement moyen spécifique d'une substance.

**Streptocoque** : Les streptocoques regroupent un vaste ensemble de micro-organismes ubiquitaires et qui comprend de nombreuses espèces. En raison de leur nombre, on distingue les espèces pathogènes des espèces commensales et saprophytes

**Temps de rétention ( $T_r$ )** : C'est le temps que met le soluté à sortir de la colonne c'est à dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué.

**Test de Fisher ou Test F** : est un test d'hypothèse statistique qui permet de tester l'égalité de deux variances en faisant le rapport des deux variances et en vérifiant que ce rapport ne dépasse pas une certaine valeur théorique que l'on cherche dans la table de Fisher

**valeur-p (en anglais p-value)**, parfois aussi appelée **p-valeur**, est la probabilité d'obtenir la même valeur (ou une valeur encore plus extrême) du test si l'hypothèse nulle était vraie.

# *Annexes*

## ANNEXES 1

Quantiles d'ordre 0.95 de la loi de Fisher

Degré de liberté du numérateur sur la première ligne

Degrés de liberté du dénominateur sur la colonne de gauche

**Tableau 12 :** Table de F-critique

	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

## ANNEXES 2

### Condition opératoire de la CPG

- Le programme appliqué pour cette analyse est le suivant :

Température de l'injecteur = 250°C

Température de détecteur = 280°C

Volume injecté = 0.5µL

Four :

Température initiale = 40°C pendant 4 min

Ramp = 10°/ min jusqu'à = 280°C

Température maintenue à 280°C pendant 10 min

Gaz vecteur = Azote

- La colonne : est apolaire

**Colonne Restek** (Crossbond 100 % dimethylpolysiloxane)

Longueur = 30 m

Diamètre = 250µm

- Le premier pic à 2.4 min c'est le solvant diéthyl éther

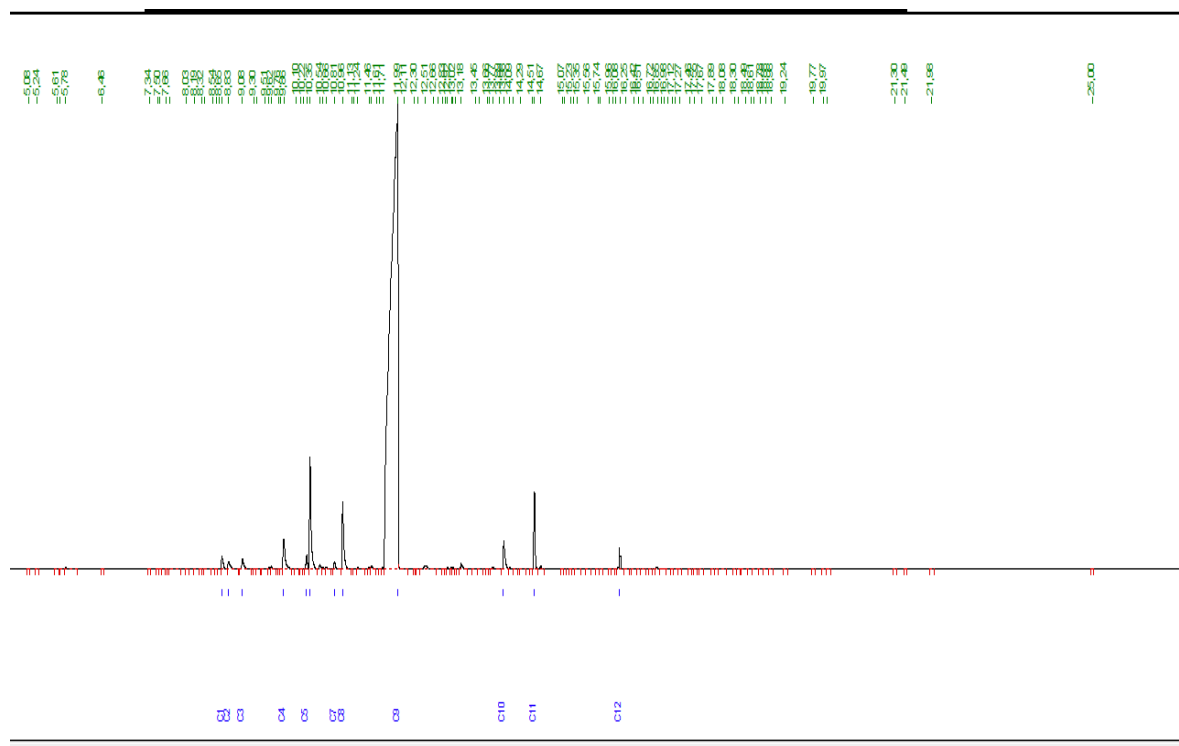
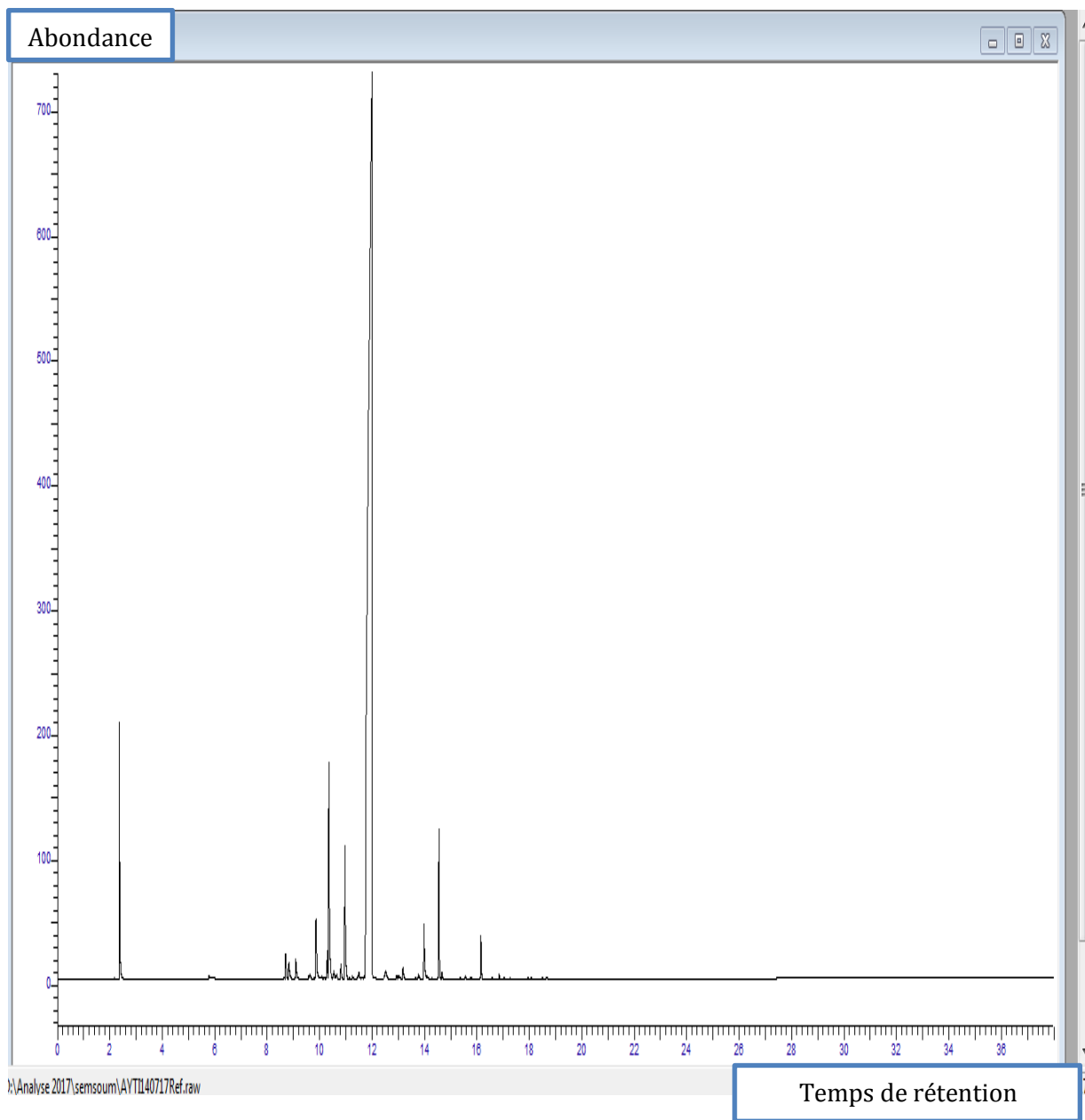


Figure 16: chromatogramme de l'huile essentielle de thym numidicus



**Figure 17:** chromatogramme de l'huile essentielle de thym numidicus

Software Version : 6.3.2.0646	Date : 14/06/2017 14:48:38
Sample Name :	Data Acquisition Time : 14/06/2017 13:21:26
Instrument Name : clarus580	Channel : A
Rack/Vial : 0/0	Operator : manager
Sample Amount : 1,000000	Dilution Factor : 1,000000
Cycle : 1	

Result File :

Sequence File : C:\PenExe\TcWS\Ver6.3.2\Examples\AYTI140717Ref.seq

## rapport analyse

Peak #	Component Name	Time [min]	Area [ $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ]	Height [ $\mu\text{V}$ ]	Area [%]	Norm. [%]	Area/Height [s]
26	C1	8,703	46139,29	19537,04	0,56	0,56	2,3616
27	C2	8,825	37587,29	12639,22	0,45	0,45	2,9739
28	C3	9,085	44319,37	15826,01	0,54	0,54	2,8004
36	C4	9,860	125029,61	46724,21	1,51	1,51	2,6759
40	C5	10,292	40212,47	21963,55	0,49	0,49	1,8309
41	C6	10,352	359070,33	173835,91	4,34	4,34	2,0656
45	C7	10,810	27109,85	11951,25	0,33	0,33	2,2684
46	C8	10,963	216415,45	106014,37	2,62	2,62	2,0414
55	C9	11,993	7009599,20	726494,61	84,76	84,76	9,6485
75	C10	13,978	99419,41	43855,47	1,20	1,20	2,2670
80	C11	14,552	198890,77	119605,94	2,41	2,41	1,6629
93	C12	16,149	66002,53	34253,12	0,80	0,80	1,9269
			8269795,58	1,33e+06	100,00	100,00	

## Missing Component Report

Componen: Expected Retention (Calibration)

All components were found

Figure 18 : Résultats de la CPG

ANNEXE 3



Figure 19 : Activité antibactérienne et antifongique de l'HE de *T. Numidicus*

## Milieux de culture

### Meulleur-Hinton gélosé (M-H) : (g/l)

Infusion de viande de bœuf.....	02.0g
Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
Amidon .....	01.5g
Agar.....	10g
PH : 7.4	

### Eau physiologique 9% (Nacl)

Sodium chloride.....	9g
H <sub>2</sub> O déminéralisé.....	1000ml

### Sabouraud gélosé simple : (g/l)

Néopeptone .....	10g
Glucose .....	20g
Agar .....	20g

PH: 5-5.6

Autoclave pendant 15 min à 115°C

## ANNEXE 4

### ❖ Viscosimètre

Le viscosimètre de type BROOKFIELD LV-I+ est un appareil ayant comme accessoires quatre éléments mobiles de formes différentes. Pour chacun de ces mobiles, l'appareil peut effectuer des mesures de viscosité dans un intervalle déterminé selon la forme du mobile. Dans le cas de notre produit nous avons eu recours à l'un de ces mobiles : le S63, la tige utilisé est N°3 à 100 tr/min. L'appareil électronique permet, pour chaque mobile fixé, de procéder directement à son enregistrement, l'écran affiche alors le code de l'élément en cours d'utilisation et s'étalonne pour des mesures de viscosité en Cp.

#### **Modalité de mesure de la viscosité**

Placer l'interrupteur général (situé sur le panneau arrière) sur la position ON.

Après stabilisation de l'écran d'affichage, retirer le mobile et presser une Touche quelconque.

Après cette opération le DV-I commence son réglage automatique de zéro

Après environ 15secondes l'écran s'affiche, remettre le mobile et presser une touche quelconque, à ce moment-là l'écran normal du DV-I s'affiche.

Presser la touche de sélection du mobile (SELECT SPINDLE) ; la lettre S commence à clignoter, régler le numéro du mobile par les flèche haut/bas pendant que le S clignote. Lorsque le code du mobile souhaité est affiché, presser une nouvelle fois sur la touche SELECT SPINDLE, la lettre S cesse de clignoter, ainsi le nouveau code du mobile est accepté.

Pour sélectionner la vitesse, presser une des flèches haut/bas, ce qui affiche la vitesse déjà sélectionnée dans la zone à droite du RPM. Régler la vitesse par les flèches haut/bas (la vitesse utilisée est de 10 tour/min). Lorsque la vitesse souhaitée est affichée, presser une nouvelle fois sur la touche SET SPEED pour confirmer.

Une fois que toutes ces étapes sont effectuées, la mesure de la viscosité peut commencer : Placer et centrer le mobile et l'immerger dans le produit, en prenant soin de ne pas toucher le fond du pot.

▪ Presser la touche MOTOR ON/OFF pour que le viscosimètre DV-I commence à tourner.

▪ La viscosité est affichée en Centi-Poise (cP). Après quelques secondes de rotation du mobile, noter la valeur se répétant à plusieurs reprises ou se stabilisant pendant un laps de temps important, cette valeur obtenue correspond à la viscosité de l'échantillon pour essai.

## ❖ Turbidimètre

### Informations générales

Le turbidimètre TN-100 / T-100 étanche à l'eau permet de mesurer la Turbidité d'un échantillon . La turbidité est signalée dans les unités de turbidité néphélométrique (NTU). Les lectures supérieures à 1000 NTU se situent dans la gamme de cet instrument.

Avant d'allumer le turbidimètre TN-100 / T-100, un flacon d'échantillon DOIT être placé dans le puits d'échantillonnage. On peut utiliser n'importe laquelle des normes d'étalonnage.

### Procédure de mesure

1. Placez le turbidimètre TN-100 / T-100 sur une surface plane.
2. Placer le flacon d'échantillon à l'intérieur de l'échantillon et aligner la marque du flacon Avec la note d'index du compteur.
3. Enfoncez le flacon jusqu'à ce qu'il soit complètement enfoncé.
4. Allumez le compteur en appuyant sur le bouton Touche ON / OFF.
5. Après la séquence power-sup, L'affichage clignote [--Rd--] pendant environ 12 secondes.
6. Une valeur apparaîtra. Notez la lecture.

## **Résumé**

L'objectif de ce travail est d'abord la formulation d'un sirop simple optimum, obtenu en utilisant le plan d'expérience, puis la formulation d'un sirop pharmaceutique par ajout, au sirop simple optimum obtenu, l'huile essentielle de thym. Pour atteindre cet objectif l'influence de la température, de la vitesse d'agitation et de la concentration du saccharose sur la densité, la viscosité et la turbidité du sirop formulé a été étudiée. Les résultats d'analyse mathématique a permis de valider le modèle obtenu pour la densité, et la viscosité. Pour la turbidité le modèle n'est pas ajusté. L'huile essentielle extraite par hydro distillation de type Clévenger, est obtenue avec un rendement acceptable. Ses propriétés organoleptiques, physico-chimiques et le nombre de ses composés chimiques, sont en accord avec les normes de la pharmacopée. L'activité antibactérienne de cette huile sur souches bactériennes est démontrée. La soumission du produit fini à différents tests de qualité tels que le contrôle de son caractère organoleptique, la mesure de sa densité et de sa viscosité a montré qu'il est conforme aux normes pharmaceutiques.

**Mots clés :** formulation, sirop, plan d'expérience, optimisation, thym, huile essentielle, caractérisation.

## **Summary**

The objective of this work is initially the formulation of an optimum simple syrup, obtained by using the experimental design, then the formulation of a pharmaceutical syrup per addition, with optimum simple syrup obtained, the essential thyme oil. To achieve this goal the influence of the temperature, the stirring velocity and concentration of saccharose on the density, the viscosity and the turbidity of formulated syrup was studied. The results of mathematical analysis made it possible to validate the model obtained for the density, and viscosity. For turbidity the model is not adjusted. The essential oil extracted by hydro-distillation of the Clévenger type, is obtained with an acceptable output. Its organoleptic, physico-chemical properties and the number of its chemical compounds, are in agreement with the standards of the pharmacopeia. The antibacterial activity of this oil on bacterial strains is shown. The tender of the end product with various tests of quality such as the control of its organoleptic nature, the measurement of its density and its viscosity showed that it is in conformity with the pharmaceutical standards.

**Keywords:** formulation, syrup, experimental design, optimization, thyme, essential oil, characterization.