

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : Pharmacie Industrielle

Intitulé du mémoire

Conception et comparaison des activités
anti-inflammatoires des formulations
pharmaceutiques élaborées à partir du genre
Inula

Présenté par :

Mr: HOUARI Walid

Melle: MADAOUI Batoule

Encadré par :

Mr : BOUTOUMI Hocine

Année universitaire 2021/2022

Résumé

La mise en forme appropriée des extraits de plantes constitués de métabolites secondaires ayant des activités pharmacologiques contribue à l'amélioration de leurs activités thérapeutiques. Les extraits méthanoliques de l'*Inula viscosa* L. et de l'*Inula montana* L. obtenu avec des rendements respectifs de 18.15% et 14.81% à l'aide de l'extraction par soxhlet et un bain à ultrason sont riches en métabolites secondaires comme les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins.

L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode du DPPH des extraits polaires des deux plantes à permis grâce aux valeurs respectives des IC₅₀ 211.79µg/ml et 237.15µg/ml de montrer la richesse en polyphénols et la capacité de piégeage des radicaux de l'*Inula viscosa* L. par rapport à l'*Inula montana* L.. En plus, l'activité anti-inflammatoire in vitro et in vivo de l'*Inula viscosa* L. et de l'*Inula montana* L. est meilleur comparativement au diclofenc sodique avec taux de réduction de l'inflammation de 27.03% et 50.74% respectivement.

Enfin, les émugels et les suppositoires élaborés à partir des extraits de l'*Inula viscosa* L. et de l'*Inula montana* L. sont conformes aux normes requise d'après les tests de stabilité et les profils rhéologiques.

Mots clés : *Inula viscosa*L., *Inula montana*L., polyphénols, activité anti-inflammatoire, émugel, suppositoire.

Abstract

The appropriate shaping of plant extracts consisting of secondary metabolites with pharmacological activities contributes to the improvement of their therapeutic activities. The methanolic extracts of *Inula viscosa* L. and *Inula montana* L. obtained with respective yields of 18.15% and 14.81% using Soxhlet extraction and an ultrasonic bath are rich in secondary metabolites such as polyphenols, flavonoids and tannins.

The evaluation of the antioxidant activity by the DPPH method of the polar extracts of the two plants made it possible to show the richness in polyphenols and the capacity of scavenging of the radicals of *Inula viscosa* L. In addition, the *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of *Inula viscosa* L. and *Inula montana* L. was better than that of diclofen sodium, with a reduction in inflammation of 27.03% and 50.74% respectively.

Finally, the emulgels and suppositories made from the extracts of *Inula viscosa* L. and *Inula montana* L. comply with the required standards according to the stability tests and rheological profiles.

Key words: *Inula viscosa* L., *Inula montana* L., polyphenols, anti-inflammatory activity, emulgel, suppository.

ملخص

يساهم الشكل المناسب للمستخلصات النباتية التي تتكون من نواتج أبيضية ثانوية ذات أنشطة دوائية في تحسين أنشطتها العلاجية. تم الحصول على المستخلصات الميثانولية من الماقرمان ل. و الماقرمان الجبلية ل. بإنتاجية من 18.15% و 14.81% باستخدام مستخلص صوكسلي وحمام بالموجات فوق الصوتية غنية بالمستقلبات الثانوية مثل البوليفينول والفلافونويد والعفص.

سمح بتقييم نشاط مضادات الأكسدة بواسطة طريقة د ب ب ه للمستخلصات القطبية للنباتين بفضل قيم كل منها ل. ميكروغرام / مل و 237.15 ميكروغرام / مل لإظهار الثراء في البوليفينول وقدرة محاصرة جذور IC50 211.79 الماقرمان ل. مقارنة بـ الماقرمان الجبلية ل. بالإضافة إلى ذلك ، فإن النشاط المضاد للالتهابات في المختبر وفي الجسم الحي لـ الماقرمان ل. و الماقرمان الجبلية ل. أفضل مقارنة مع ديكلوفيناك صوديوم مع معدل تقليل الالتهاب بنسبة 27.03% و 50.74% على التوالي.

أخيرًا ، تتوافق أقراص إمولجيل والتحاميل المصنوعة من مستخلصات الماقرمان ل. و الماقرمان الجبلية ل. مع المعايير المطلوبة وفقًا لاختبارات الثبات والملاح الريولوجية.

الكلمات المفتاحية : الماقرمان ل.، و الماقرمان الجبلية ل. البوليفينول، النشاط المضاد للالتهابات ، إمولجيل ، تحميلية.

Remerciement

Nous remercions tout d'abord "Allah" le tout puissant de nous avoir donné la force et la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

On tient à remercier très sincèrement notre promoteur Mr BOUTOUMI Hocine, Professeur à l'université de Blida 1, faculté de Technologie et directeur du laboratoire de Génie Chimique, pour l'honneur qu'il nous a fait en dirigeant cette recherche, et pour son infinie gentillesse et encouragement, sa grande disponibilité constante. Permettez-nous d'exprimer nos profondes gratitude et notre estime pour nous avoir fait bénéficier de son expérience, sa rigueur scientifique, et surtout ses orientations, aussi bien pour l'ambiance sympathique qu'il a créé et sa précieuse aide tout au long la période et de mettre à notre disposition tous les moyens nécessaires et de nous guider pour la réussite de cet humble travail. On a la chance d'être l'un de ses étudiants auprès d'un professeur de talent et d'une grande compétence et professionnalisme, il nous a permis de profiter de l'étendue de ses connaissances.

De même, on remercie également l'ensemble de l'équipe du Laboratoire de génie chimique de l'Université de Saad Dahleb Blida 1 qui nous a bien accueilli, ça a été un vrai honneur de travailler au sein de cette équipe dans un environnement dynamique et sérieux et le CRD SAIDAL qui nous a prêté main forte pour l'accomplissement de ce thème.

Enfin, nous aimerons remercier l'ensemble des enseignants de Département de Génie des Procédés, surtout qui ont contribué à ce travail.

À tous ceux et celles qui nous ont aidés de près ou de loin, par un geste, une parole, ou un conseil, on leur dit merci infiniment.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à ceux qui me sont chers:

A mes très chers parents, qui m'ont guidés durant les moments les plus importants de toute ma vie, ma mère qui a toujours été présente pour moi dans toute les étapes de mon existence, et mon père pour sa confiance, ses encouragements, sont soutien dans toute ma carrière d'étude dès le premier pas jusqu'à ce jour là et qui m'appris que la patience est le secret de succès.

A ma chère sœur pour leurs encouragements et soutiens morales au cours de la réalisation de ce mémoire.

À ma chère amie, ma binôme, Batoule qui j'ai pleins des souvenirs tout au long de cette période

Que nous avons passée ensemble. Un profond respect pour ses qualités humaines et sociales.

A mes chères amis : Aymen, Kamel, Issam, Fodil, Safa...

A toute la promotion de pharmacie industrielle 2020/2022.

Je remercie enfin tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin dans l'accomplissement de ce travail.

Et à tous ceux qui me connaissent ...

Walid

Dédicace

À l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail, que je dédie ce mémoire à :

Mes Très Chers Parents

Tout d'abord et spécialement à mon cher papa qui aurais été fière de ma réussite. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte papa, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être.

C'est à travers de vos que j'ai opté pour cette noble profession, et c'est à travers vos critiques que je me suis réalisée. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour. Je t'aime papa, tu va rester toujours dans mon cœur, que Dieu l'accueil dans son vaste paradis.

Allah yrahmak inchalah

À ma très chère mère adorée, Djamila;

La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas, ma vie. Maman que j'adore, la personne qui m'a tout donné sans compter et qui m'a enveloppée de gentillesse. J'exprime mon profond amour à la femme la plus extraordinaire et la plus douce du monde, de lui dire que tu as été pour moi ma meilleure école, et mon meilleur professeur. Ton écoute permanente, et ta présence constante sans failles dans les bons comme les mauvais moments ont toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles, tu es l'exemple de dévouement, car tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours.

À mes adorables sœurs, Ihcene, Wafia, Fatima Zohra et Loubna; qui m'ont bien aidée à tenir le coup jusqu'à la fin, qui me motiver, m'encourage pour donner le meilleur de moi-même. À qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite, je vous adore.

À mon cher ami, mon binôme, Walid ; avec qui j'ai pleins des souvenirs tout au long de cette période.

Que nous avons passée ensemble. Un profond respect pour ses qualités humaines et sociales.

À mes cousins et cousines surtout Marwa et Hadil.

À tous les membres de ma famille.

Spécialement à mes fidèles amies :

Chaima, Sarah et Safa.

À l'ensemble du groupe de ma promotion pharmacie industrielle.

À toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.

Batoufe

Table des matières

Résumé	
Remerciement	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste d'abréviations	
Introduction.....	1
Chapitre 1 Description sur les plantes de genre Inula.....	2
1. Les plantes médicinales.....	3
1.1. Généralité sur les plantes médicinales.....	3
1.1.1. La phytothérapie.....	3
1.1.2. Famille des Asteraceae et genre Inula.....	4
1.2. Présentation d'Inula Viscosa L.	4
1.2.1. Etymologie et taxonomie.....	5
1.2.2. La systématique.....	5
1.2.3. Description de la plante.....	6
1.2.4. Répartition Géographique et écologique.....	7
1.2.5. La composition chimique.....	7
1.2.6. Usages traditionnels, propriétés biologiques et pharmacologiques.....	7
1.3. Présentation de l'Inula montana.....	8
1.3.1. Description botanique.....	8
1.3.2. Taxonomie.....	9
1.3.3. Ecologie.....	9
1.3.4. La composition chimique.....	10
1.3.5. Utilisation traditionnelle.....	10
Chapitre 2 Les métabolites secondaires.....	12
2. Introduction.....	13
2.1. Alcaloïdes.....	13
2.2. Terpénoïdes.....	13
2.3. Composés phénoliques.....	13
2.3.1. Acides phénoliques.....	14
2.3.2. Tanins.....	14
2.3.3. Flavonoïdes.....	15
2.3.4. Coumarines.....	17
2.3.5. Anthocyanes.....	18
2.3.6. Les quinones.....	18
2.3.7. Les saponines.....	18
Chapitre 3 Activité anti-inflammatoire.....	20
3. L'inflammation.....	21

3.1.	Définition	21
3.2.	Les causes de l'inflammation.....	21
3.3.	Les types de l'inflammation.....	22
3.3.1.	Inflammation aiguë.....	22
3.3.2.	Inflammation chronique.....	23
3.4.	Les médiateurs de l'inflammation	23
3.5.	Les anti-inflammatoires	23
3.5.1.	Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	24
3.5.2.	Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)	24
3.5.3.	Anti-inflammatoires d'origine végétale	24
3.6.	Action sur L'albumine.....	24
3.7.	Les signes cliniques et biologiques de l'inflammation.....	25
3.7.1.	Les signes cliniques	25
3.7.2.	Les signes biologiques :	25
3.8.	Activité Anti oxydante :	26
3.8.1.	Activité anti oxydante des poly-phénols :	26
Chapitre 4	Formulation semi-solide	28
4.	La Formulation	29
4.1.	Les émulsions.....	29
4.1.1.	Définition	29
4.1.2.	Classification des émulsions	30
4.1.3.	Phénomène de la formation, déstabilisation et stabilisation des émulsions	31
4.2.	Les gels	37
4.2.1.	Définition.....	37
4.3.	Eumlgels	38
4.3.1.	Avantages et inconvénients des emulgels	39
4.4.	Les suppositoires	39
4.4.1.	Définition.....	39
4.4.2.	Les avantages et les inconvénients des suppositoires	40
4.4.3.	Choix de l'excipient.....	40
4.4.4.	Le facteur de déplacement	41
Chapitre 5	Matériels & Méthodes.....	43
5.	Matériel et Méthodes	44
5.1.	Matériels	44
5.1.1.	Matériel végétale.....	44
5.1.2.	Matériel animal	44
5.1.3.	Les produits chimiques.....	45
5.2.	Méthodes.....	46
5.2.1.	Traitement des échantillons	46

5.2.2.	Méthode d'extraction	47
5.3.	Screening phytochimique	52
5.3.1.	Analyses qualitatives	53
5.3.2.	Analyses quantitatives	54
5.4.	Etude in vitro de l'activité anti-thermo-dénaturante des extraits	56
5.4.1.	Extraction de l'ovalbumine.....	56
5.4.2.	Mise au point du protocole d'étude de la dénaturation thermique de l'ovalbumine	56
5.4.3.	Evaluation de l'effet anti-thermo dénaturant des extraits des feuilles des plantes.....	57
5.5.	Activité anti-inflammatoire in vivo	57
5.5.1.	Principe.....	57
5.6.	Evaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques	58
5.6.1.	Pouvoir antiradicalaire (Piégeage du radical libre DPPH)	58
5.7.	Formulation d'Eumulgel 0.5%.....	59
5.7.1.	Contrôle de produit fini d'Emulgel :	61
5.8.	Les suppositoires	62
5.8.1.	Contrôle de produit fini des suppositoires	64
Chapitre 6	Résultats & Discussion	65
6.	Résultats et discussion.....	66
6.1.	Analyses granulométriques des poudres.....	66
6.2.	Rendement des extraits phénoliques	67
6.3.	Screening phytochimique	67
6.3.1.	Analyses qualitatives	67
6.3.2.	Analyses quantitatives	71
6.4.	Activité anti-inflammatoire in vitro des extraits	75
6.5.	Activité anti-inflammatoire in vivo en utilisant l'extrait aqueux d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L.	77
6.6.	Evaluation de l'activité antioxydant.....	80
6.7.	Contrôle de produit fini d'Emulgel	82
6.7.1.	Contrôle des paramètres organoleptiques.....	82
6.7.2.	Contrôle des paramètres physicochimiques :	83
6.8.	Les suppositoires	86
Conclusion	88
Références bibliographiques		

Liste des figures

Figure 1: Plante d' <i>Inula viscosa</i> .	5
Figure 2: Les feuilles d' <i>Inula viscosa</i> .	6
Figure 3: Les fleurs d' <i>Inula viscosa</i> .	6
Figure 4: Feuilles et fleurs d' <i>Inula montana</i> L.	9
Figure 5: Structures de base des acides phénoliques [77].	14
Figure 6: Structures chimiques des tanins [77].	15
Figure 7: Structure de base des principales classes des flavonoïdes [85].	17
Figure 8: Structure de base des coumarines.	18
Figure 9: Structure de base des anthocyanes.	18
Figure 10: L'inflammation et le système immunitaire.	21
Figure 11: Représentation d'une émulsion. [128]	29
Figure 12: Différents types d'émulsions [136].	30
Figure 13: Les mécanismes de déstabilisation des émulsions.	34
Figure 14: Schéma simplifié d'une molécule de tensioactif.	35
Figure 15: Représentation d'un tensioactif.	35
Figure 16: Schéma de formation et de structure d'un gel physique [160].	38
Figure 17: Schéma de la structure d'un gel chimique réticulé [160].	38
Figure 18: Feuilles sèches d' <i>Inula viscosa</i> L.	Error! Bookmark not defined.
Figure 19: Schéma de principe de l'extraction par Soxhlet [178].	48
Figure 20: Appareil d'évaporateur rotatif.	49
Figure 21: extrait éthyrique	50
Figure 22: Extrait méthanolique.	50
Figure 23: Extraction par le bain ultrasons.	51
Figure 24: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.	59
Figure 25: Procédés d'émulsification.	60
Figure 26: Moule de suppositoire.	63
Figure 27: Résultats de rendement d'extractions d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L.	66
Figure 28: Les rendements d'extraction d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L.	67
Figure 29: Spectre IRTF d'extrait <i>Inula viscosa</i> L.	70
Figure 30: Spectre IRTF d'extrait <i>Inula montana</i> L.	70
Figure 31: La courbe d'étalonnage d'acide gallique.	71
Figure 32: Teneur en polyphénols d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L..	72
Figure 33: La courbe d'étalonnage de Quercétine.	73
Figure 34: Teneur en flavonoïdes d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L..	73
Figure 35: La courbe d'étalonnage de Catéchine.	74
Figure 36: Teneur en tanins condensés d'extrait <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L..	74
Figure 37: Résultats de test in vitro.	77
Figure 38: pattes coupés des souris.	78
Figure 39: Résultats de l'activité anti-inflammatoire in vivo.	79
Figure 40: Pouvoir réducteur DPPH de l'extrait d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L.	80
Figure 41: Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des concentrations de <i>Inula viscosa</i> L.	81

Figure 42: Pourcentage d'inhibition du radicale libre en fonction des concentrations de Inula montana L.	81
Figure 43: Valeurs des IC50 d'extraits Inula viscosa L. et Inula montana L.	82
Figure 44: Emulgel 0.5% à base d'extrait des polyphénols.	82
Figure 45: Résultat de test de centrifugation.	83
Figure 46: Grossissement $\times 40$ Figure 47: Grossissement $\times 160$	83
Figure 48: La variation de la viscosité (η) de l'émulgel en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}^*$ (S-1).	84
Figure 49: La variation de la contrainte de cisaillement (τ) de l'emulgel en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}^*$ (S-1).	85
Figure 50: Variations des modules de conservation (élastique) G' et des modules au repos (visqueux) G'' de l'emulgel.	86
Figure 51: Suppositoire à base d'extraits des polyphénols.	87

Liste des tableaux :

Tableau 1: Classification systématique d' <i>Inula viscosa</i> L.	6
Tableau 2: valeurs de HLB et surfactants et les fonctions associées.	36
Tableau 3: Avantages et inconvénients des emulgels	39
Tableau 4: Les avantages et les inconvénients des suppositoires	40
Tableau 5: Les solvants chimiques utilisés	45
Tableau 6: Les procédés utilisés et leurs produits chimiques	45
Tableau 7: Les instruments utilisés	46
Tableau 8: Avantages et inconvénients d'extraction par soxhlet et ultrason	52
Tableau 9: Les matières utilisées dans la formulation	59
Tableau 10: Résultats de rendement d'extractions d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L.	66
Tableau 11: Résultats qualitatifs du screening phytochimique	68
Tableau 12: Différents concentrations des solutions d'acide gallique.	71
Tableau 13: Absorbance de différentes concentrations d'acide gallique.	71
Tableau 14: Résultats du dosage de polyphénols des deux extraits.	72
Tableau 15: Différents concentrations des solutions de quercétine.	72
Tableau 16: Absorbance de différentes concentrations de quercétine.	72
Tableau 17: Résultats du dosage de flavonoïdes d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L..	73
Tableau 18: Différents concentrations des solutions de Catéchine.	74
Tableau 19: Absorbance de différentes concentrations de Catéchine.	74
Tableau 20: Résultats du dosage des tanins des deux extraits.	74
Tableau 21: Les résultats de l'activité anti-thermo-dénaturantes de Diclofénac avant et après l'incubation.	75
Tableau 22: Les résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro de Diclofenac par l'activité anti-thermo-dénaturante.	76
Tableau 23: Les résultats de l'activité anti-thermo-dénaturantes des extraits avant et après l'incubation.	76
Tableau 24: Les résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro des extraits par l'activité anti-thermo-dénaturante.	76
Tableau 25: poids des pattes des souris de chaque lot pour l'extrait aqueux d' <i>Inula viscosa</i> L.	78
Tableau 26: poids des pattes des souris de chaque lot pour l'extrait aqueux d' <i>Inula montana</i> L.	79
Tableau 27: Résultats de test anti-inflammatoire in vivo en utilisant l'extrait aqueux d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L.	79
Tableau 28: Les résultats de l'activité antiradicalaire d' <i>Inula viscosa</i> L. et <i>Inula montana</i> L..	80

Liste d'abréviations

AIS : Ani-Inflammatoire Stéroïdien.

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien.

CRP : Protéine C-Réaction.

EAG : Equivalant Gramme Acide Gallique.

EAC : Equivalant Gramme Catéchine.

EGQ : Equivalant Gramme Quercétine.

H : Huile.

HLB : Hydrophilic Lipophilic Balance.

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice 50.

IL : Interleukine.

kHz : kiloHertz.

ORL : Oto-Rhino-Larynologie.

PA : Principe Actif.

pH : potentiel Hydrogène.

rpm : Tour par minute.

TCs : Tanins Catéchiqes.

TNF : Facteur de Nécrose Tumorale.

VS : Vitesse de Sédimentation.

Introduction

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse. Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires non stéroïdiens comme Diclofenac et stéroïdiens (glucocorticoïdes). Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation à long terme.

Les plantes médicinales ont toujours eu un rôle de grande importance sur la santé [1]. À l'heure actuelle, les substances naturelles dans les plantes sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles représentent près de 60% des médicaments, dont nous disposons [2]. Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nées de la synthèse chimique de molécules ou parties de molécules naturelles prises comme tête de séries [3].

Parmi ces plantes: l'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. dont nous sommes intéressés. Elles font partie de la famille des Astéracées. Ces espèces sont originaires principalement des bords de la méditerranée, elles sont largement répandue en Algérie. Dans le domaine de la pharmacologie de nombreuses recherches ont été réalisées pour démontrer ses éventuelles propriétés anti-inflammatoires, anti-ulcérogéniques, anti-oxydante, anti-tumoral...

Dans ce contexte, l'objectif visé par cette étude consiste à valoriser les feuilles des deux plantes considérées pour des fins thérapeutiques en utilisant son principe actif afin de formuler un emulgel et suppositoires possédant une activité anti inflammatoire non stéroïdien.

Pour réaliser cet objectif, nous avons structuré notre travail comme suit:

- ✓ La première partie est consacrée à une étude bibliographique dans laquelle est présenté l'activité anti-inflammatoire, les plantes médicinales, les métabolites secondaires ainsi que la formulation pharmaceutique.
- ✓ La deuxième partie se focalise d'une partie expérimentale dans laquelle décrite les techniques d'extractions utilisées, le screening phytochimique, les caractérisations physico-chimique des extraits ainsi qu'une description succincte du procédé de formulation d'emulgel et suppositoire, suivi d'une discussion des résultats obtenus.
- ✓ Enfin, ce mémoire est achevé par une conclusion générale dans laquelle résumés les résultats les plus importante de cette étude.

Chapitre 1

Description sur les plantes de genre

Inula

1. Les plantes médicinales

1.1. Généralité sur les plantes médicinales

La nature est la source des agents médicinaux; dont les plantes constituent un patrimoine précieux pour l'humanité. Une croyance bien répandue est que toute plante soigne [4]. L'homme a utilisé les plantes à d'autres fins que de la nourriture [5,6], c'est l'usage des plantes comme des médicaments [7].

Les plantes médicinales sont des drogues végétales qui possèdent des propriétés médicamenteuses [8]. Elles sont utilisées pour soigner et soulager divers maux dont leur efficacité provient de leurs constituants chimiques [9].

Les végétaux contiennent au niveau de leurs organes des principes actifs utilisables en phytothérapie. En effet, ils sont connus pour leurs pouvoirs bienfaiteurs sur la santé humaine et présentent des avantages dont les médicaments en sont souvent dépourvus [9].

Les plantes médicinales sont impliquées dans différents secteurs sous formes d'huiles, d'extraits et des solutions aqueuses ou organiques [8].

Grâce aux études scientifiques basées sur des méthodes analytiques et les expérimentations nouvelles, que le monde médical découvre de plus en plus, le bien fondé des prescriptions empiriques des plantes médicinales [10].

1.1.1. La phytothérapie

La phytothérapie est l'une des plus anciennes médecines du monde. En Algérie, elle existe depuis un millier d'années [11].

Elle est définie comme étant le traitement par les plantes, c'est la consommation ou l'utilisation par voie externe, de produits préparés à partir de plantes, sans passer par une étape de sélection des molécules, on ne consomme donc pas que le principe actif, mais tout ce que contient la plante [12].

On distingue différents types de thérapies par les plantes :

- **La phytothérapie** : Utilisation des différentes parties des plantes (racine, feuilles, fleurs ou la plante entière) sous différents formes galéniques.
- **La gemmothérapie** : Utilisation des bourgeons de la plante.
- **L'aromathérapie** : Utilisation des huiles essentielles obtenues grâce à divers procédés d'extraction.
- **Phytothérapie pharmaceutique** : Utilisation des extraits des produits végétaux obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant. Par la

suite ces extraits sont dosés en quantités importantes pour avoir une action soutenue et rapide (sirop, de gouttes, de gélules...) [13].

1.1.2. Famille des Asteraceae et genre Inula

La famille des Astéracées ou Composées est une famille importante de plantes angiospermes dicotylédones qui comprend près de 26000 espèces réparties en 1500 genres et 25000 espèces présentes surtout, dans les régions tempérées du monde. En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces.

Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille. Elles peuvent être annuelles, bisannuelles ou vivaces, et se caractérisent par de petites fleurs regroupées en capitules, c'est-à-dire serrées les unes à côté des autres, sans pédoncules, placées sur l'extrémité d'un rameau ou d'une tige et entourées d'une structure formée par des bractées florales appelée involucre.

Les fruits sont des akènes, souvent couronnés d'une aigrette de soies appelée Pappus qui favorise la dispersion des graines par le vent. Les feuilles des Astéracées sont généralement alternes, simples, mais chez certaines espèces, elles peuvent être divisées.

La famille des Astéracées est couramment en vedette dans des revues médicales grâce aux lactones sesquiterpéniques qu'elle contient. Ces composés phytochimiques sont une cause importante de la dermatite de contact. Les Astéracées sont largement utilisées en médecine populaire pour guérir un bon nombre de maladies grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes [14].

Inula de la famille Compositae (Asteraceae) est le plus grand genre dans la tribu Inuleae qui regroupe environ une centaine d'espèces. Ce genre est présent principalement en Afrique, en Asie et dans la région Méditerranéenne de l'Europe [15].

Plusieurs *Inula* ont été largement utilisées dans la médecine traditionnelle partout dans le monde, du fait des diverses activités biologiques qui leur sont attribuées telles que : anti-cancer, antibactérienne, hépatoprotectrice, cytotoxique, et anti-inflammatoire [16].

1.2. Présentation d'*Inula Viscosa* L.

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques [16], parmi lesquelles la famille des Astéracées représentée par le genre *Inula* [17]. Le nom *Inula* est très ancien et vient du nom de l'espèce *Inula Helenium*. L'inule visqueuse est l'un des rares représentants du genre *Inula* [18].



Figure 1: Plante d'*Inula viscosa* L.

1.2.1. Etymologie et taxonomie

En 1983 d'après **Fauron et al**, le nom Inule viendrait du grec ; « Iné » la signification de « Je purge » une allusion à une propriété thérapeutique de la plante [19].

Par la suite *Viscosa* veut dire visqueuse [20]. *Inula viscosa* L. est aussi nommée « *Dittrichia viscosa* (L) Greuter » la synonymie de « *Capularia viscosa* » vu qu'elle possède des poils glanduleux sur l'ovaire, ce qui la diffère des autres espèces du genre *Inula* [21].

Cette dernière a d'autres noms vernaculaires tel que :

- **Aunée visqueuse** [20].
- Anglais : **Stichky fleabane** [22].
- Maroc : **Terhalâ** [23].
- Berbère : **Amagramane/Bayraman** [24].
- Vernaculaires : **Magramane/Mersitt** [24].
- Arbre littéraire : **ELTayoune**.

1.2.2. La systématique [25]

Selon **Wunderlin**, la position systématique d'*Inula viscosa* L. est la suivante :

Tableau 1: Classification systématique d'*Inula viscosa* L.

Règne	Plantea
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliophyta
Ordre	Asterales
Famille	Asteracea
Genre	<i>Inula</i>
Espèce	<i>Inula Viscosa</i> L

1.2.3. Description de la plante

Inula viscosa L. est une espèce très mellifère [26, 27]. C'est un arbuste vivace, atteint de 50cm à 1m de hauteur [28,29], qui fleurit en été en automne et sa croissance est rapide [30].

Les feuilles sont visqueuses, sinuées [18,30] sessiles, ondulées, dentées, aigües, rudes [28] simples, caduques, opposées, entières, ovales, acuminées de 2 à 3cm de long sur 1 à 1,5cm de large [29].

Les fleurs sont de couleur jaune parfumées à odeur forte et sont toute fertiles [30]. La plante couverte de poils glanduleux qui libèrent une résine odoriférante et collante [31].



Figure 2: Les feuilles d'*Inula viscosa* L.



Figure 3: Les fleurs d'*Inula viscosa* L.

1.2.4. Répartition Géographique et écologique

Cette espèce est présente dans tout le bassin méditerranéen. Son aire de répartition naturelle comprend l'Afrique du Nord [32,33], elle est commune dans l'ensemble des pays du Maghreb : la Tunisie, le Maroc et largement répandue dans le nord de l'Algérie et dans tout le pourtour méditerranéen jusqu'au cœur du Sahara. Ainsi qu'en les côtes de l'Europe du Sud (Espagne, Grèce, Italie, Bulgarie), le Moyen-Orient (Jordanie, Syrie, Egypt, et Turquie) [33,34].

Les habitats typiques d'*Inula viscosa* L. sont les rivières asséchées et les bords de routes, les champs abandonnés, sentiers de randonnée, ou même des zones urbaines. Elles préfèrent les sols argileux et sableux [35], les côtes rocheuses ou dans des marécages naturels et autres zones humides avec une exigence de la lumière. Cette touffe verte, envahissante se produit également dans des surfaces où les sols ont de hautes concentrations en magnésium et en Azote [33].

1.2.5. La composition chimique

Les feuilles de l'inule visqueuse contiennent des composants chimiques ont révélé la présence de nombreux composés biologiquement et pharmacologiquement actifs, notamment des flavonoïdes, terpénoïdes [36], lactones sesquiterpènes (tomentosine, inuviscolide et acide isocostique) [37], et huiles essentielles [38]. Dont la concentration varie selon les différentes parties (feuilles, racines et fleurs). Ses composants majoritaires sont le camphre, l'eucalyptol et le thymol [39].

De plus, une étude menée sur l'extrait des feuilles d'*Inula viscosa* L. a montré sa richesse en constituants du polyphénol [40]. Donc, elle est une bonne source de phénols et d'anti-oxydants naturels qui pourraient avoir des avantages pour la santé [41].

1.2.6. Usages traditionnels, propriétés biologiques et pharmacologiques

L'Inule est une plante très anciennement connue, elle a été utilisée au moyen âge jusqu'à nos jours pour ses vertus médicinales variées [20].

Dans le Nord de l'Afrique et le pourtour méditerranéen, l'Inule est connue pour ses propriétés anthelminthiques donc vermifuge et occupe une place appréciable dans les médications traditionnelles [42]. Les feuilles sont utilisées en cataplasme pour traiter les abcès, la gale, dermatose, impétigo, furoncles, des ulcères, des gerçures, et comme cicatrisant des plaies cutanées [43]. La racine crue écrasée est ingérée dans le traitement de l'hypertension, de la tuberculose, des affections poitrinaires, des infections respiratoires et bronchiques [44]. Les parties aériennes sont aussi utilisées en décoction pour le traitement de la pression artérielle, du diabète et des pathologies rénales [45].

Inula viscosa L. a fait l'objet de plusieurs études démontrant et confirmant les multiples activités biologiques pharmacologiques de cette plante telle que l'activité anti-inflammatoire [46,47], antipyrétiques et antiseptiques [48], l'activité antimicrobienne [49], antifongique [50], hypoglycémiant et hypolipidémiant [51], antiulcérogénique [52], antioxydante [53], antivirale [54] et l'activité antitumoral [55].

1.3. Présentation de l'*Inula montana*

Inula montana L. est une plante bien distribuée dans la région méditerranéenne. À notre connaissance, cette plante n'est pas utilisée dans la médecine traditionnelle largement dans le monde. Dans le sud de la France, *Inula montana* L. était incorrectement appelé "Arnica" parce qu'il était utilisé dans l'ancienne médecine traditionnelle comme médicament alternatif à la célèbre *Arnica montana* [56].

1.3.1. Description botanique

Inula montana L., dont le nom français est « inule des montagnes », appartient à la famille botanique des Asteraceae.

L'inule des montagnes croit au sein des pelouses sèches rocailleuses de l'étage supra-méditerranéen, sur substrat calcaire. On la trouve également, avec une moindre fréquence à plus basse altitude.

C'est une plante dressée de 10 à 40 cm de hauteur. La pilosité des feuilles est laineuse et blanchâtre. Les racines sont des souches ligneuses et rampantes. La tige est simple, molle et souvent sinueuse. Les feuilles sont espacées, obtuses, entières ou très obscurément denticulées, blanches soyeuses en dessous, pubescentes en dessus, oblongues lancéolées. Les fleurs sont des capitules jaunes. Le capitule est grand, solitaire au sommet de la tige, rarement bi ou trifurqué, de diamètre supérieur à 1 cm. Les fruits sont des akènes poilus. La floraison s'étend de mai à juillet [57,58–60].



Figure 4: Feuilles et fleurs d’*Inula montana* L.

1.3.2. Taxonomie [61]

- Règne : Plantae.
- Sous-règne : Tracheobionta.
- Superdivision : Spermatophyta.
- Division : Magnoliophyta.
- Classe : Magnoliopsida.
- Sous-classe : Asteridae.
- Ordre : Asterales.
- Famille : Asteraceae.
- Genre : *Inula*.
- Espèce : *Inula montana*.
- Synonymes: *Aster montanus* (L.) All. *Helenium montanum* (L.) Kuntze; *Pulicaria calycina* C.Presl; *Inula calycina* (C.Presl) C.Presl; *Inula argentea* Gand.; *Inula beugesiaca* Gand.; *Inula villosa* L.
- Nom français : Inule des montagnes, Arnica de Provence.

1.3.3. Ecologie

Les principaux milieux où l’on trouve *Inula montana* L. Ce sont des coteaux et/ou des monts secs, arides des terrains calcaires (pelouses basophiles) de 100 à 1200 m. Elle est répartie sur le pourtour du bassin méditerranéen. En France, elle est présente dans la moitié sud, en Bourgogne, en Berry et en Vendée, dans les Alpes-Maritimes et les Pyrénées-

Orientales. Elle est également présente en Espagne, en Suisse, en Italie et au Maghreb [62,63].

1.3.4. La composition chimique

Des études phytochimiques antérieures ont conduit à l'isolement d'aglycones flavonoïdes, sesquiterpène lactones et dérivés d'inositol [56, 64,65]. Extraits bruts et certains constituants purifiés d'*I. Montana* ont des activités antioxydantes, protozoocides et anti-inflammatoires démontrées [64, 66,67].

Le but de l'étude est de valider l'utilisation traditionnelle d'*Inula montana* en évaluant ses propriétés anti-inflammatoires potentielles et d'évaluer l'utilisation possible d'*Inula montana* L. comme alternative à *Arnica montana*, une espèce végétale en voie de disparition et difficile à cultiver [68].

Les deux espèces font partie de la famille des Astéracées. Ils contiennent des classes chimiques similaires de composés, essentiellement des lactones sesquiterpéniques, des acides phénoliques et des flavonoïdes. Sesquiterpène les lactones d'*Inula montana* L. sont différentes de celles d'*Arnica montana*, cependant on peut trouver deux flavonoïdes aglycones décrites chez les deux espèces, la lutéoline et l'hispiduline [69].

1.3.5. Utilisation traditionnelle

En France, *Inula montana* L. est utilisée en médecine traditionnelle provençale. Elle est connue aussi sous nom d'« Arnica de Provence ». Les utilisations traditionnelles ont été décrites par une botaniste française, **Magali AMIR**, dans son ouvrage « Les cueillettes de confiance » [70]. D'après cet ouvrage, nous distinguons les utilisations suivantes :

- Soulagement des coliques intestinales : « Quelques gouttes d'arnica (l'inule des montagnes) sur un sucre, quand on avait des coliques ».
- Propriétés antitraumatiques : « L'usage de l'inule s'étend alors aux entorses, aux douleurs musculaires et aux rhumatismes », « à l'extérieur ... est très efficace sur les hématomes ».

Les préparations traditionnelles utilisent les fleurs et/ou les parties aériennes d'*Inula montana* L. sous plusieurs formes :

- Drogue végétale telle que : « Tu coupes les fleurs avec deux-trois centimètres de tige. Tu as un gros bleu, tu prends la fleur, tu passes la fleur sur ton bleu ».
- Macération alcoolique : « Tu mets de l'alcool, tu fais macérer pendant un gros moiset tu peux la garder pendant cinq-dix ans ».
- Macération dans de l'huile d'olive : « Quelques personnes mettent dans de l'huile d'olive. On s'en sert alors sur les brûlures, piqûres et boutons où la plante, semble-t-il, confère des propriétés désinfectantes et cicatrisantes à l'huile d'olive » [70].

En Espagne, les fleurs, feuilles et les parties aériennes fraîches sont utilisées sous forme d'infusion, décoction, macérât alcoolique, macérât dans du vin, macérât huileux et préparées avec de l'huile d'olive pour les mêmes indications que l'Arnica montana [62]

Au Maroc, les feuilles sont utilisées en médecine traditionnelle sous forme de thé pour la santé en général, pour des problèmes gastro-intestinaux, ORL et respiratoires [71].

Chapitre 2

Les métabolites secondaires

2. Introduction

Les métabolites secondaires sont des produits naturels à structures complexes, composant la fraction la plus active des composés chimiques des végétaux, ils varient dans leurs constituants selon les espèces. Ils sont connus par leurs exécutions des fonctions écologiques différentes notamment dans la défense contre les herbivores pathogènes [72].

Ces métabolites secondaires sont classés en trois principales familles : les alcaloïdes, les terpènes et les polyphénols.

2.1. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont un groupe azotés et basiques issus principalement des plantes, et caractérisés par un goût amer et une structure complexe. Ils sont peu solubles dans l'eau et solubles dans l'alcool.

La plupart des alcaloïdes qui représentent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales ou toxiques sont utilisés dans plusieurs médicaments (morphine, quinine, cocaïne, atropine, codéine, caféine, éphédrine ...). Ils ont aussi une action physiologique remarquable sur le système nerveux (antispasmodique, mydriatique, anesthésique locale) [73].

2.2. Terpénoïdes

Les terpènes (nommés aussi terpénoïdes ou isoprénoïdes) représentent une classe de composés hydrocarbonés naturels de structure cyclique ou linéaire [74]. Il a été répertorié plus de 30000 composés différents dont la grande majorité est spécifique au règne végétal et qui englobe les arômes et parfums, les antibiotiques, les hormones végétales et animales ainsi que les lipides des membranes [75].

Ces composés sont formés par l'assemblage d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone. Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue les monoterpènes, les sesquiterpènes, les diterpènes et les triterpènes.

Les terpénoïdes prennent de plus en plus d'importance notamment à cause de leurs effets sur la santé. En effet, ils ont des propriétés : antimicrobienne, antifongique, antiparasitaire, antivirale, anti-allergénique, antispasmodique, anti-hyperglycémique, anti-inflammatoire et immunomodulatrice [76].

2.3. Composés phénoliques

Les polyphénols forment une grande famille de molécules organiques qui sont synthétisées par les végétaux. Ils sont contenus dans tous les organes de la plante et sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques portant des groupements hydroxyles, libres ou engagés avec un glucide.

Ces molécules actives d'un potentiel substantiel en santé, sont importantes en alimentation humaine où elles sont utilisées dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique. Par ailleurs, elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques et thérapeutiques en raison de leurs pouvoirs antioxydants, anti-inflammatoires et antiviraux. Aussi, ces molécules jouent un rôle important dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel [77].

Selon leurs caractéristiques structurales, les polyphénols se répartissent en une dizaine de classes chimiques, dont les principales sont les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins et les coumarines.

2.3.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des molécules organiques aromatiques d'origine végétale, possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique.

Les acides phénols ont des propriétés antioxydantes, anti-radicalaires, anti-inflammatoires, antiseptiques et antipyrétiques. Ils peuvent contribuer à prévenir l'apparition de plusieurs maladies telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires ainsi que celles liées au vieillissement en neutralisant les radicaux libres de l'organisme.

Il existe une grande variété de phénols qui peuvent être classés en fonction du nombre et de l'arrangement de leurs atomes de carbone. On distingue deux groupes d'acides-phénols : les acides hydroxycinnamiques (structure de base de type C6-C1) et les acides hydroxybenzoïques (C6-C3) [78].

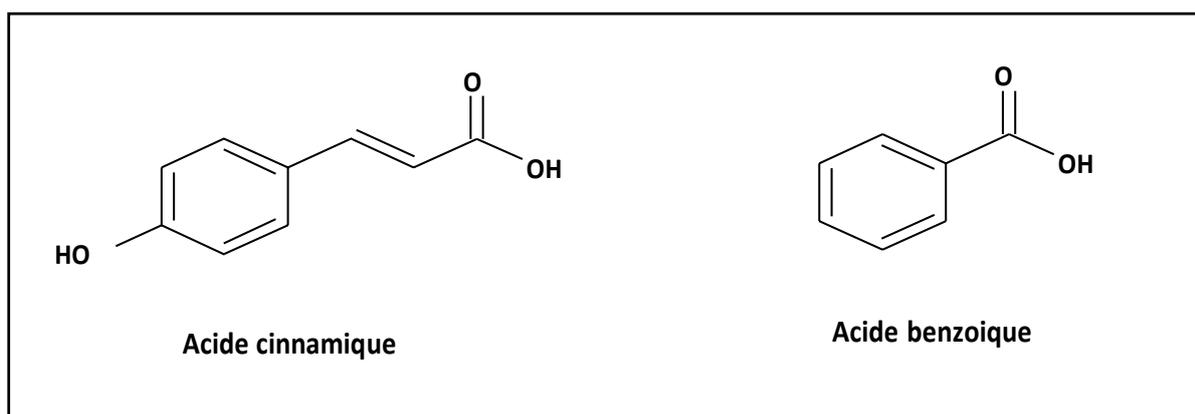


Figure 5: Structures de base des acides phénoliques [77].

2.3.2. Tanins

Les tanins sont des molécules organiques contenus dans tous les végétaux, et dans tous leurs organes (écorces, feuilles, fruits, racines et graines). Ils appartiennent au groupe de substances phénoliques polymériques, avec des structures chimiques très variables [77].

L'utilisation principale des tanins est le tannage des peaux. Cette aptitude provient de la

création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène. En plus, ils ont la capacité de se combiner aux protéines et à d'autres polymères organiques tels que les glucides, les alcaloïdes, les acides nucléiques et les métaux lourds pour former avec eux des complexes stables [78].

En raison de ces capacités, les tanins auraient des propriétés astringentes antidiarrhéiques, Antiseptiques [80], antioxydantes [81], antimicrobiennes [82], antifongiques, antimutagéniques et anticancéreuses [83]. Ces molécules possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques comme la régénération et la réparation des tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure ainsi que la régulation de la circulation veineuse.

Par ailleurs, les tanins bonifient la peau à rides [80]. Ils sont également utilisés dans l'industrie des encres (par réaction avec des sels ferriques), la teinture d'étoffes, l'encollage du papier ou de la soie et la coagulation du caoutchouc [77].

Selon leurs structures et leurs propriétés, les tanins sont divisés en deux groupes principaux : les tannins hydrolysables (tannoïdes) qui sont des esters de l'acide gallique ou l'acide ellagique et les tanins condensés ou tannins catéchiques (proanthocyanidols) qui sont des polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes de carbone, non hydrolysable mais peuvent être oxydées par les acides forts libérant des anthocyanidines [84].

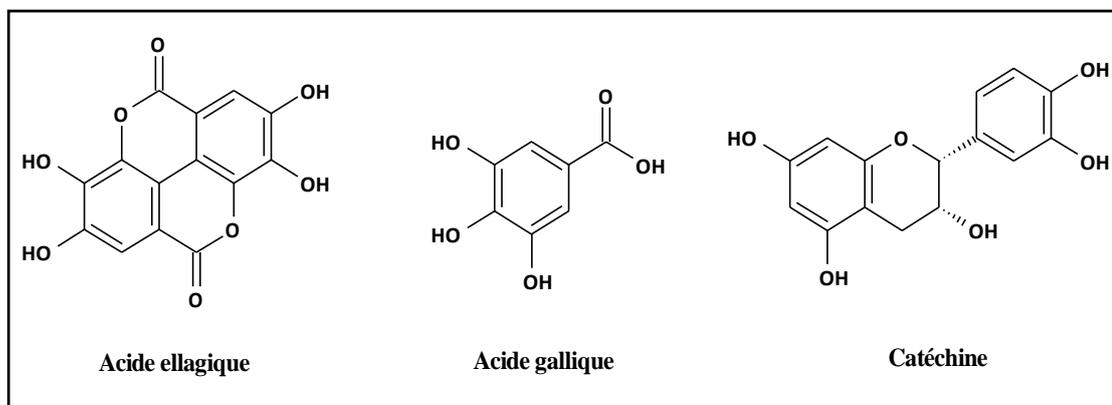


Figure 6: Structures chimiques des tanins [77].

2.3.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un grand groupe de composés phénoliques qui sont les plus abondants dans notre alimentation. Ils sont considérés comme des pigments naturels et généralement hydrosolubles. Ils sont responsables des colorations attirantes des fleurs, des fruits et des feuilles. Ces pigments actifs sont distribués dans la plupart des végétaux avec des structures chimiques variées où souvent, ils sont présents sous forme d'hétérosides [85].

La plupart des flavonoïdes qui ont été identifiés (plus de 5000 composés flavoniques) sont constitués de combinaisons aromatiques en anneau, reliés par un hétérocycle oxygéné. Ils

se répartissent en plusieurs catégories : [86]

➤ **Les flavones :**

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Le noyau flavone est lui-même un dérivé du noyau flavane de base [87].

➤ **Les flavonols :**

Elles se différencient des flavones par l'existence d'un hydroxyle en position 3, qui n'est pas un OH phénolique. [87]

➤ **Les flavanone :**

Ce sont des dérivés des flavones. Ces composés possèdent un carbone asymétrique (C₂). Il existera donc 2 isomères optiques pour chaque composé. [88]

➤ **Les isoflavones :**

Les isoflavones sont des isomères des flavones. Le noyau benzénique latéral est fixé en position 3 et non pas en position 2. Ces composés se trouvent essentiellement dans les légumineuses [89].

➤ **Les flavan-3-ols ou les flavanols :**

Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4 [90]. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme, le chocolat et le thé restent les principales sources de ce composé [91].

➤ **Les anthocyanidines :**

Ce sont des pigments hydrosolubles présents dans la plupart des espèces. Ils sont accumulés dans les vacuoles cellulaires. Ces pigments sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium plus communément appelé cation flavylum [90]. Les composés les plus courants sont la pélagonidine, la cyanidine et la malvidine, mais ils ne sont présents que sous forme de conjuguées glycosylées [92].

Ces composés sont connus principalement par leurs propriétés anti-inflammatoires, antibactériennes, antivirales, antioxydantes, diurétiques, anti-enzymatique et hépatoprotectrices. Ils sont également impliqués dans les processus photosynthétiques et dans la régulation des hormones de croissance des plantes [93].

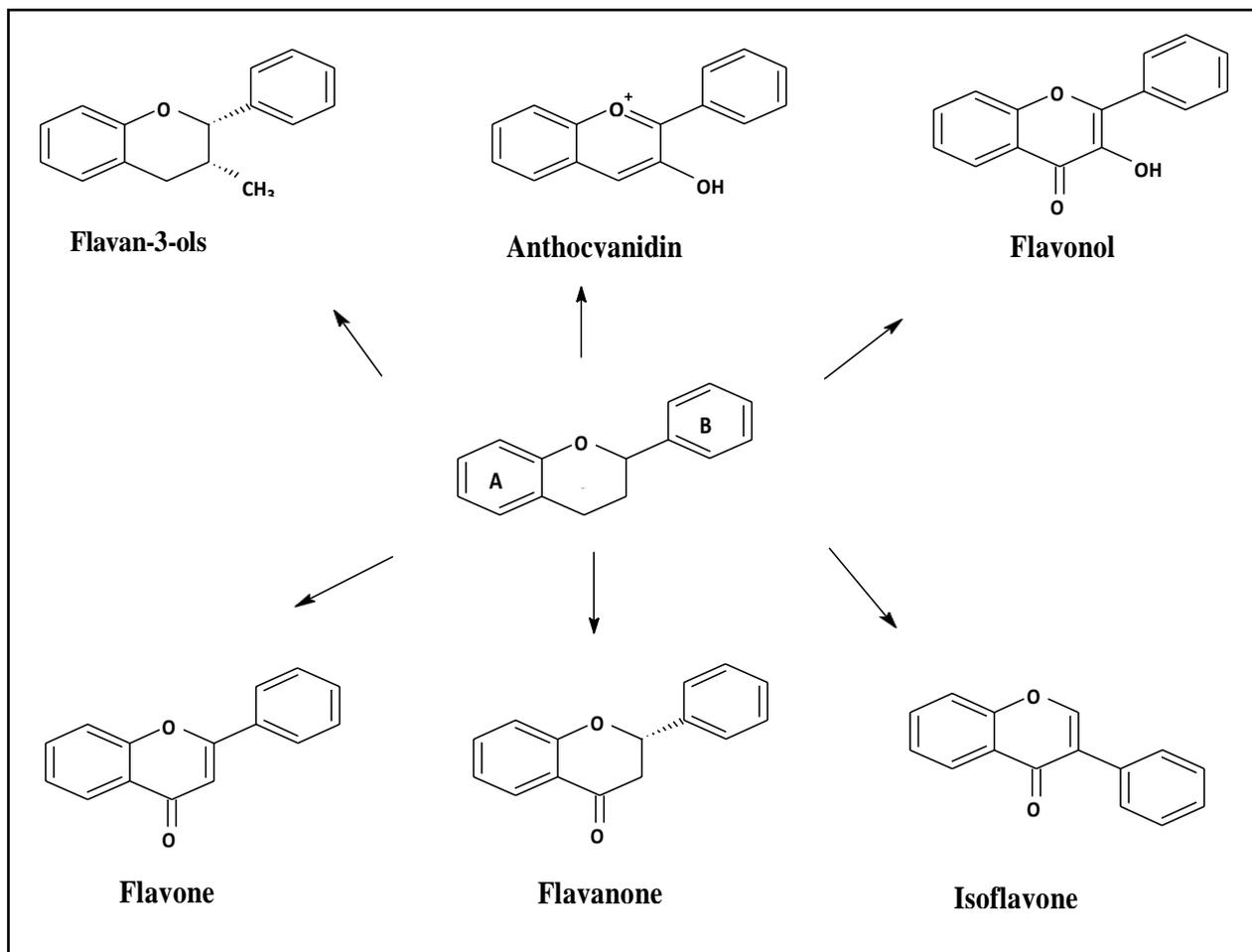


Figure 7: Structure de base des principales classes des flavonoïdes [85].

2.3.4. Coumarines

Les coumarines sont des substances organiques aromatiques que l'on trouve dans de nombreuses plantes. Elles portent un noyau benzopyrone dans leurs structures.

Ces composés qui possèdent des propriétés très diverses, ont la capacité de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes [94].

En plus, les coumarines possèdent des effets cytotoxiques et des activités antivirales, antimicrobiennes, antifongiques, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes, hypotensives. Elles sont aussi bénéfiques vis-à-vis des affections cutanées. Généralement, elles sont utilisées en parfumerie et dans les produits cosmétiques [95].

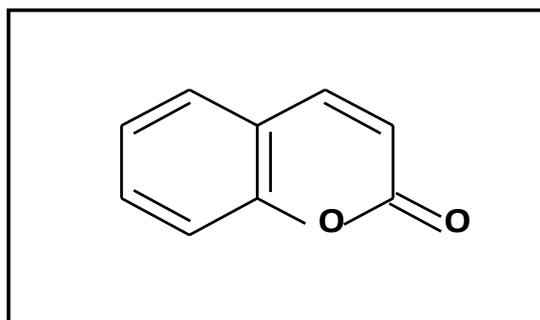


Figure 8: Structure de base des coumarines.

2.3.5. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels allant du rouge au bleu et sont responsables de la coloration des plantes. Ces pigments existent dans de nombreux végétaux sous forme des hétérosides oxygénés, solubles dans l'eau et les alcools, mais insolubles dans les solvants organiques apolaires. Elles sont caractérisées par leurs propriétés antioxydantes, vasoprotectrices et anti-oedémateuses [96].

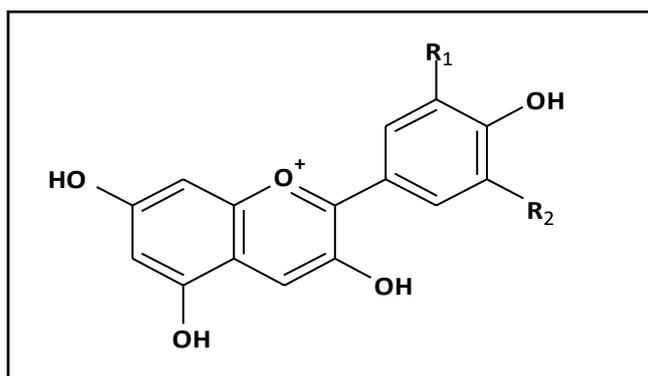


Figure 9: Structure de base des anthocyanes.

2.3.6. Les quinones

Ce sont des pigments jaunes à rouge violets que l'on rencontre dans les règnes animal et végétal. Leurs hétérosides sont solubles dans l'eau et les solutions hydro-alcooliques. Elles absorbent dans le domaine UV.

Ces substances sont souvent très réactives, elles peuvent colorer la peau par la suite de combinaisons avec les groupes amines (NH₂) libres des protéines, certaines, en particulier les hydroquinones, sont utilisées comme teintures pour fibres textiles (formation de laques) [97].

2.3.7. Les saponines

Les saponines aussi appelées saponosides sont des substances hétérosidiques d'origine végétale qui existent dans de nombreuses plantes. Ils sont solubles dans l'eau et l'alcool, et caractérisés par des propriétés tensioactives, hémolytiques et aphrogènes dans les solutions aqueuses en la rendant moussante [98].

Il s'agit de composés amers à poids moléculaire élevé et de nature glycosidique. Composés de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, ils libèrent par hydrolyse, un ou plusieurs oses et une génine appelée sapogénine.

Ces hétérosides possèdent des activités antimicrobiennes, antifongiques, anti-inflammatoires, antihémorroïdaires, antitumorales, antibactériennes, antitissuives, antioedémateuses antipyrétiques, antalgiques, immunomodulatrices et anticoagulantes. Ils sont également utilisés dans l'industrie, en pharmacie et en cosmétologie [99].

Selon la nature de la génine, les saponosides se classent en deux groupes : les saponosides à génine stéroïdique et les saponosides à génine triterpénique.

Chapitre 3

Activité anti-inflammatoire

3. L'inflammation

3.1. Définition

L'inflammation est une réponse protectrice du corps, peut être déclenchée par un traumatisme physique, chimique ou des microorganismes envahisseurs ...C'est une réponse immunitaire importante qui conduit à l'élimination du pathogène et la cicatrisation du tissu lésé [100,101].

La réaction inflammatoire se fait par l'intervention des cellules immunitaires (phagocytes, lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, basophiles, etc.) et des molécules telles que les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Elle est caractérisée par quatre principaux signes macroscopiques qui s'observent au niveau des tissus affectés : une chaleur, une rougeur, un gonflement et une douleur [102].

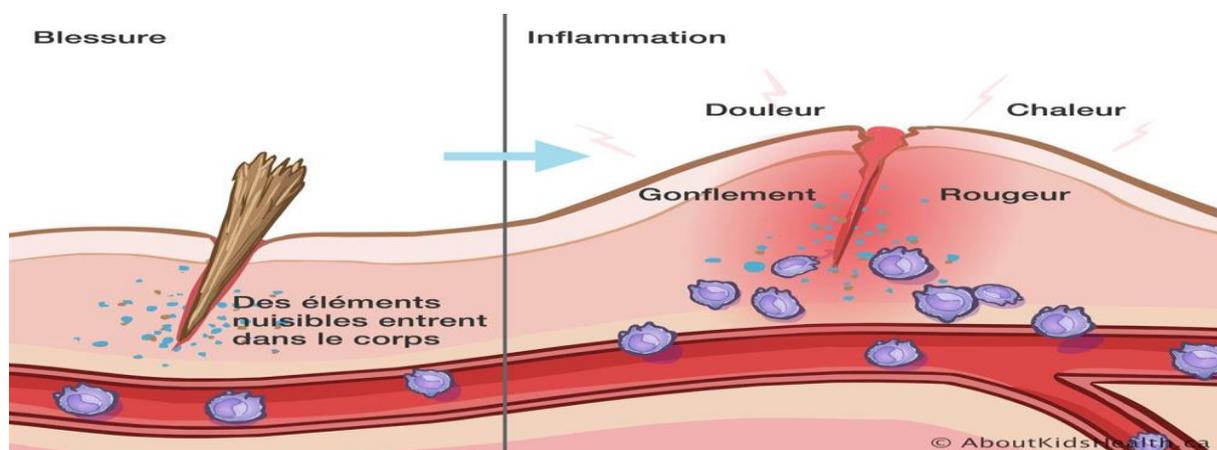


Figure 10: L'inflammation et le système immunitaire.

3.2. Les causes de l'inflammation

Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation: [103,104]

- Infection : contamination par des micro-organismes (bactérie, virus, parasites, Champignons)
- Agents physiques : traumatisme, chaleur, froid, radiations
- Agents chimiques : caustiques, toxines
- Corps étrangers : exogènes ou endogènes
- Défaut de vascularisation: réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie.
- Agression dys-immunitaire (anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto immunité ...)

3.3. Les types de l'inflammation

3.3.1. Inflammation aiguë

Une réaction inflammatoire immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), caractérisée par l'adhérence des plaquettes, de neutrophiles puis les monocytes à l'endothélium [105]. Elle est la réponse typique du système immunitaire inné [106], résidente à la guérison complète de la lésion initiale [107].

L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases [108] :

3.3.1.1. La phase vasculaire

Il s'agit d'une vasoconstriction artériolaire, très brève de quelques secondes à inscrire dans le cadre des phénomènes réflexes de l'organisme. Elle est due à l'action du système sympathique, et est très rapidement ressentie puisque douloureuse, expliquée par la libération d'histamine, de sérotonine et de kinine. Cette constriction n'est pas innocente sur les plaquettes présentes dans la circulation, laquelle est perturbée. Ces plaquettes vont alors s'activer. Très vite à cette vasoconstriction, va faire suite une vasodilatation des vaisseaux sanguins. Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui explique l'extravasation des cellules sanguines. Il s'agit entre autre de la diapédèse, c'est à dire migration de ces dernières vers les tissus.

Ce qui précède explique en partie la constitution de la chaleur et de la rougeur. La migration des cellules s'accompagnant d'un transfert de plasma crée en fait la tumeur ou l'œdème. Rappelons à ce sujet, que l'excitabilité des terminaisons nerveuses en est la conséquence et va conforter le processus douloureux.

3.3.1.2. La phase cellulaire

Une notion d'importance doit toujours être présente à l'esprit : c'est l'installation rapide de ces événements et l'inéluctabilité du processus. Dans ce cas, l'afflux des cellules, fait que celles-ci vont d'abord se marginaliser sur le site de l'agression en environ une trentaine de minutes. C'est à ce moment que l'observateur pourra constater "in situ" la présence de polynucléaires neutrophiles, lesquels sont plaqués le long des cellules endothéliales de l'endroit concerné. Mais, on le sait, ces cellules ne se fixent pas et vont traverser la paroi, grâce à de nombreux facteurs attractants comme l'IL8 par exemple. Ces cellules ont un rôle important à jouer et l'on retrouve les connaissances habituelles et physiologiques à savoir les mécanismes de phagocytose. Ces cellules vont en effet ingérer les éléments lésés. Cette fonction n'est pas simple. Elle repose sur la dégranulation des composants internes de la cellule, jusqu'ici au repos. Ceci conduit à la sécrétion des protéases, de radicaux libres,

d'élastase et de collagénase. Les possibilités des polynucléaires neutrophiles sont de deux ordres. Sur un plan simple, ces cellules vont contribuer à l'éradication des corps étrangers (s'il y a lieu) ou des tissus lésés (en cas de traumatisme par exemple). Dans ce type de situation, la réaction va s'arrêter mais ceci n'est pas toujours le cas et les macrophages (ou "monocytes activés") dont le pouvoir phagocytaire est important, vont intervenir. Ceci constitue le passage de la réaction inflammatoire proprement dite à la réaction immunitaire et la mise en chantier des processus inhérents.

3.3.1.3. La phase de résolution ou de réparation

Cette dernière sera plus ou moins importante et son intensité liée au degré de destruction cellulaire. A ce moment, les macrophages non seulement vont compléter l'action des polynucléaires neutrophiles, mais également jouer leurs rôles de "présentateur" de l'antigène et de réparateurs. Il s'agit de régénérescence due à des molécules comme les cytokines et les médiateurs dont le rôle est parfaitement "pré- destiné". Au début, ce sont les cellules endothéliales qui vont elles mêmes réparer l'endothélium. Ceci est dû à diverses molécules, lesquelles agissent sur le stroma cellulaire. Il est alors question de collagénase I ou III. Si la destruction est plus importante, non seulement les macrophages vont participer à l'angiogénèse, bientôt remplacés par les fibroblastes, ces derniers produisant la fibronectine, la laminine et du collagène. Ce collagène est l'élément clef de la reconstruction. Dans la réaction aiguë, les vaisseaux, alors reconstruits, feront que cette dernière va s'arrêter.

3.3.2. Inflammation chronique

C'est une inflammation aiguë persistante, conduit à la formation de lésions focalisées [109], formées par les cellules endothéliales, les fibroblastes et les macrophages [105] où la production accrue des médiateurs qui maintient le processus inflammatoire [107].

3.4. Les médiateurs de l'inflammation

Ils peuvent être décrits sous la forme d'une part de systèmes d'activation plasmatique et d'autre part de médiateurs cellulaires. Ils exercent leur action en se fixant aux récepteurs membranaires de cellules cibles. Ils provoquent des réactions en cascade par libération d'autres médiateurs qui peuvent agir eux-mêmes de façon synergique ou antagoniste [110]. On peut distinguer : les amines vaso-actives, les médiateurs lipidiques (métabolites de l'acide arachidonique et le facteur d'activation plaquettaire), les cytokines (IL-1, IL-6 et TNF α) [111].

3.5. Les anti-inflammatoires

Se sont des molécules qui limitent l'amplitude et la durée des réactions inflammatoires, ils atténuent les signes de l'inflammation. On distingue :

3.5.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et antalgiques. Selon les travaux de (Vane, 1987) [112], leur mécanisme d'action repose sur l'inhibition compétitive de la cyclo-oxygénase, qui est une enzyme qui permet la production de prostaglandines (importants médiateurs de l'inflammation) à partir de l'acide arachidonique. Cette caractéristique conduit à une diminution de la production des prostaglandines [113].

3.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS)

Les AIS constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien qui est l'hormone naturellement fabriquée par les glandes endocrines situées au-dessus du rein [114]. Ils agissent sur de nombreux métabolismes : augmentent la production de la lipocortine, inhibant ainsi la phospholipase, donc la libération de l'acide arachidonique, et diminuent fortement la production d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, les cytokines, les ions superoxydes [115].

3.5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Certains des composés photochimiques des plantes ont des propriétés anti-inflammatoires. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclo-oxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes [116].

L'activité anti-inflammatoire peut être traduite par Inhibition de la dénaturation de l'albumine, de l'action anti-protéinase, de la stabilisation membranaire et de l'activité anti-lipoxygénase [117].

3.6. Action sur L'albumine

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste en l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines [118]. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plantes sur l'activité anti-inflammatoire in vitro par la méthode de l'inhibition de la dénaturation protéique, exemple l'albumine.

L'albumine est la protéine la plus abondante dans le sang. Elle est fabriquée par les hépatocytes et considérée comme la principale protéine de transport dans le sang. Un taux abaissé de cette molécule est marqueur d'inflammation en raison de sa dénaturation.

L'activité inhibitrice de la dénaturation de l'albumine peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les tannins dans les extraits des

plantes [119].

3.7. Les signes cliniques et biologiques de l'inflammation [108]

3.7.1. Les signes cliniques

Les signes cliniques ont été antérieurement décrits et il n'y sera seulement que brièvement revenu. Evoquons d'abord la triade rougeur-œdème-douleur.

Très rapidement après l'agression, la réaction vasculaire s'installe et le réflexe vasoconstrictif engendre la rougeur, d'autant plus que la vasodilatation consécutive explique l'œdème, tout autant que la chaleur. Lors de cette étape, les médiateurs vasoactifs (bradykinines, cytokines, sérotonine) jouent le rôle primordial. Quant à la douleur elle a été amplement expliquée par la stimulation incontournable des voies nociceptives. A ce sujet, il doit être écrit que la douleur en soi, sans aucune réaction inflammatoire préalable, peut entrer dans la définition de celle ci par l'intermédiaire des neuropeptides stimulant les cellules présentes habituellement dans la réaction et la libération des médiateurs chimiotactiques ou vaso-actifs.

Outre les quatre signes cardinaux, il a été plusieurs fois signalé l'existence d'autres signes. Il sera cité la fièvre, expliquée par les médiateurs comme l'IL1, l'IL6, le TNF Alpha. Ces derniers sont actifs sur le centre de la thermo-régulation de l'hypothalamus.

3.7.2. Les signes biologiques :

3.7.2.1. L'Hémogramme :

Cet examen est toujours demandé avec raison, car au minimum il éclaire le praticien sur la fonction hématopoïétique au sens large. Il permet sur un plan plus spécifique de retrouver le concept d'anémie inflammatoire chronique. Dans ce cadre, l'hyposidérémie (l'hémogramme étant associé au métabolisme du fer) est habituel, mais l'anémie n'atteint jamais des valeurs dramatiques encore que l'activité journalière de la personne atteinte n'en soit guère favorisée.

3.7.2.2. La vitesse de sédimentation :

La mesure du temps mis par les globules rouges à descendre dans un tube - la VS - est très facilement réalisable, d'où sa prescription habituelle. Dans l'inflammation encore que ceci eut été passé sous silence jusqu'ici- les protéines de l'inflammation peuvent induire des troubles de la sédimentation érythrocytaire. De fait, elles peuvent être seules responsables d'où l'intérêt de la VS, car elles modifient profondément la viscosité de l'ensemble (viscosité expliquant à elle seule, la vitesse de chute des cellules). Mais le test, est considéré -avec

raison- d'intérêt global, ce qui amoindrit sa valeur intrinsèque dans l'étude de l'inflammation.

3.7.2.3. L'électrophorèse des protéines :

Toutefois, en parfait rapport avec ce qui précède, l'activité des cytokines qui sont des protéines - engendre des modifications dans la quantité de ces protéines. C'est ainsi que l'IL6 agit très fortement sur la fonction hépatique et la réaction inflammatoire en amont n'est nullement innocente dans la synthèse protéique. Habituellement, ceci conduit à recourir, et surtout à sa signification, à l'électrophorèse.

Dans le principe et il sera rappelé que cette dernière permet de différencier cinq parties, dues au déplacement des protéines de l'anode vers la cathode.

3.7.2.4. La mesure de la C.R.P (Protein C. Reaction) :

Cette protéine est synthétisée globalement par le foie (elle comporte une part de glucides), et ce, en réponse à toute stimulation antigénique. Elle est donc nécessaire à l'homéostasie immunitaire dans laquelle s'inscrit, ce qui doit être rappelé, la réaction inflammatoire.

Cependant, ce qui restreint l'intérêt de la CRP, son taux n'est généralement pas significatif, permettant d'établir à partir de lui même un diagnostic et l'origine d'un syndrome. Classiquement, si les signes cliniques sont d'apparition récente (inférieur à 24h) la CRP élevée, il y a syndrome inflammatoire encore après 48 heures et le dosage n'est que de faible intérêt. Il peut être toutefois rappelé sinon établi que le dosage de la CRP en valeur intrinsèque et en continu dans le temps, montre un grand intérêt dans le succès (ou l'inverse) du traitement dans les grands syndromes inflammatoires classiques (action bénéfique par exemple des antibiotiques sans pour autant qu'ils conduisent toujours à la complète éradication du foyer de germes).

3.8. Activité Anti oxydante :

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par l'oxygène ou les radicaux libres dans l'organisme. Ces antioxydants sont définis aussi comme des agents redox qui réagissent avec les oxydants afin de stopper ou ralentir le processus d'oxydation, et ainsi ajust l'équilibre redox cellulaire [120].

3.8.1. Activité anti oxydante des poly-phénols :

Les composés phénoliques sont utilisés pour la prévention de diverses maladies qui sont principalement associées aux radicaux libres [120]. Ils ont une activité anti-oxydante [121]. L'action anti oxydante de ces composés ne s'exerce pas seulement par l'inhibition des radicaux libres, mais elle se manifeste aussi par la neutralisation d'enzymes oxydantes et par

la chélation d'ions métalliques responsables de la production des espèces réactives de l'oxygène [122], et le captage de l'oxygène singlet [123].

Chapitre 4

Formulation semi-solide

4. La Formulation

La formulation est «la Connaissance de la science des matériaux et de la chimie physique, jointe à l'art d'arriver à la meilleure combinaison de constituants. Alors que la chimie traite de la réaction chimique entre substances, la formulation traite de la coexistence de substances sans réactions chimiques » [124].

Elle est aussi « L'ensemble des connaissances et des opérations mises en œuvre lors du mélange, de l'association ou de la mise en forme d'ingrédients d'origine naturelle ou synthétique, souvent incompatibles entre eux, de façon à obtenir un produit commercial caractérisé par sa fonction d'usage et en aptitude à satisfaire un cahier de charges préétabli » [125].

4.1. Les émulsions

4.1.1. Définitions

Une émulsion est un cas particulier de colloïde, c'est un mélange macroscopiquement homogène mais microscopiquement hétérogène, renfermant deux liquides non miscibles. Une phase discontinue dispersée dans l'autre phase continue, sous forme de petites gouttelettes dont les diamètres sont en général supérieurs à $0.1 \mu\text{m}$ [126]. Ces deux phases n'ont pas la même solubilité. L'une est hydrophobe ou lipophile, on parle couramment de phase huileuse (H) et l'autre est hydrophile, on parle de phase aqueuse (E) [127].

Cependant, les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables qui se séparent plus ou moins rapidement en deux phases [128]. En raison de cette instabilité, il est nécessaire d'utiliser un troisième ingrédient appelé un tensioactif ou émulsifiant qui est en équilibre avec les phases dispersées et continues, et qui s'adsorbe spontanément aux interfaces, ce qui mène à la formation d'un film interfacial autour de la gouttelette de l'émulsion [129] comme le montre la **Figure 11**.

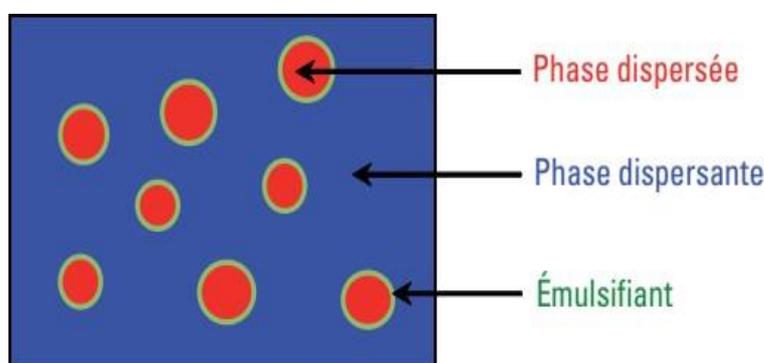


Figure 11: Représentation d'une émulsion. [129]

4.1.2. Classification des émulsions

4.1.2.1. Selon le type de l'émulsion

Les émulsions sont qualifiées de « directes » ou « inverses », selon la nature aqueuse ou huileuse de la phase continue. Si la phase externe est la phase huileuse, l'émulsion est dite « directe » de type eau dans huile (E/H), tandis que si la phase huileuse est la phase continue (ou phase externe) l'émulsion est « inverse » de type huile dans eau (H/E) [130,131].

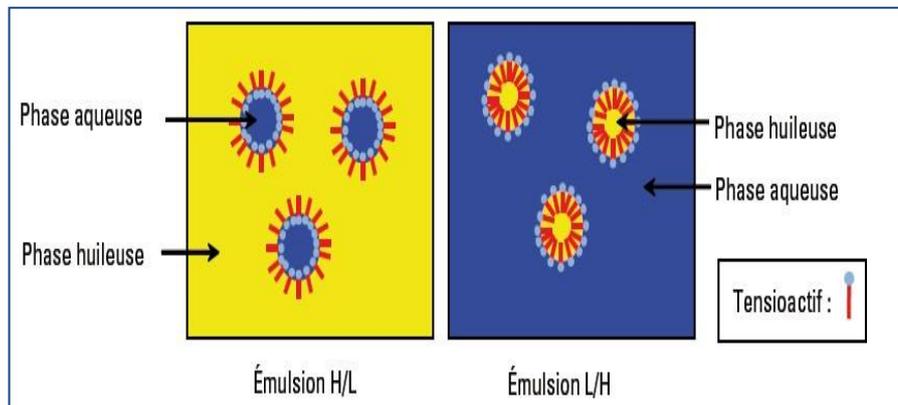


Figure 12: Différents types d'émulsions [135].

4.1.2.2. Selon la fraction volumique

Les émulsions sont aussi classées selon la fraction volumique de phase dispersée (Φ). En particulier, les émulsions sont considérées comme diluées si la fraction volumique (Φ) est inférieure à 5% [135], et comme concentrées lorsque elle est supérieure ou égale à 74%, cette valeur correspond à la fraction volumique de l'empilement compacte de sphères indéformables de même taille. Ces émulsions peuvent atteindre des valeurs de 99%, c'est pourquoi elles sont dénommées émulsions très concentrées. En plus, les gouttelettes dans la phase continue ne sont pas homogènes [132,133].

4.1.2.3. Selon la taille des gouttelettes de la phase discontinue [132]

a) Les macro-émulsions :

Ce sont des émulsions grossières dont le diamètre des gouttes est de 1 à 10 μm .

b) Les nano/mini-émulsions :

Présentent des micros domaines qui ne sont pas nécessairement sphériques, de petite dimension, typiquement de l'ordre de 0,1 à 1 μm .

c) Les micro-émulsions:

Elles sont décrites comme des systèmes bi-phasiques composés de gouttelettes très fines (10-200 nm) d'un liquide dispersés dans un autre liquide [135].

4.1.3. Phénomène de la formation, déstabilisation et stabilisation des émulsions

4.1.3.1. Formation d'une émulsion (Emulsification)

Une bonne maîtrise de la formulation permet d'assurer ou garantir la préparation d'émulsions stables, le procédé d'émulsification (type et géométrie d'agitation, vitesse et temps d'émulsification...), ainsi que les conditions qui montrent le type de l'émulsion formé. Ils jouent un rôle très important dans l'élaboration et les caractéristiques finales de ces systèmes (finesse, stabilité). L'apport d'énergie au système est indispensable pour créer de la surface entre les deux phases.

Généralement, quel que soit le type de l'émulsion (H/E ou E/H), l'émulsification se décompose en deux étapes successives :

Une étape de dispersion-mélange que l'on appelle « pré-émulsification » des deux phases dans lesquelles on a dissout au préalable tous les constituants, parmi eux les émulsionnants [137], et qui va conduire à une simple mise en suspension de gouttelette de la phase dispersé dans la phase contenue.

L'introduction des émulsionnant peut se faire de quatre façons différentes :

- On peut introduire les émulsionnants dans la phase aqueuse.
- On peut inversement les introduire dans la phase huileuse.
- On peut, aussi, introduire chaque émulsionnant dans son solvant préférentiel (l'émulsionnant hydrophile dans l'eau, et l'émulsionnant lipophile dans l'huile).
- On peut, enfin, préparer l'émulsionnant « in situ », en introduisant, par exemple un acide gras dans l'huile, et une base dans l'eau [137].

Une étape d'homogénéisation : Comme les deux liquides mis en présence ne sont pas miscibles, pour mélanger les phases, avec une température spécifique nous devons ajouter de l'énergie. Dont le but est de créer une très grande interface entre les deux phases et de réduire la taille des gouttes de façon à conférer à l'émulsion les propriétés requises et à la stabiliser.

Ces deux opérations s'effectuent dans des cuves agitées ou dans des conduites munies d'outils appelés respectivement disperseurs et homogénéisateurs. Ainsi il y a plusieurs moyens mécaniques de dispersion sont utilisables : mélangeur à hélice, mélangeur statique, broyeur colloïdal, ultrasons ou homogénéisateur à haute pression. Le type de système de dispersion est à choisir en fonction de la finesse désirée pour l'émulsion [136].

4.1.3.2. Les mécanismes de déstabilisation des émulsions

Les émulsions peuvent être se déstabiliser, donc on distinct trois formes d'instabilité :

4.1.3.2.1. Déstabilisation chimique

Comme toutes les formes pharmaceutiques, l'émulsion peut être le siège de réactions entre le principe actif et les autres composants de la phase grasse ou la phase aqueuse ou encore entre le conditionnement primaire et les composants de l'émulsion, une étude détaillée des possibilités d'interférences entre les différents composés est nécessaire pour éviter les incompatibilités éventuelles.

4.1.3.2.2. Déstabilisation biologique

L'émulsion peut constituer un milieu nutritif idéal pour les microorganismes, la contamination bactérienne et fongique est susceptible d'engendrer la rupture du système.

4.1.3.2.3. Déstabilisation physique

Au cours du temps, une émulsion évolue fatalement vers la séparation des phases. Les mécanismes de déstabilisation d'une émulsion peuvent être répartis en deux catégories:

- La première regroupe les phénomènes de migration des gouttes et met en jeu des phénomènes réversibles: floculation, sédimentation et crémage.
- La seconde concerne la variation de taille des gouttes, consistant en des processus irréversibles : coalescence, mûrissement d'Ostwald ou inversion de phase [138].

Ce sont les causes d'instabilité les plus fréquentes, ces phénomènes peuvent survenir au moment de la formulation ou en cours de conservation, leur maîtrise est une condition essentielle dans la mise au point des émulsions [139].

✓ **Migration des particules : floculation, crémage, sédimentation :**

➤ **Crémage et sédimentation :**

Le crémage est un mécanisme de déstabilisation selon lequel les gouttelettes d'huile remontent en surface dû à leur différence de densité avec la phase continue [140]. La sédimentation est le phénomène inverse, observable par exemple dans l'émulsion eau dans huile. L'eau ayant une densité plus importante, les gouttelettes vont migrer vers le bas de la solution. Ce phénomène, comme peut être minimisé en réduisant la différence de densité entre les deux phases ou en augmentant la viscosité du milieu car ceci diminue le mouvement des gouttelettes à travers la phase continue. Ces phénomènes sont réversibles, une simple agitation permet de distribuer les gouttelettes dans la phase continue [141].

➤ **Floculation :**

La floculation est un mécanisme qui a pour origine une adhésivité des gouttes, résultat d'une compétition entre l'agitation thermique et les forces de van der Waals. Ce phénomène

consiste en un rapprochement des gouttes qui, initialement éloignées les unes des autres, viennent s'agréger.

La floculation est fortement influencée par la fraction de la phase dispersée, la viscosité de la phase continue et l'interaction entre les gouttelettes. Elle est aussi influencée par la taille des gouttelettes, la distribution de leur taille et l'épaisseur de la couche d'émulsifiant adsorbée. Ce phénomène peut être réversible lorsque l'attraction est peu énergétique ou irréversible lorsqu'elle est très énergétique [142].

✓ **Variation de la taille des particules (changement du nombre de particules) :**

➤ **Mûrissement d'Ostwald :**

Le mûrissement d'Ostwald est une évolution lente et irréversible des émulsions qui a pour origine la différence de pression entre les petites et les grosses gouttes (pression de Laplace). La dite pression existant entre deux gouttes de tailles différentes provoque la migration des molécules constituant la plus petite goutte, à travers la phase continue, vers la goutte de plus grande taille. Deux stratégies principales permettent de limiter ce phénomène. La première consiste à diminuer la migration des molécules, soit en utilisant une phase dispersée parfaitement insoluble dans la phase continue, soit en créant, à la surface des gouttes, une barrière infranchissable pour les molécules. La seconde stratégie est de partir d'une émulsion parfaitement mono dispersée : la pression étant alors égale dans toutes les gouttes, le mûrissement d'Ostwald ne peut pas avoir lieu. Enfin, il est également possible d'ajouter, dans la phase dispersée, une espèce non soluble dans la phase continue, qui ne peut donc diffuser. En augmentant la pression capillaire dans les gouttes, cette espèce peut alors réduire le phénomène de mûrissement [143].

➤ **Coalescence :**

La coalescence est un mécanisme qui consiste en la fusion irréversible de deux ou plusieurs gouttes adjacentes de phase dispersée, pour former une goutte plus grosse. Elle peut mener à la destruction de l'émulsion, et donc à la séparation de deux phases non miscibles. A l'échelle de deux gouttes, ce phénomène se décompose en trois étapes : Le rapprochement des deux gouttes, le drainage puis la rupture du film interfacial.

La coalescence est généralement influencée par la fraction volumique de la phase dispersée, la viscosité et l'épaisseur de la couche d'émulsifiant adsorbée et la cristallisation de la matière grasse. Elle est aussi influencée par la viscosité de la phase continue et par les interactions électrostatiques et macromoléculaires entre les gouttelettes. Ce phénomène est irréversible [144].

➤ Inversion des phases :

L'inversion des phases est un phénomène qui se traduit par un brusque changement du sens de l'émulsion. L'émulsion E/H se transforme en une émulsion H/E ou inversement, et les propriétés du milieu diphasique s'en trouvent bouleversées [145].

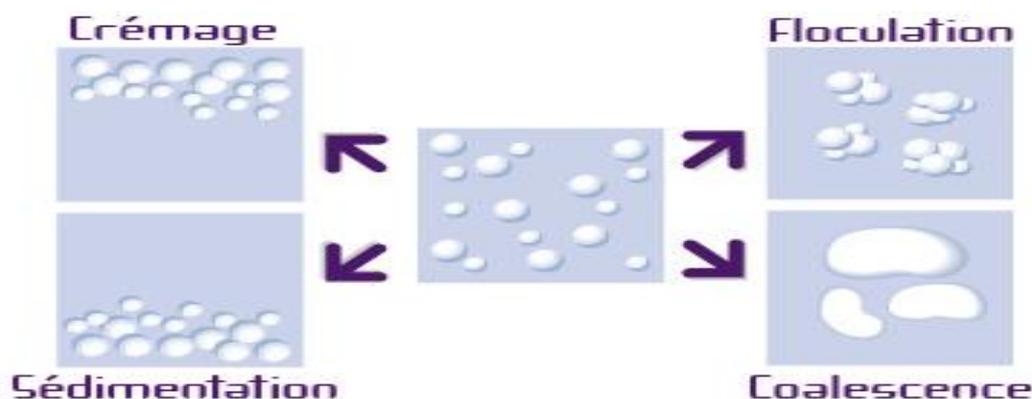


Figure 13: Les mécanismes de déstabilisation des émulsions.

4.1.3.3. Mécanismes de stabilisation des émulsions

Pour que l'émulsion soit persistante (c'est-à-dire que l'état dispersé demeure lorsque l'agitation mécanique cesse), il est nécessaire d'utiliser un agent émulsionnant ou émulsifiant. Bien qu'il puisse aussi faciliter le phénomène de dispersion en abaissant la tension interfaciale, le rôle de l'agent émulsifiant est surtout de stabiliser le système dispersé en inhibant les phénomènes de dégradation.

Parmi les agents émulsionnants, citons les tensioactifs, les polymères, les cristaux liquides et les solides divisés. Les émulsionnants les plus largement utilisés sont les tensioactifs. Il est judicieux alors d'utiliser un mélange de tensioactifs, dont la composition peut être ajustée de manière à optimiser la formulation [146].

4.1.3.3.1. Les tensio-actifs

4.1.3.3.1.1. Définition

Les tensio-actifs sont des composés amphiphiles comportant deux parties de polarité différentes bien distinctes, l'une est lipophile et apolaire, présente une affinité pour les huiles. L'autre hydrophile et polaire, présente une affinité pour l'eau. La tête hydrophile est généralement constituée d'un ion ou d'un groupement possédant un moment dipolaire et la queue hydrophobe d'une ou de plusieurs chaînes aliphatiques.

Les tensioactifs « surfactants » en terme anglo-saxon sont des agents de surface capables de réduire la tension interfaciale des mélanges en s'adsorbant aux interfaces [145,147].

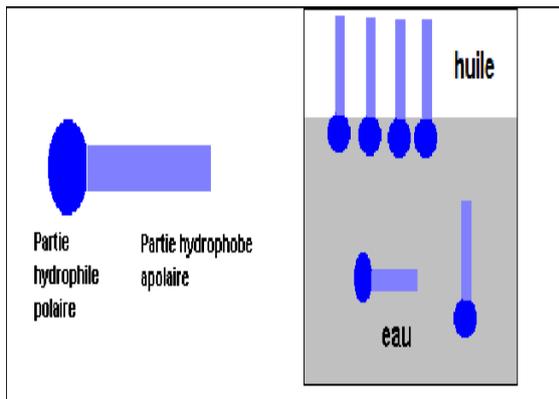


Figure 14: Schéma simplifié d'une molécule de tensioactif.

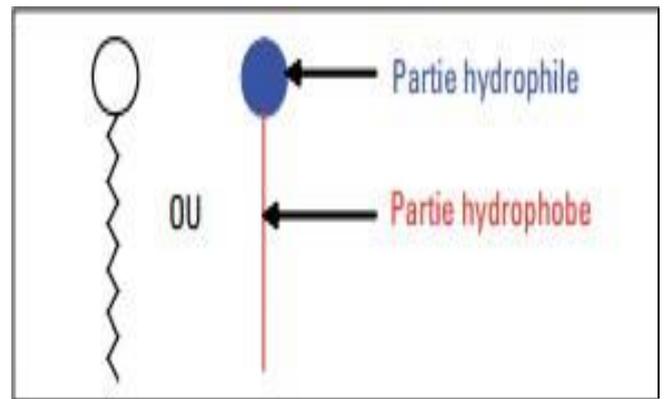


Figure 15: Représentation d'un tensioactif.

4.1.3.3.1.2. Mode d'action des tensio-actifs

En milieu air-eau, les molécules tensio-actives s'organisent à la surface de telle sorte que la tête hydrophile soit au contact de l'eau et que la chaîne hydrophobe soit orientée vers l'extérieur dans l'air pour former un film mono-moléculaire. Ce phénomène provoque une diminution de la tension superficielle du liquide proportionnellement à la concentration en tensioactifs selon la loi de Gibbs [148].

En émulsion, les parties hydrophile et hydrophobe du tensioactif (émulsifiant) ont de l'affinité respectivement pour la phase hydrophile et hydrophobe de l'émulsion. Généralement l'émulsifiant peut agir sur la stabilité d'une émulsion de trois façons :

- Soit en diminuant la tension interfaciale entre les deux liquides, donc augmentation de la surface de séparation c'est le cas des surfactifs dont les molécules viennent former un film à l'interface. Cette propriété est responsable des phénomènes de mouillage, de dispersion, de détergence et d'émulsification.
- Soit en augmentant la viscosité de la préparation, cas d'une gomme par exemple.
- Soit en agissant à la fois sur la tension interfaciale et sur la viscosité, c'est ce qui se produit lorsqu'on met un surfactif non-ionique en grosse excès ; une partie agit à l'interface, pour baisser la surface interfaciale et l'autre augmente la viscosité de la phase aqueuse dispersante [148].

4.1.3.3.1.3. Classification des tensioactifs

Il existe différentes classifications possibles des tensioactifs :

- Selon leur origine : (naturelle ou synthétique).
- Selon la longueur de la partie lipophile : agents mouillants (C_8-C_{10}), détergents ($C_{12}-C_{16}$), émulsionnants ou adoucissants ($C_{18}-C_{22}$).
- Selon la nature de leur tête polaire : (non ionique, anionique, cationique ou

amphotère) :

- **Les tensioactifs anioniques** :

Comportent un groupement ionique chargé négativement en solution aqueuse : carboxylate, sulfate, sulfonates ou phosphate. Ce sont les agents tensioactifs les plus utilisés industriellement [149].

- **Les tensioactifs cationiques** :

Comportent un groupement ionique chargé positivement en solution aqueuse, ce sont généralement des sels d'ammonium quaternaire [150].

- **Les tensioactifs non ioniques** :

Leur molécule ne comporte aucune charge nette (ne s'ionise pas dans l'eau). Ce sont donc d'excellents candidats pour les formulations complexes. Les surfactifs non ioniques sont émulsionnants, solubilisant et mouillants [151].

- **Les tensioactifs amphotères (zwitterioniques)** :

Comportent deux groupements ioniques, l'un cationique et l'autre anionique, qui se neutralisent au pH isoélectrique. Ils sont par conséquent parfois classifiés comme non ioniques [152].

Les diverses utilisations des tensioactifs peuvent découler de leur valeur HLB **tableau 2**.

Tableau 2: valeurs de HLB et surfactants et les fonctions associées.

Gamme HLB	Application
3 – 6	Emulsifiant eau dans huile E/H
7 – 9	Agent mouillant
8 – 18	Emulsifiant huile dans eau H/E
13 – 16	Détergent
15 – 18	Solubilisant, hydrotrope

Le concept HLB, permet de formuler, d'une manière particulièrement rationnelle, des émulsions stables. La méthode HLB est basée sur une classification des tensioactifs par hydrophilie croissante. Elle correspond au rapport entre la proportion des groupements hydrophiles, ayant une affinité pour l'eau, et la longueur de la chaîne lipophile, ayant une affinité pour l'huile.

Le HLB des émulsifiants peut être classé selon l'échelle de Davies. En dessous d'un HLB d'une valeur de 9, l'émulsifiant est de caractère lipophile tandis qu'entre 11 et 20, il a un caractère hydrophile [153].

4.2. Les gels

4.2.1. Définition

Le terme de gel échappe à toute définition précise. 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 [154].

Un gel macromoléculaire est une matrice polymère gonflée par une grande quantité de solvant. Les chaînes polymères sont connectées entre elles, formant un réseau qui sert à retenir le liquide et qui donne au gel sa rigidité [155].

4.2.1.1. Classification des gels

✓ Classification générale :

La classification des gels est basée selon :

- Leur origine telle que les gels naturels ou synthétiques.
- La matière contenue dans la matrice polymère tels que les hydrogels, les aérogels ou les organogels.
- Le type de liaison de la matrice polymère tels que les gels chimiques ou physiques.

La connexion entre les chaînes de polymères peut être de deux sortes, permanente (liaisons covalentes) ou réversible (liaisons hydrogènes, interactions de type Van der Waals, enchevêtrements ...) ce qui permet de différencier les deux grands types de gels: les gels physiques et les gels chimiques [156].

• Gels physiques:

La réticulation n'est pas nécessairement produite par une réaction chimique. Tout processus physique qui favorise une association entre certains points des différentes chaînes d'un polymère peut conduire à un gel [154-155].

Dans le cas des gels physiques les connexions, appelées nœuds de réticulation, ne sont pas permanentes. Ce caractère transitoire vient du fait que leur énergie est finie et du même ordre de grandeur que l'agitation thermique. Le nombre et la « force » des nœuds de réticulation dépendent donc directement des états thermodynamiques et mécaniques du gel, et induit par ailleurs une réversibilité de la gélification, les associations se cassent et se reforment continuellement. [157-158].

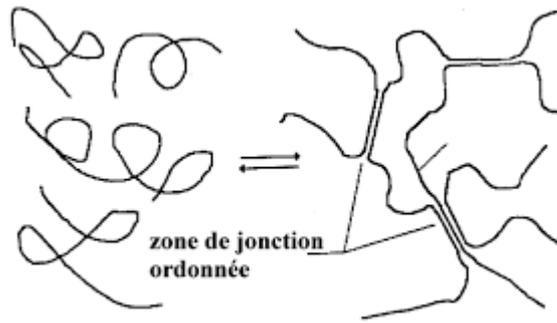


Figure 16: Schéma de formation et de structure d'un gel physique [159].

- **Gels chimiques :**

Les gels chimiques sont constitués de chaînes polymères liées entre elles par des liaisons covalentes. Les nœuds de réticulation du réseau ont un caractère permanent et ne dépendent pas de facteurs extérieurs (température, pH, concentration, déformation mécanique...).

Il existe deux méthodes principales de préparation des gels. L'une consiste en une polymérisation multifonctionnelle, cette méthode de synthèse des gels chimiques est basée sur la condensation des unités multifonctionnelles. L'autre en une polymérisation suivie d'une réticulation des chaînes polymères après leur formation, cette approche de la synthèse des gels chimiques est la polymérisation additive [154-155,157].

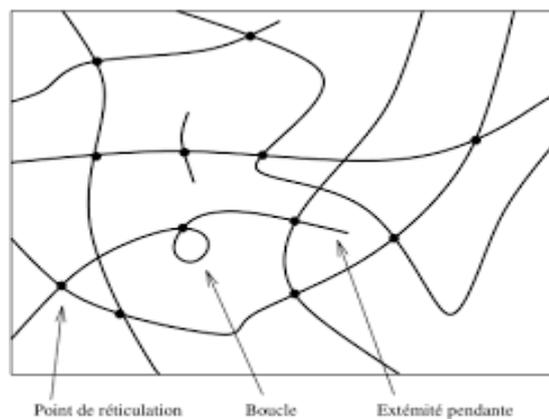


Figure 17: Schéma de la structure d'un gel chimique réticulé [160].

4.3. Eumlgels [160-163]

Les emulgels sont la combinaison d'un gel et d'une émulsion. Les émulsions de type huile dans l'eau et eau dans l'huile sont utilisées comme véhicule pour administrer divers médicaments à la peau. Elles ont également une grande capacité à pénétrer dans la peau. La présence d'un agent gélifiant dans la phase aqueuse transforme une émulsion classique en un émugel. L'émugel à usage dermatologique possède plusieurs propriétés favorables, comme le fait d'être thixotrope, non gras, facile à étaler, facile à enlever, émollit, non tachant,

soluble dans l'eau, avec une durée de conservation plus longue, transparent et d'apparence agréable.

4.3.1. Avantages et inconvénients des emulgels [164,165]

Tableau 3: Avantages et inconvénients des emulgels

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none">- Éviter l'incompatibilité gastro-intestinale.- Plus sélectif à un site spécifique.- Pratique et facile à appliquer.- Meilleure stabilité.	<ul style="list-style-type: none">- Possibilité de réactions allergéniques.- La faible perméabilité de certains médicaments à travers la peau.- Les médicaments dont les particules sont de grande taille ne sont pas faciles à absorber par la peau.

4.4. Les suppositoires

4.4.1. Définition

Les suppositoires sont des préparations uni-doses solides de forme conique ou ovoïde [166]. Ils sont adaptés à être introduits dans l'orifice rectal du corps humain [167], ou ils fondent et se liquéfient à la température du corps. Ils sont utilisés en vue d'une action locale ou systémique [168].

En effet, le suppositoire est constitués de deux parties; la partie active qui inclut un ou plusieurs PA; ces derniers sont dispersés ou dissous dans une partie qui s'appelle la partie inactive qui représente l'ensemble des excipients [169].

4.4.2. Les avantages et les inconvénients des suppositoires

Tableau 4: Les avantages et les inconvénients des suppositoires

Les avantages [170-171]	Les inconvénients [170]
<ul style="list-style-type: none">- L'absorption rapide de certains principes actifs, car le tube digestif est trèsvascularisé.- La facilité d'administration chez les malades alités et les enfants, les nourrissons en particulier.- Les suppositoires permettent d'éviter les vomissements.- Masquage des caractères organoleptique désagréables.- Permet l'administration des médicaments irritants pour le tube digestif ou altérés par les sucs digestifs.- Libération lente du principe actif et action durable.	<ul style="list-style-type: none">- C'est une forme qui est peu favorable.- Conservation en frais.- Transport et prise difficiles dans la journée- Irritation de la muqueuse en cas de traitement prolongé.- Absorption incomplète de PA : il subsiste la possibilité d'un effet de premier passage.

4.4.3. Choix de l'excipient

Les excipients sont des substances auxiliaires sans effet thérapeutique, permettant la mise en forme et l'administration des suppositoires, cela dépend un choix particulier et très important pour une bonne fabrication du suppositoire et assurer l'activité de PA.

L'excipient doit présenter des propriétés et des caractéristiques dont nous pouvons citer :

- Innocuité et bonne tolérance par la muqueuse rectale.
- Consistance convenable : il ne doit pas être ni trop mou, ni trop cassant pour la fabrication, la zone de solidification doit être aussi réduite que possible pour assurer une prise en masse rapide et il doit se rétracter au refroidissement pour faciliter le démoulage.
- Point de fusion proche de la température rectale Libération rapide et totale du PA dans le rectum, soit par fusion au-dessous de 37°C, soit par dissolution ou dispersion dans le milieu liquide de l'ampoule rectale [172].
- Libération lente de PA pour une action locale [173].

- Libération rapide de PA pour une action systémique.
- Pour ne pas s'écouler rapidement, la viscosité doit être suffisante et bien étudiée afin d'adhérer à la muqueuse rectale [174].
- Son point de fusion, vitesse de cristallisation et son pouvoir émulsionnant doivent être bien étudiés [169].

Les bases des suppositoires sont classées comme des excipients lipophile et excipients hydrophiles.

✓ Excipients lipophiles (triglycérides) :

Les excipients lipophiles ou appelés corps gras, sont les plus utilisés. Ce sont des bases naturelles ou des bases d'origine semi-synthétique [175].

Parmi les excipients lipophiles utilisés pour la formulation des suppositoires on cite : le beurre de cacao, les huiles hydrogénée, les glycérides semi synthétique solide comme le suppicire et les huiles hydrogénées et polyoxyéthylénées.

✓ Les excipients hydrophiles :

Les excipients hydrophiles sont des excipients hydratés ou à phase aqueuse ou présentant un caractère hydrophile marqué ou prépondérant comme le mélange gélatine-glycérine, polyoxyéthylène glycol [176].

4.4.4. Le facteur de déplacement

Le facteur de déplacement permet de calculer la quantité d'excipient exacte à ajouter pour une dose de principe actif, pour le remplissage des alvéoles du moule utilisé.

Nous avons deux cas de calculer le facteur de déplacement, on distingue :

4.4.4.1. 1^{er} cas : Facteur de déplacement connu

Le calcul est effectué en utilisant la notion de facteur de déplacement qui exprime le nombre d'excipient déplacé par un gramme de principe actif.

$$M = F - (f - P) \quad (1)$$

M: C'est la quantité totale d'excipient à utiliser en grammes.

F : contenance du moule pour le nombre de suppositoires à fabriquer.

f : Le facteur de déplacement du principe actif.

P : quantité de médicament pour le nombre de suppositoires à fabriquer.

S'il y a plusieurs principes actifs la formule devient [172] [176] :

$$M = F - (f_1P_1 + f_2P_2 + \dots + f_nP_n) \quad (2)$$

4.4.4.2. 2^{ème} cas : Facteur de déplacement est inconnu

Cependant, si le facteur de déplacement du principe actif est inconnu, la quantité de l'excipient à mettre en jeu peut être identifiée comme suivant :

Une quantité connue de principe actif $P(g)$ à répartir dans six suppositoires, en commençant par le mélange d'une masse $P(g)$ de principe actif et une quantité nettement insuffisante d'excipient. Cette masse est répartie par couler au fond de douze alvéoles du moule et le remplissage est complété avec un léger excédent d'excipients pur fondu. Après refroidissement l'excès d'excipients est enlevé par raclage, Soit Y grammes. Le poids en gramme d'excipient à utiliser est égal à $Y - P$.

Pour calculer le facteur de déplacement, il suffit de peser les six suppositoires d'excipient seuls (X) et calculer F par la relation [176] :

$$f = X - \frac{Y-P}{P} \quad (3)$$

X : La masse totale de n suppositoires placébos ;

Y : La masse de n suppositoires contenant une quantité totale P de PA, nécessaire pour la préparation de n suppositoires.

P : La masse de PA contenue dans n suppositoires.

Chapitre 5

Matériels & Méthodes

5. Matériel et Méthodes

Notre travail expérimental se divise en quatre étapes principales. La première consiste à l'optimisation des tailles des poudres et la détermination de diamètre optimal, la deuxième montre l'extraction et l'identification de la substance active issue des feuilles des deux plantes *Inula Viscosa L.* et *Inula Monatana L.*. Ensuite, la troisième étape présente la vérification de l'activité thérapeutique des extraits obtenus. La dernière étape parle sur la formulation d'une forme galénique semi solide : émulgel et suppositoires à base de l'extrait de feuilles *Inula Vicoso L.* et étudier le comportement rhéologique, les propriétés physico-chimique et organoleptique de l'émulgel.

5.1. Matériels

5.1.1. Matériel végétale

La présente étude a porté sur les feuilles d'*Inula viscosa L.* et *Inula montana L.*. La première plante a été récoltée au mois de janvier 2022 dans la région de Blida (Soumaa). Par contre, la deuxième plante a été récoltée à la fin de mois février 2022 dans la région de Médéa.

L'identification de ces plantes ont été fait par monsieur BOUTOUMI, professeur à l'université de Blida 1, et aussi par monsieur METTAI, botaniste et enseignant à l'université de Blida 1.

Les feuilles ont été séchées séparément à l'ombre et à une température ambiante (15-20°C) pendant 10 jours afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Par la suite, elles sont broyées à l'aide d'un broyeur mécanique. La poudre de ces feuilles est de couleur verte. Ces dernières ont été conservées dans des flacons propres en verre hermétiquement fermés à l'abri de l'humidité.

5.1.2. Matériel animal

Les tests anti-inflammatoires ont été réalisés sur des souris males et femelles Albino Swiss dont le poids varie entre 19 et 21 g fourni par l'animalerie du l'institut pasteur.

5.1.3. Les produits chimiques

- Les solvants utilisés sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5: Les solvants chimiques utilisés

Le solvant	La marque
Acétone	Biochem Chemopharma
Ethanol	Biochem Chemopharma
Méthanol	Biochem Chemopharma
Ether de pétrole (40-60 °C)	Fisher Chemical

- Les matières premières :

Tableau 6: Les procédés utilisés et leurs produits chimiques

Les procédés	Les produits chimiques
Screening Phytochimique	<ul style="list-style-type: none"> - Acide Sulfurique - Acide Chlorhydrique . - Anhydride acétique - Chloroforme - Chlorure de Fer - Chlorure d'aluminium - Chlorure de Mercure -Carbonate de Sodium -Ammoniaque - Hydroxyde de Sodium - Iode - Iodure de Potassium - Folin-Ciacalto - Acide gallique - Quercétine - Vanilline - Catéchine
Test in vitro	Albumine de l'œuf Solution saline de tampon phosphate Diclofénac
Formulation	Carbopol Huile de Paraffine Span 20 Tween 20

	Trithanolamine (TEA) Suppocire
Test in vivo	Carragénine Diclofénac

- **Les instruments utilisés :**

On a utilisé différents appareillages de laboratoire :

Tableau 7: Les instruments utilisés

Les instruments	Noms
Spectrophotomètre UV / Visible	SHIMADZU UV 1800
Cryostat	HUBER
Le bain ultrason	X-tra 30 H
Infra Rouge	FTIR-8900
Evaporateur rotatif	HEIDOLPH
Tamiseur	RETSCH
Homogénéisateur	IKA 25
Agitateur magnétique	IKA 25
Centrifugeuse	Eppendorf
Rhéomètre	Anton Paar MCR 102
Microscope	Optika Microscope ItaySeries

5.2. Méthodes

5.2.1. Traitement des échantillons

➤ **Nettoyage :**

Les feuilles des plantes étudiées ont été nettoyées manuellement de toute sorte de débris et des éléments étrangers.

➤ **Séchage :**

Après le nettoyage, Les feuilles ont été séchées séparément à l'ombre et à une température ambiante (15-20°C) pendant 10 jours afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules.

Le séchage a une importance majeure pour l'extraction des composés phénoliques, car les cellules végétatives contiennent des enzymes susceptibles de provoquer des modifications dans la composition phénolique de la plante. Cet inconvénient peut être éliminé par un séchage rapide du matériel végétal, aussitôt après sa récolte.



Figure 18: Feuilles sèches d'*Inula viscosa* L.

➤ **Broyage :**

Les échantillons séchés ont été broyés à l'aide d'un broyeur mécanique, pour avoir des poudres fines.

➤ **Tamisage :**

Le tamisage des poudres a été réalisé à l'aide d'un tamiseur automatique muni des tamis du diamètre 500, 400, 250 μm respectivement, Les poudres obtenues ont été conservé dans des flacons en verre, bien hermétique, à l'abri de la lumière jusqu'au jour de la préparation des extraits.

5.2.2. Méthode d'extraction

5.2.2.1. Extraction par soxhlet

L'extraction par Soxhlet est une technique standard souvent utilisée comme référence pour apprécier l'efficacité des autres techniques d'extraction solide/liquide. Elle est plus performante que les autres techniques d'extraction conventionnelle exceptée pour les composés sensibles à la chaleur (thermolabile). L'appareil porte le nom de son inventeur : Franz von Soxhlet.

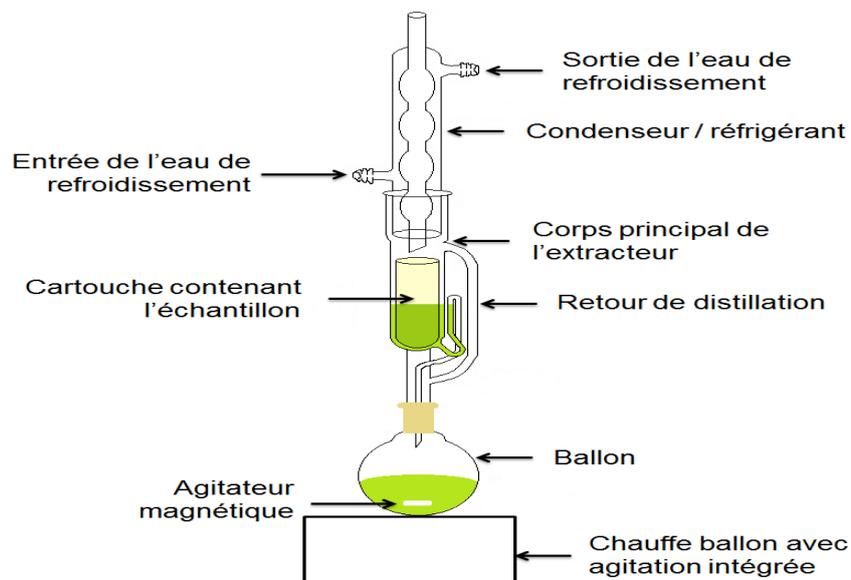


Figure 19: Schéma de principe de l'extraction par Soxhlet [177].

- **Mode opératoire :**

La matrice végétale est placée dans une cartouche en cellulose **figure 19** et le solvant dans un ballon. Celui-ci est chauffé à sa température d'ébullition puis condensé dans la cartouche. Lorsque le solvant atteint la même hauteur que le bras du siphon, il est chargé en molécule bioactive et se décharge de la cartouche pour retourner dans le ballon. Une fois dans le ballon, les molécules extraites et dissoutes (le soluté) sont séparées du solvant par distillation ce qui permet au soluté de rester dans le ballon tandis que le solvant est de nouveau condensé dans la cartouche contenant la matière végétale. Ces cycles sont répétés jusqu'à extraction complète du soluté [178].

La séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide de l'appareil appelé évaporateur rotatif. Dans cet appareil on réalise une évaporation sous vide en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation, le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon-collecteur de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande et renouvelée permettant donc d'effectuer une évaporation rapide.



Figure 20: Appareil d'évaporateur rotatif.

L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite, évitant ainsi la dégradation thermique éventuelle des composés. C'est une méthode d'évaporation simple, utile, douce et rapide [179].

✓ **Extraction par Soxhlet**

○ **Extraction par solvant apolaire (Délipidation)**

Les poudres végétaux sont extraites et sont repris dans un appareil de Soxhlet avec l'Ether de pétrole, cette extraction a pour but d'éliminer les graisses ainsi que les substances lipophiles.

○ **Extraction par solvant polaire (Extraction des polyphénols) :**

Le résidu de l'extraction par le solvant apolaire est repris dans un appareil de Soxhlet avec le méthanol. Après épuisement de la matière végétale le méthanol est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait méthanolique est stocké dans des boites fermées.



Figure 21: extrait éthyrique



Figure 21: Extrait méthanolique.

5.2.2.2. Extraction par Ultrason

L'extraction assistée par ultrasons (20 – 100 kHz) est une méthode simple, efficace et peu coûteuse, qui offre beaucoup de reproductibilité en peu de temps et améliore le rendement de l'extraction.

Le principe de l'EAU consiste à faire immerger la matière végétale dans l'eau ou dans le solvant, et en même temps la soumettre à l'action des ultrasons [180]. Pendant la sonication, les ondes sonores induisent des vibrations mécaniques et conduisent au phénomène de cavitation à travers une succession de phases d'expansion et de compression, provoquant la formation des bulles [181]. Les bulles formées par l'expansion vont se développer puis dégonfler. Si ces bulles se situent près d'une surface solide, alors le dégonflement sera asymétrique, ce qui produira des jets de liquide à grande vitesse [182].

➤ Le mécanisme d'extraction implique deux phénomènes physiques :

- Les ultrasons induisent une pénétration du solvant dans la matière végétale, ce qui provoque la rupture des parois cellulaires, pour faciliter la libération du contenu de la matière.
- Le contenu des cellules peut être « lessivé » après destruction des parois cellulaires, afin de récupérer l'ensemble des composés d'intérêt.

L'effet de cavitation est fortement dépendant des paramètres de fonctionnement (fréquence ultrasonique, intensité, température et temps de traitement...) qui sont importants pour un fonctionnement effectif des sono-réacteurs.

Il existe deux appareils pour générer des US : le bain à US et la sonde ultrasonore. Le bain à US est utilisé pour disperser des solides dans un solvant car les US permettent de diminuer la taille des particules solides et ainsi d'augmenter leur solubilité. Cet appareil est aussi utilisé pour dégazer des solutions ou pour nettoyer des matériaux puisqu'il est plus facile à manipuler et plus économique que la sonde ultrasonore.

✓ Extraction par le bain ultrason :

○ Extraction par solvant apolaire (Délipidation) :

Pour chaque fraction, 1g de matière végétale est mélangé avec 10 ml du l'éther de Pétrole, on met le mélange dans le bain ultrason à froid pendant 5 min .L'extrait est ensuite filtré par un papier filtre (Wattman N°4), puis laissé séché la poudre à l'aire libre.

○ Extraction par solvant polaire (Extraction des polyphénols) :

La matière végétale dégraissée par l'éther de pétrole est repris par le méthanol (10 ml), on met le mélange dans le bain ultrason à 30 °C pendant 30 min. L'extrait est filtré par un papier filtre. En suite, on met le filtrat dans une boite pétrie ouverte afin d'évaporer le solvant à l'aire libre.

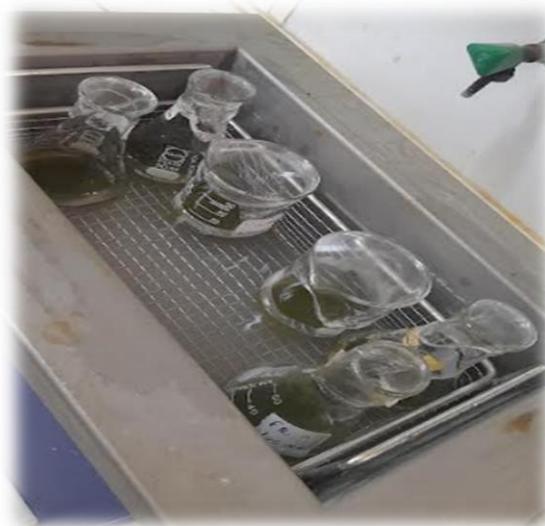


Figure 22: Extraction par le bain ultrasons.

• **Calcul de rendement :**

Le pourcentage de rendement pour chaque fraction a été calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{m}{m_0} \times 100 \quad (4)$$

R : Le rendement exprimé en %.

M : La masse de l'extrait après évaporation.

M₀ : La masse de la poudre sèche.

- Avantages et inconvénients d'extraction par soxhlet et ultrason :

Tableau 8: Avantages et inconvénients d'extraction par soxhlet et ultrason

Méthode d'extraction	Avantages	Inconvénients
Extraction par soxhlet	<p>Rendement plus important par rapport aux autres méthodes.</p> <p>Le déplacement de l'équilibre de transfert en mettant à plusieurs reprises le solvant frais en contact avec la matrice solide,</p> <p>Le maintien d'une température relativement élevée d'extraction avec la chaleur du ballon à distiller,</p> <p>Aucune nécessité de filtration après l'extraction</p>	<p>Grand volume de solvant.</p> <p>long temps de l'opération a exigé (plusieurs heures).</p> <p>Reste des solvants toxique dans l'extrait. dégradation les composés non saturé.</p> <p>Impossible d'accélérer le processus par agitation</p> <p>La possibilité de dégradation thermique des composés cible ne peut pas être ignorée vu que l'extraction s'opère habituellement au point d'ébullition du solvant pendant un temps assez long</p>
Extraction par ultrason	<p>Méthode alternative peu coûteuse, simple et efficace</p> <p>L'augmentation de la cinétique et du rendement d'extraction,</p> <p>Réduction de la température de fonctionnement permettant l'extraction des composés thermolabiles,</p> <p>Faible coût de l'appareillage et facilité de l'opération par comparaison à d'autres nouvelles techniques d'extraction telles que l'extraction assistée par micro-ondes, Possibilité d'utilisation de n'importe quel solvant ce qui permet d'intervenir dans l'extraction d'une large variété de composés naturels.</p>	<p>Ne permet pas de renouveler le solvant pendant le processus d'extraction [183].</p> <p>L'effet délétère de l'énergie ultrason sur les constituants actifs des plantes médicinales par la formation des radicaux libres et par conséquent des changements indésirables dans les molécules médicamenteuses [184].</p>

5.3. Screening phytochimique :

Les tests phytochimique sont réalisés pour identifier les métabolites secondaires existant

dans les plantes. Ces tests sont effectués sur l'extrait végétal de la poudre des feuilles des plantes étudiées.

5.3.1. Analyses qualitatives [185-191] :

➤ Les polyphénols :

Dans un tube à essai, on introduit 0.2 ml d'extrait méthanolique et 0.8 ml de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7.5 %) après agitation, 1 ml de la solution de folin-ciocalteu est ajouté à l'ensemble après 20 minutes d'incubation à l'obscurité. L'apparition de la couleur bleu confirme la présence des polyphénols.

➤ Les flavonoïdes :

A 1ml de l'extrait, on ajoute quelques gouttes d'une solution d' AlCl_3 1%. L'apparition d'une couleur jaune indique la présence des flavonoïdes.

➤ Les tanins :

Dans un tube à essai, introduire 5ml d'extrait à analyser et ajouter 1 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 2%, la présence des tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

➤ Les alcaloïdes :

Dans deux tubes à essai, introduire 1ml de l'extrait à analyser. Acidifier le milieu par quelques gouttes de HCl et ajouter quelques gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube et quelques gouttes de réactif de Wagner dans le second tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement révèle la présence d'alcaloïdes.

Les réactifs Mayer et Wagner sont préparés comme suit :

- **Réactif de Mayer :** Dissoudre 1,36 g de chlorure de mercure dans 60 ml d'eau distillée puis 5g de KI dans 10 ml d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100 ml.
- **Reactif de Wagner :** Dans 75 ml d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 1,27 g de I_2 . Le volume obtenu est ajusté à 100 ml.

➤ Les terpénoïdes : test de Slakowski

Dans un tube à essai, ajouter à 2.5 ml d'extrait, 0.4 ml de chloroforme et 0.6 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interphase indique la présence des terpénoïdes.

➤ **Les coumarines : Fluorescence UV**

Introduire 1ml d'extrait dans un tube à essai, ajouter 0.5 ml de NH₄OH à 25%, mélanger et observer sous UV à 366 nm. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

➤ **Les saponines : test de mousse**

Dans un à essai, introduire 2ml de l'extrait à analyser, ajouter 2ml d'eau distillée chaude, agiter pendant 15 secondes et laisser le mélange au repos pendant 15min. Une hauteur d'un mousse indique la présence de saponines.

- Pas de mousse = test négatif.
- Mousse moins de 1cm = test faiblement positif.
- Mousse plus de 1cm = test fortement positif..

➤ **Les quinones :**

A 1 ml d'extrait méthanolique, on ajoute 0,1 ml d'hydroxyde de sodium NaOH (1%). L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet révèle la présence des quinones libres.

➤ **Les anthocyanes :**

A 1 ml de l'extrait méthanolique, on ajoute 5 ml d'acide sulfurique à 10 % puis NH₄OH à 25 %. Si la coloration s'accroît par acidification, puis vire au rouge-violet en milieu basique, cela indique la présence des anthocyanes.

➤ **Les stéroïdes :**

Dans un tube à essai, on introduit 1ml d'extrait, 3 gouttes d'anhydride acétique et une goutte d'acide sulfurique concentré. Un changement de couleur du vert foncé, tournant au brun indique la présence des stéroïdes.

✓ **Identification et caractérisation de l'extrait :**

1) **La spectrophotométrie Infrarouge :**

La spectrophotométrie infrarouge est un moyen de caractérisation qui nous permet de déterminer et d'identifier la nature des liaisons chimiques et des groupements fonctionnels présents dans nos extraits.

On a préparé une pastille de KBr et l'extrait qui est ensuite placée dans le support et analysé dans l'appareil IR.

5.3.2. Analyses quantitatives:

➤ **Dosages des polyphénols :**

Le dosage des composés phénoliques totaux a été effectué par la méthode utilisant le

réactif de Folin-Ciocalteu [192]. Ce dernier est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phospho-tungstique et d'acide phospho-molybdique. Le réactif est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum se fait à 732 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par (**Singleton et Ross, 1965**) [193], en y apportant quelques modifications. Brièvement, dans des tubes à hémolyse en verre, un volume de 200 µl de chaque extrait a été ajouté, avec un mélange de 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois, et 800 µl d'une solution de carbonate de sodium à 7,5%. Les tubes sont agités et conservés pendant 30 min. L'absorbance est lue à 765 nm. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0 à 100 µg/ml).

➤ **Dosage des Flavonoïdes :**

La teneur en Flavonoïdes a été calculée par la méthode décrite par (**Jia et al. (1999)**) [194], en y apportant quelques modifications. Cette méthode consiste à ajouter 250 µl d'extrait, 750 µl d'éthanol. Puis 50 µl d'une solution d'AlCl₃ (10% dans le méthanol) et 1400 µl d'eau distillée ont été ajoutés. Le mélange est agité et laissé à la température ambiante pendant 30 min. L'absorbance a été mesurée contre un blanc préparé sans AlCl₃ à 420 nm. La teneur en flavonoïdes totaux est calculée en termes d'équivalent quercétine (EgQ) par référence à la courbe d'étalonnage tracée avec 25, 50, 75 et 100 (µg/ml) de quercétine.

➤ **Dosage des tanins :**

La méthode est adoptée à la vanilline avec HCl. Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des TCs et la formation de complexes rouges [195,196], cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline [197]. La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de la vanilline décrite par (**Julkunen-Titto, 1985**) [198].

Un volume de 50 µl de chaque extrait a été ajouté à 1500 µl de la solution vanilline / méthanol à 4%, puis mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) a été additionné. Le mélange est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc. Différentes concentrations comprises entre 0 et 1000 µg/ml préparées à partir d'une solution mère de la catéchine, permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

5.4. Etude in vitro de l'activité anti-thermo-dénaturante des extraits

Pour estimer l'activité anti-inflammatoire des extraits de plantes, un test de l'évaluation in vitro de la capacité de ces extraits à inhiber la dénaturation thermique d'une protéine globulaire soluble par turbidimétrie a été mise au point. En effet, La chaleur provoque la perte réversible des structures tertiaires et même secondaires des protéines [199], qui se manifeste par la diminution de leurs solubilités. Pour évaluer l'activité des extraits des plantes pour leurs effets anti-thermodénaturant des protéines, l'ovalbumine extraite du blanc d'œuf a été utilisée comme modèle.

5.4.1. Extraction de l'ovalbumine

L'extraction de l'ovalbumine à partir du blanc d'œufs de poule a été réalisée suivant le protocole décrit par **Anderson (2013) [200]**. Un œuf a été cassé soigneusement et le jaune est séparé du blanc en passant le jaune entre les deux moitiés de la coquille. Dans un bécher mis dans un bain de glaces, un blanc d'œufs a été mélangé à 50ml du tampon phosphate (0.1M, PH=6.6) et homogénéisé sous agitation magnétique pendant 5mn. L'homogénat obtenu d'aspect trouble a été ensuite centrifugé à 3000 rpm (4°C) pendant 5 mn puis filtré sur bande à gaz pour éliminer les globulines précipitées. Le filtrat obtenu, enrichi en ovalbumine, a été ensuite fractionné en des aliquotes de 3ml et congelé à -20°C.

5.4.2. Mise au point du protocole d'étude de la dénaturation thermique de l'ovalbumine

L'évaluation de l'activité anti-thermo-dénaturante de l'ovalbumine des extraits des plantes a été réalisée par la méthode décrite par **Mondal R; et al (2015) [201]** en y apportant quelques modifications.

Préalablement, il fallait réaliser des tests pour déterminer les concentrations d'ovalbumine utilisé dans l'expérience.

- **Effet de la concentration de l'ovalbumine :**

Un volume de 1 ml d'ovalbumine de blanc d'œuf à différentes dilutions (1/100, 1/75 et 1/50) a été mélangé avec 1 ml de Diclofénac à différentes concentrations (50, 100,200 et 300 $\mu\text{g/ml}$) puis incubé dans un bain marie à $70^{\circ}\text{C}\pm 2$ pendant 30mn. Les densités optiques (DO) ont été ensuite lues avant ($t=0$) et après incubation ($t=30\text{mn}$) à 660nm, pour comparer l'efficacité des extraits testés à un anti-inflammatoire de standard.

5.4.3. Evaluation de l'effet anti-thermo dénaturant des extraits des feuilles des plantes

- **Mode opératoire :**

1 ml de la solution d'ovalbumine diluée au 1/50 dans du tampon phosphate 0,1M, pH= 6,6 a été mélangé avec 1 ml de la solution de chaque extrait à différentes concentrations (50, 100, 200, 300 $\mu\text{g/ml}$) Le mélange a été mis à incuber dans un bain marie à $70^{\circ}\text{C}\pm 2$ pendant 30mn. Les densités optiques ont été lues à 660nm avant et après incubation. Le contrôle a été préparé dans les mêmes conditions réactionnelles en remplaçant l'extrait par un même volume du tampon phosphate (0.1M, PH=6.6) [201]

- **Expression des résultats :**

Le taux d'inhibition de la dénaturation thermique de l'ovalbumine à 70°C est exprimé par l'expression suivante :

$$\text{Taux d'inhibition (\%)} = \frac{\Delta\text{Abs C} - \Delta\text{Abs E}}{\Delta\text{Abs C}} \times 100 \quad (5)$$

- ΔAbsC : variation d'Absorbance à 660nm de l'ovalbumine en absence d'extrait.
- ΔAbsE : variation d'absorbance à 660nm de l'ovalbumine en présence de l'extrait (essai).

5.5. Activité anti-inflammatoire in vivo [202]

5.5.1.Principe

L'injection de la carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte de la souris provoque une réaction inflammatoire qui peut être réduite par un produit anti-inflammatoire. Cette étude permet de comparer la réduction de l'œdème plantaire après administration de doses égales du produit anti-inflammatoire à tester et du produit de référence correspondant.

- **Mode opératoire :**

Avant l'expérimentation, les souris soumis à jeun pendant 16 heures avec accès libre à l'eau. Avec préparation de 3 lots de 5 souris chacun.

Une introduction 0.5ml d'extrait aqueux de concentration de 2mg/ml pour chaque souris par voie orale est appliquée au premier lot \Rightarrow Lot échantillon.

Une introduction 0.5 de la solution de Diclofénac de concentration de 75mg/ml pour chaque souris par voie orale est appliquée pour le deuxième lot \Rightarrow Lot de référence.

Le dernier lot aucune introduction n'est réalisée \Rightarrow Lot témoin

Après 30 minutes de l'introduction des solutions, injecter la solution de carragénine sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche sous volume de 0.025 ml à tous les souris mis en expérience.

Après 4 heures, les souris ont été sacrifiées par rupture de la nuque. Couper les pattes postérieures à hauteur de l'articulation et les peser. Ensuite, calculer les moyennes des poids de la patte gauche et la patte droite pour chaque lot puis calculer le pourcentage d'augmentation des poids de la patte (% d'œdème) par la formule suivante :

$$\% \text{ d'œdème} = \frac{\text{moyenne des poids de la patte gauche} - \text{moyenne des poids de la patte droite}}{\text{moyenne des poids de la patte droite}} \times 100 \quad (6)$$

Calculer le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \frac{\% \text{ de l'œdème témoin} - \% \text{ de l'œdème échantillon}}{\% \text{ d'œdème témoin}} \times 100 \quad (7)$$

5.6. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits phénoliques

5.6.1. Pouvoir antiradicalaire (Piégeage du radical libre DPPH)

- **Principe :**

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution. Il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm. Sa couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine (jaune) par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (Figure 24). L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [203].

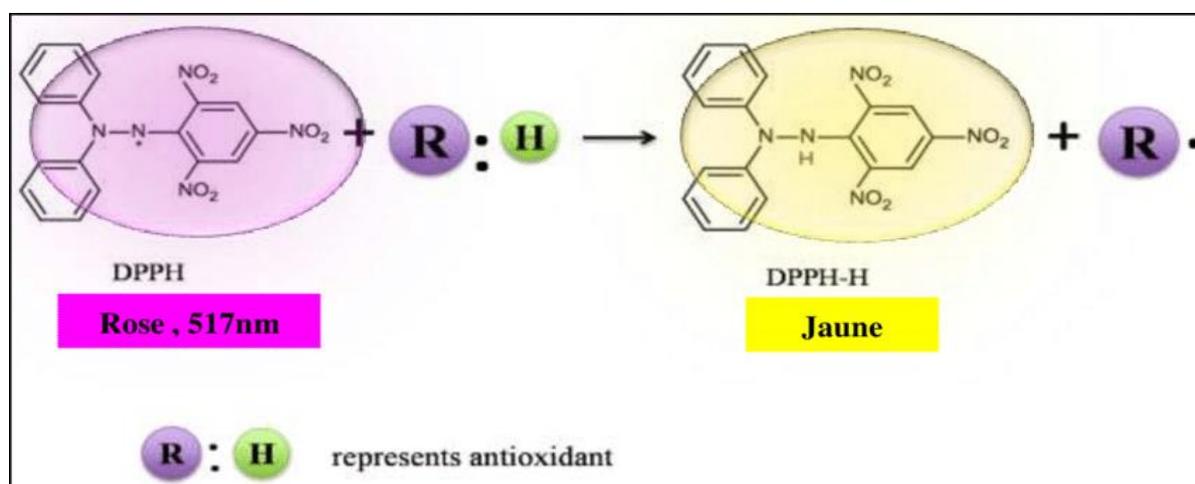


Figure 23: Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

- **Mode opératoire :**

2,9 ml de la solution méthanolique de DPPH (0,025 g/l) est ajouté à 100 µl de la solution de chaque extrait à différentes concentrations (25, 50, 100, 200, 300 et 400 µg/ml). Le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 515 nm.

Les échantillons et le témoin sont préparés dans les mêmes conditions opératoires. L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation suivante :

$$\text{L'activité antiradicalaire (\%)} = \frac{A_T - A_E}{A_T} \times 100 \quad (8)$$

AT : Absorbance du témoin après 30 min d'incubation.

AE : Absorbance de l'échantillon après 30 min d'incubation.

- **Détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC50) :**

L'IC50 est définie comme étant la quantité ou la concentration d'antioxydants (extrait ou toute autre substance antioxydante) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux. Les IC50 sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des extraits testés. Pour chaque extrait une courbe de régression linéaire ($Y = aX + b$) est établie afin de calculer l'IC50 qui permettra la caractérisation du pouvoir antioxydant des extraits. Une faible valeur de l'IC50 indique une forte activité antioxydante [204].

5.7. Formulation d'Emulgel 0.5%

La formulation d'un Emulgel 0.5% est composée de deux préparations, préparation d'une émulsion (H/E ou E/H) et un gel. Dans notre formulation, on a préparé un Emulgel de 150g. Les matières utilisées pour cette préparation avec leurs quantités sont résumé dans le **tableau 9**.

Tableau 9: Les matières utilisées dans la formulation

Les matières	Le rôle	Les quantités (%) [205]
Le Carbopol	Agent gélifiant	0,5 à 2
L'huile de paraffine	Base huileuse de l'émulsion	15 à 40
Span 20 (HLB =8,6)	Agent émulsifiant	1 à 10
Tween 20 (HLB =16,7)	Agent solubilisant	1 à 10

Triéthanolamine TEA	Ajustement de pH	2 à 4
L'eau distillée	Base aqueuse de l'émulsion	QSP

1) Préparation d'un gel :

Dans un bécher, disperser le Carbopol dans l'eau distillé à l'aide d'un agitateur mécanique jusqu'à l'obtention d'une dispersion lisse sans agrégats, ensuite on ajoute quelques gouttes de Triéthanolamine sous une forte homogénéisation jusqu'à la gélification du gel.

2) Préparation d'une émulsion :

Deux phases sont préparées séparément, la phase huileuse et la phase aqueuse.

La phase aqueuse a été préparée comme suit :

- Dans un bécher solubiliser le Tween 20 dans l'eau distillé à l'aide d'un agitateur mécanique à 60°C jusqu'à la dissolution totale du tensioactif (Tween 20).
- Ajouter sous agitation à 60°C la solution de principe actif qu'est préalablement préparé (dans un bécher, on a solubilisé les polyphénols issus de l'extrait de feuilles de l'*Inula Viscosa L.* dans l'eau distillé).

Pour la phase huileuse, le mode opératoire est comme suit :

- Dans un bécher solubiliser le Span 20 dans l'huile de paraffine à l'aide d'un agitateur mécanique à 60°C jusqu'à la dissolution totale du tensioactif (Span 20).

Après avoir préparé les deux phases :

- Procéder au chauffage les deux phases jusqu'à atteindre la température 60°C.
- Procéder à l'émulsification: La phase huileuse est versée lentement à la phase aqueuse sous une forte homogénéisation à 60 °C jusqu'à l'obtention d'une émulsion homogène.

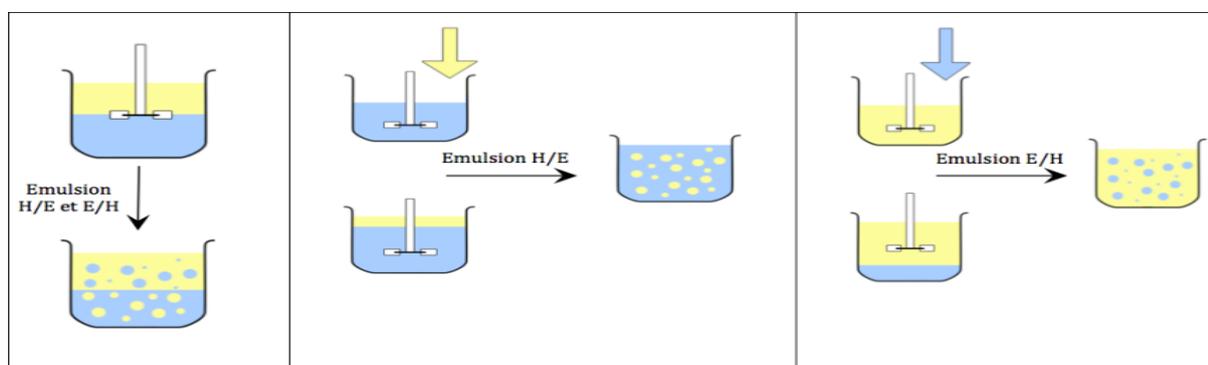


Figure 24: Procédés d'émulsification.

3) Préparation de l'Emulgel :

Cette étape consiste à mélanger les deux préparations à froid, verser le gel dans l'émulsion, ensuite homogénéiser le mélange à l'aide d'un 'homogénéisateur jusqu'à

l'obtention d'un émulsion.

5.7.1. Contrôle de produit fini d'Emulsion :

- **Propriétés macroscopiques :**

L'émulsion est contrôlée visuellement pour leur couleur, leur homogénéité, leur consistance et la séparation des phases.

- **Mesure de pH :**

La mesure de pH est nécessaire, elle a été réalisée avec un pH-mètre muni d'une électrode pour produits visqueux. Le pH de la crème en contact de la peau doit se situer à une fourchette allant de 5,5 à 6 car la peau est normalement légèrement acide, ce qui lui permet de développer une protection plus efficace contre les attaques naturelles et permanentes des micro-organismes.

- **Test de stabilité (centrifugation) :**

L'émulsion est centrifugée à 3000 rpm pendant 10 minutes pour vérifier la crémation ou la séparation des phases. Ce test est utilisé pour évaluer la stabilité physique.

- **Mesure de conductivité :**

La conductivité électrique de l'émulsion est mesurée à température ambiante avec un conductimètre numérique.

- **Microscopie Optique :**

La microscopie optique est une technique très utile pour l'étude des émulsions. Elle constitue un excellent moyen pour suivre la stabilité de ces systèmes lors du vieillissement. La microscopie optique est une méthode d'analyse usuelle pour la multiplicité des systèmes, cette méthode permet d'avoir une idée sur la taille des gouttelettes internes souvent de l'ordre du micromètre. L'analyse microscopique des crèmes formulées a été effectuée à l'aide d'un microscope optique muni de caméra type.

- **Etude de comportement rhéologique :**

On a défini la rhéologie comme étant l'étude de l'écoulement et de la déformation des matériaux. Les objectifs généraux des mesures rhéologiques (la rigidité, module, viscosité, dureté et la force) sont:

- Obtenir une description quantitative des propriétés mécaniques.
- Obtenir l'information liée à la structure moléculaire et à la composition du matériel.
- Caractériser et simuler l'exécution du matériel pendant le traitement et pour le contrôle

de la qualité.

Les mesures du comportement rhéologique sont importantes non seulement pour évaluer la stabilité physique mais elles sont en même temps des indicateurs des paramètres de type qualité du système et utilité. Les études sur ces propriétés sont devenues un outil crucial dans l'analyse des produits cosmétiques, dans le but de produire des profils physiques et structurels stables. Pour se faire, deux tests ont été effectués :

○ **Le test d'écoulement :**

Des courbes d'écoulement ont été déterminées en régime continu sous cisaillement variable, traduisant la viscosité apparente η_{app} (Pa.s) en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ (s^{-1}).

Pour l'obtention de ces courbes, on fait varier la vitesse de cisaillement par pas logarithmique de 0,001 à 1000 s^{-1} , avec un nombre de point de mesure de 5 par décade, et un temps de mesure entre deux points successifs variant de 50 à 5s.

Les courbes d'écoulement issues de ce test sont ensuite modélisées par des modèles mathématiques qui représentent le comportement rhéologique des crèmes à l'aide du logiciel « STATISTICA » qui offre une multitude de technique de méthodes d'optimisation non linéaires se basant sur un calcul itératif.

Ce test rhéologique nous permet de déterminer la viscosité de nos essais et pour cela nous avons utilisé un rhéomètre de marque **Anton Paar Modulat** Compact Rhéomètre MCR 302, relié à un bain thermostat et commandé à l'aide d'un logiciel qui permet de traiter les données.

○ **Le test de viscoélasticité :**

Les propriétés viscoélastiques des crèmes ont été mesurées en mode dynamique par un test non destructif d'oscillations de faible amplitude. Un balayage croissant en déformation, de 0,0001 à 1000 a été effectué à la fréquence de 1 Hz (mode logarithmique, 4 points/décade). Cette mesure a permis d'obtenir les valeurs des modules G' , G'' dans le domaine linéaire viscoélastique.

G' : le module de conservation, il représente le caractère élastique de la crème, l'énergie emmagasinée dans le matériau.

G'' : le module de perte, qui représente le caractère visqueux de la crème et correspond à l'énergie dissipée.

5.8. Les suppositoires

On a préparé des suppositoires de polyphénols issus de l'extrait de feuilles *Inula viscosa* L. 50 mg, par Fusion et Coulée.

- **Détermination du facteur de déplacement :**

Pour déterminer le facteur de déplacement, il faut préparer 2 séries de 6 suppositoires dans le même moule, l'une en excipient pur, l'autre avec un mélange d'excipient et de PA en quantités parfaitement connues.



Figure 25: Moule de suppositoire.

- ✓ Série 1 : Préparation de 6 suppositoires placébos.

On pèse une quantité d'excipient nécessaire pour la préparation de 8 suppositoires placébos de 1 g, soit 8 g. Ensuite, faire fondre dans un bain marie réglé à 45 °C, en mélangeant doucement jusqu'à fusion complète. Après couler tout l'excipient fluide en veillant au remplissage complet des alvéoles et en versant l'excès sur les 6 alvéoles du moule, ce qui permet d'obtenir des suppositoires à bases planes et évitera l'affaissement de celles-ci lors de la rétraction du produit en se refroidissant.

Quand la masse acquiert la consistance de "beurre à tartiner", racler le sommet des alvéoles des suppositoires à l'aide d'une spatule de manière à obtenir une base bien plane et lisse. Ne pas attendre le durcissement total de l'excipient car le raclage pourrait entraîner des fissures. Lorsque les suppositoires sont solidifiés démouler et peser les 6 suppositoires placébos ensemble (F)

- ✓ Série 2 :

Ces suppositoires ne servent qu'au calcul du facteur de déplacement car ils ne sont pas dosés individuellement avec précision. L'important est que la totalité du mélange préparé soit versé dans les 6 alvéoles du moule.

On pèse les quantités exactes de PA et d'excipients nécessaires à la préparation de 6 suppositoires. Ensuite, faire fondre l'excipient au bain marie réglé à 45 °C, puis ajouter le PA et bien mélanger avec la baguette en verre jusqu'à homogénéisation du mélange.

Couler le mélange crémeux fluide dans les alvéoles, en veillant au transfert de la totalité du mélange dans le moule. Les alvéoles ne seront pas remplir complètement et également après le refroidissement, ceci n'a aucune importance. Pour ce la Compléter le remplissage des

alvéoles non entièrement remplies avec de l'excipient pur fondu de sorte à obtenir 6 suppositoires de tailles complètes.

- Après refroidissement, démouler et peser les 6 suppositoires obtenus ensemble (Y), ensuite on calcule le facteur de déplacement f.

- **Préparation de 6 suppositoires correctement dosés :**

Suivre le mode opératoire décrit ci-dessous en préparant des quantités de matières premières suffisantes pour 8 suppositoires, tout en tenant compte du facteur de déplacement f. Lorsque le PA est incorporé à l'excipient fondu, continuer l'agitation à l'aide de la baguette en verre, pour éviter la sédimentation des particules de PA et leur répartition inégale lors de la coulée du mélange dans les moules, ne couler qu'au moment où la masse commence à devenir crémeuse.

5.8.1. Contrôle de produit fini des suppositoires

- **Aspect :**

Il est important que les suppositoires ayant un aspect homogène en surface et en profondeur. Ils doivent être unies, lisses, brillantes, sans fissuration et ne doit pas présenter de cristallisation de principe actif.

- **Uniformité de masse :**

Tous les suppositoires doivent avoir le même poids pour garantir une administration homogène au corps du temps.

La mesure de poids des suppositoires se fait sur une balance automatique. Selon la pharmacopée on pèse individuellement 20 suppositoires, les poids individuels doivent se trouver dans les limites de $\pm 5\%$ du poids moyens avec cependant une tolérance de $\pm 10\%$ pour deux unités [206].

- **Test de désagrégation :**

La désagrégation des suppositoires à base d'extrait d'*Inula viscosa* L. a marqué un temps de 13:50 min. par ailleurs, le temps de désagrégation des suppositoires à excipients lipophile ne dépassent pas les 30 minutes. Donc, ce temps présente une conformité de désagrégation [207].

Chapitre 6

Résultats & Discussion

6. Résultats et discussion

6.1. Analyses granulométriques des poudres

Après un broyage de 110g de feuilles sèches d'*Inula viscosa* L. et le tamisage de poudres obtenues par des tamis de diamètres 500,400 et 250 μm , ces derniers donnent des fractions de 36.56%, 32.51% et 30.9% respectivement.

Les poudres de différents diamètres sont soumis l'extraction par soxhlet et ultrasons afin de connaître le rendement de chaque diamètre avec chaque méthode d'extraction, le **tableau 10** résume les résultats obtenus.

Tableau 10: Résultats de rendement d'extractions d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L.

Fractions (μm)	Rendements d'extractions (%)	
	Soxhlet	Bains Ultrasons
500	17.17	10.25
400	22.78	29.43
250	15.80	13.15

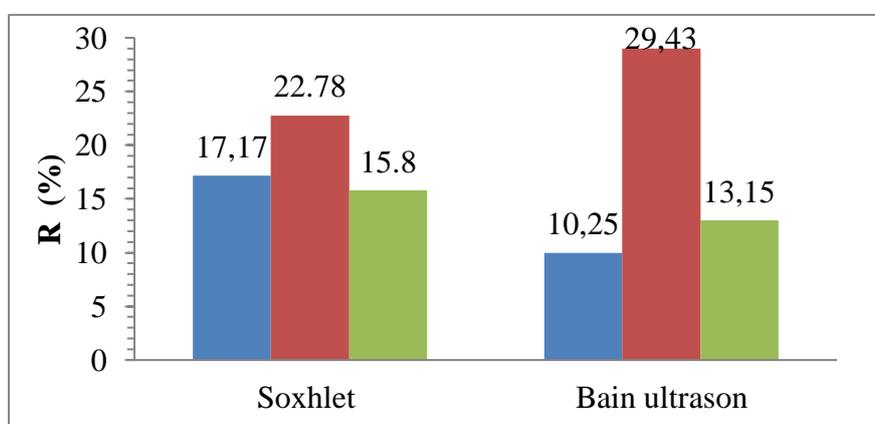


Figure 26: Résultats de rendement d'extractions d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L.

Selon la **figure 27**, la poudre de la plante d'*Inula viscosa* L. de diamètre 400 μm donne un meilleur rendement d'extraction par soxhlet d'une valeur de 22,78%. De plus, ce diamètre précédent donne aussi un meilleur rendement d'extraction par le bain ultrasons d'une valeur de 29,43% par rapport les poudres de plante de diamètres de 500 μm et 250 μm qui donnent un rendement d'extraction de 10,25%, 13,15% respectivement.

D'après les résultats obtenus, on conclue que la poudre de diamètre de 400 μm est le

diamètre optimal qui donne un rendement d'extraction élevé par rapport aux autres diamètres, soit par Soxhlet ou par le bain ultrasons.

Afin de déterminer le diamètre optimal, la suite d'extraction des poudres d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. de diamètre de 400 µm est faite par Soxhlet.

6.2. Rendement des extraits phénoliques

La **figure 28** résume les résultats de rendement des extraits des plantes étudiées, obtenus par l'extraction des composés phénoliques par le méthanol exprimés en pourcentage (%) par rapport au poids sec de la poudre végétale.

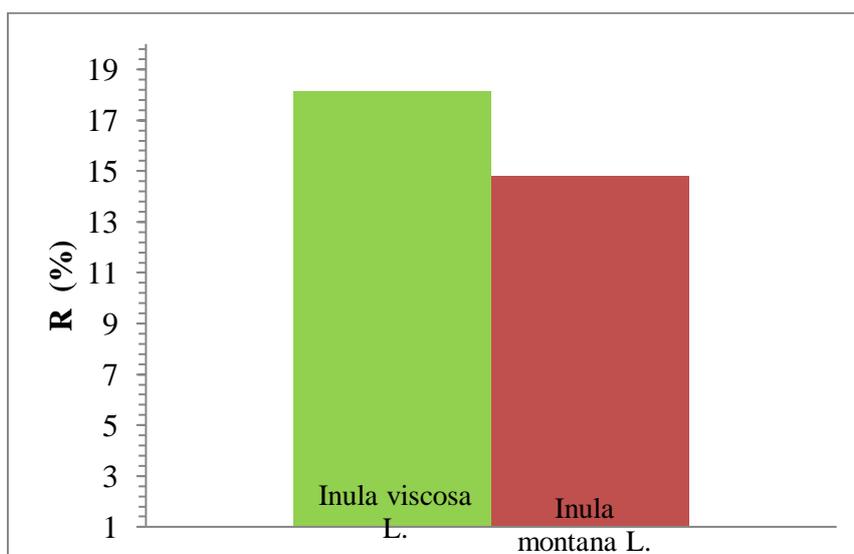


Figure 27: Les rendements d'extraction d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L.

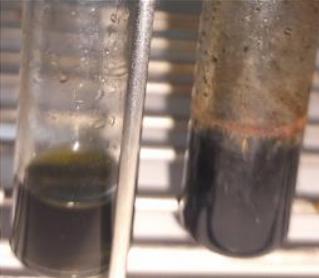
La **figure 28** montre le rendement des extraits méthanoliques, l'extrait méthanolique d'*Inula viscosa* L. présente un rendement important (18,15%) suivi par l'extrait méthanolique d'*I. montana* (14,81%). Donc, *Inula viscosa* L. donne un meilleur rendement par rapport d'*Inula montana* L..

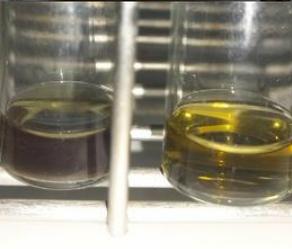
6.3. Screening phytochimique

6.3.1. Analyses qualitatives

Les tests phytochimiques sont basés sur des réactions colorées ou de précipitation par des réactifs chimiques spécifiques réalisées sur les extraits méthanoliques des deux plantes étudiées. Le screening phytochimique a permis de caractériser quelques groupes chimiques existants dans les feuilles d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L..

Tableau 11: Résultats qualitatifs du screening phytochimique

Les composées recherchées		Inula viscosa L.	Inula montana L.	Résultats
Polyphénols		+	+	
flavonoïdes		+	+	
Tanins	Galliques	+	-	
	Catéchiques	-	+	
Alcaloïdes	Réactif Mayer	-	+	
	Réactif Wagner	-	+	
Coumarines		-	-	
Terpénoïdes		-	-	

Quinons	+	+	
Anthocyanes	-	-	
Saponines	+	+	
Stéroïdes	-	-	
(+) : présence (-) : absence			

Selon les résultats mentionnés dans le **tableau 11**, une présence des polyphénols, flavonoïdes, quinons et saponines marqués dans l'extrait méthanolique d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L.. Par contre, absence remarquable des coumarines, terpénoïdes, antocyanes et stéroïdes dans l'extrait méthanoliques des plantes sus-citée.

Par ailleurs, les alcaloïdes sont absents chez l'extrait d'*Inula viscosa* L.. Par contre, ils sont présents dans l'extrait d'*Inula montana* L.. L'*inula viscosa* L. est riche en tanins gallique. Cependant, l'*Inula montana* L. est riche en tanins catéchiques.

6.3.1.1. Identification et caractérisation des extraits par infrarouge

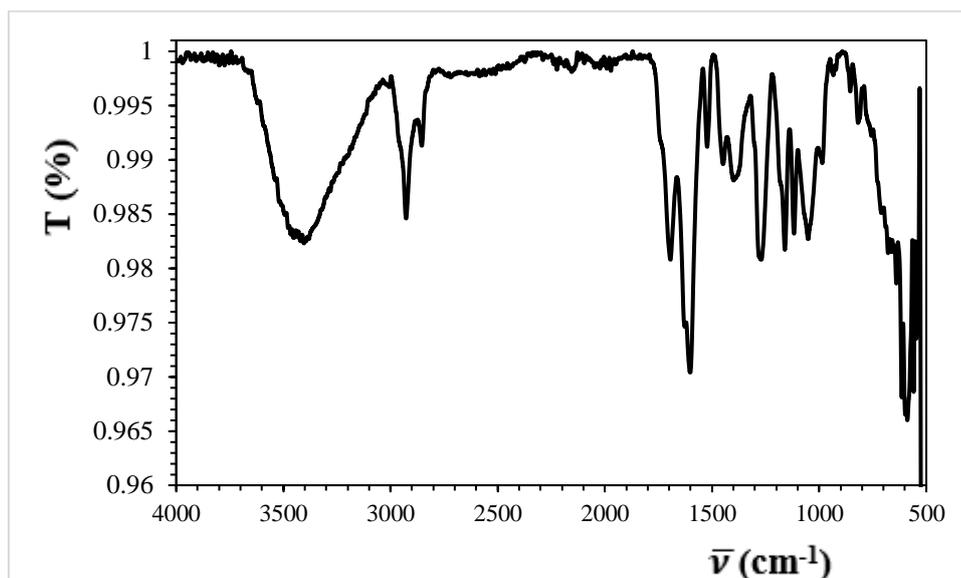


Figure 28: Spectre IRTF d'extrait *Inula viscosa* L.

Une bande localisée à 3379 cm^{-1} est attribué à un groupement hydroxyle (**OH**) des groupes phénoliques. Un ensemble des pics visible dans la région entre 2920 cm^{-1} et 2847 cm^{-1} sont attribuée à la vibration de la liaison **C-H** de groupement méthyle (**CH₃**) et méthylène (**CH₂**). Un pic situé à 1688 cm^{-1} représente la vibration de la liaison **C=O** caractéristiques des acides carboxyliques ou aromatiques. Le pic de 1645 cm^{-1} montre la présence d'une forme alcène grâce à la vibration de liaison **C=C**, ainsi que ainsi que les pics positionnés à 1595 cm^{-1} et 1538 cm^{-1} et 1516 cm^{-1} sont attribué à la vibration de liaison **C=C** aromatique.

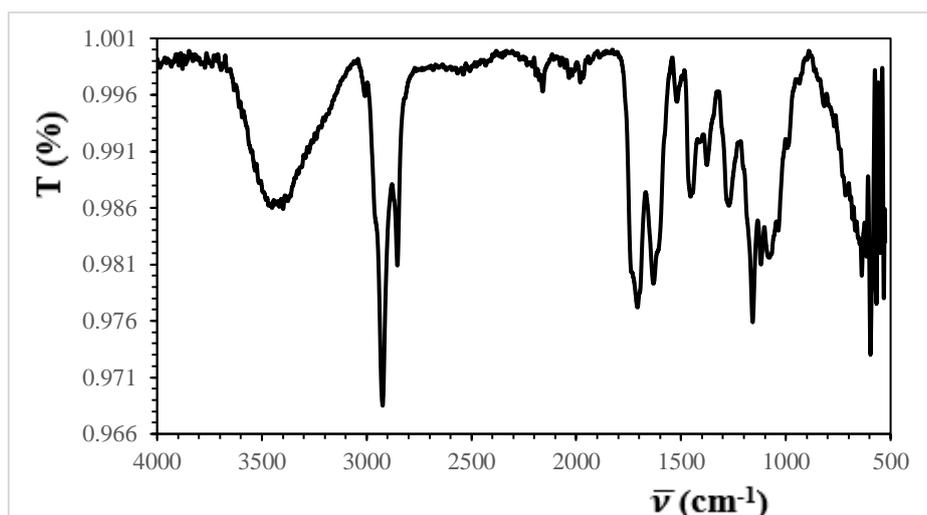


Figure 29: Spectre IRTF d'extrait *Inula montana* L.

Une bande large localisée à des ensembles piques visible dans la région entre 3410 cm^{-1} et 3037 cm^{-1} sont attribuées à la vibration de la liaison **O-H** et **N-H** respectivement. L'ensemble des pics situés à 2919 cm^{-1} et 2847 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} relatif à la vibration de la liaison **C-H**

de groupement méthyle (CH_3) et méthylène (CH_2). Le pic positionné à 2153 cm^{-1} est identique à la vibration de liaison C-C de groupement alcyne ($\text{C}\equiv\text{C}$). Par ailleurs, Le pic relatif à la vibration de la liaison C=O des acides carboxyliques et aromatiques est localisé à 1693 cm^{-1} . Les pics situés à 1661 cm^{-1} et 1622 cm^{-1} et 1537 cm^{-1} et 1505 cm^{-1} sont attribués à la vibration de la liaison C-C de groupement alcène et cycle benzénique et le groupement (C=C) aromatique respectivement.

6.3.2. Analyses quantitatives

L'étude quantitative des extraits méthanoliques au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif de déterminer la teneur totale des polyphénols, des flavonoïdes et des tanins. Pour cet objectif, trois courbes d'étalonnages ont été tracées ; La première réalisée avec l'acide gallique (dosage des polyphénols), la deuxième avec la quercétine (dosage des flavonoïdes) et la troisième avec la catéchine (dosage des tanins).

➤ Dosages des polyphénols :

La solution standardisée d'acide gallique est préparé de manière à avoir les concentrations suivantes :

Tableau 12: Différents concentrations des solutions d'acide gallique.

Les solutions	1	2	3	4	5
C (mg/ml)	0,2	0,4	0,6	0,8	1

Tableau 13: Absorbance de différentes concentrations d'acide gallique.

C ($\mu\text{g/ml}$)	0	20	40	60	80	100
A	0	0,2678	0,4051	0,5315	0,6765	0,9355

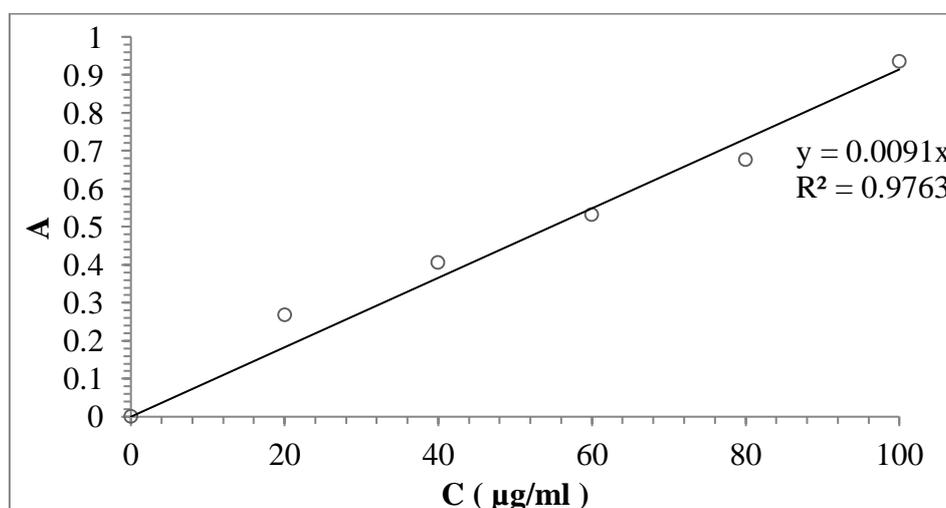


Figure 30: La courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Les résultats du dosage des deux extraits sont résumés dans le **tableau 14** et représentés dans la **figure 32**.

Tableau 14: Résultats du dosage de polyphénols des deux extraits.

Extrait Méthanolique	Inula Viscosa L.	Inula Montana L.
A	0,77	0,38
C (mg/ml)	0,93	0,46
T(mg EAG/g E)	46,55	23,45

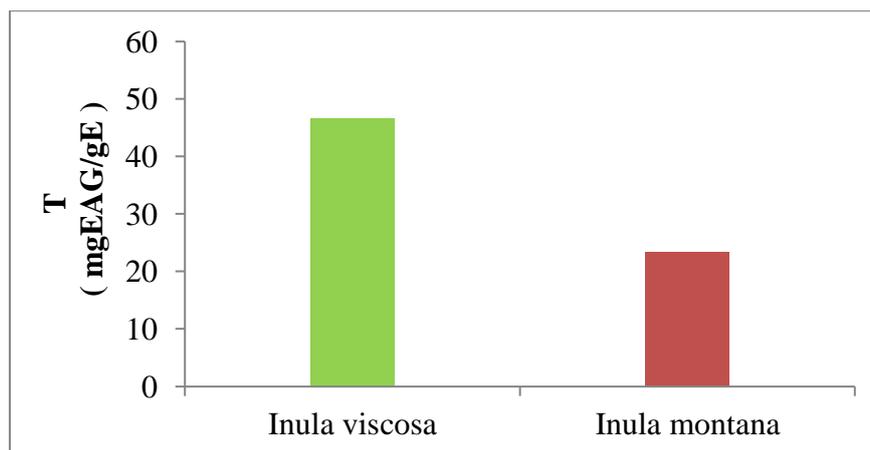


Figure 31: Teneur en polyphénols d’Inula viscosa L. et Inula montana L..

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique d’Inula viscosa L. est le plus riche en polyphénols avec une teneur de 46,55 mg EAG/g E, par rapport à celle d’Inula montana L. avec une teneur de 23,45 mg EAG/g E.

➤ **Dosage des flavonoïdes :**

La solution standardisée de quercétine est préparée de manière à avoir les concentrations suivantes :

Tableau 15: Différents concentrations des solutions de quercétine.

Les solutions	1	2	3	4
C ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	25	50	75	100

Tableau 16: Absorbance de différentes concentrations de quercétine.

C ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	0	25	50	75	100
A	0	0,2038	0,4258	0,6467	0,9212

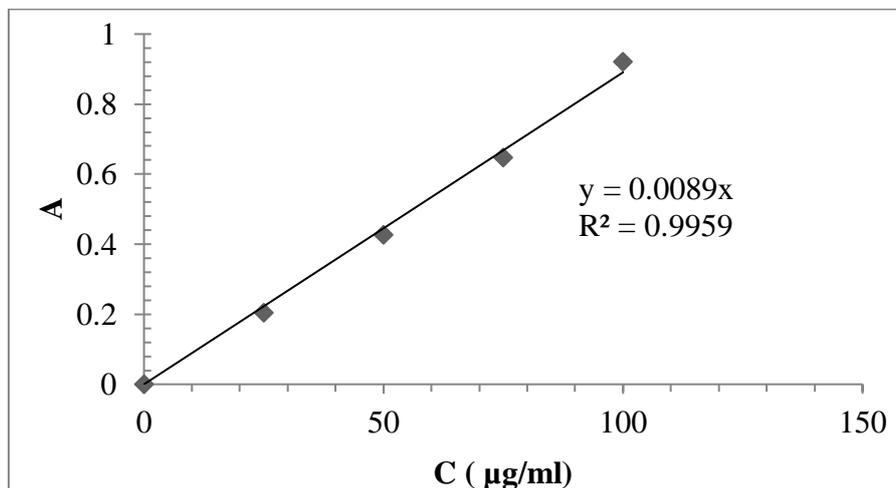


Figure 32: La courbe d'étalonnage de Quercétine.

Les résultats du dosage des deux extraits sont résumés dans le **tableau 17** et représentés dans la **figure 34**.

Tableau 17: Résultats du dosage de flavonoïdes d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L..

Extrait Méthanolique	<i>Inula Viscosa</i> L	<i>Inula Montana</i> L
A	0,57	0,66
C (mg/ml)	0,06	0,14
T (mg EQ/g E)	3,24	7,49

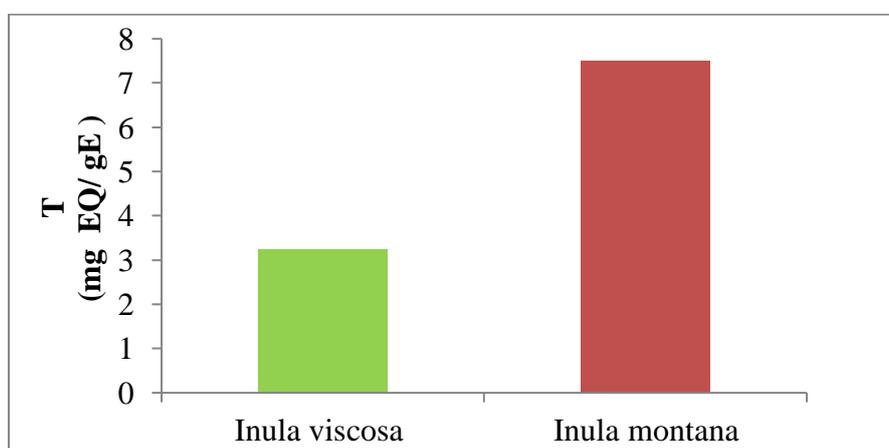


Figure 33: Teneur en flavonoïdes d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L..

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique d'*I. montana* est le plus riche en flavonoïdes avec une teneur de 7,494 mg EQ/g E, par rapport à celle d'*I. viscosa* avec une teneur de 3,242 mg EQ /g E.

➤ **Dosage des tanins :**

La solution standardisée de Catéchine est préparé de manière à avoir les concentrations suivantes :

Tableau 18: Différents concentrations des solutions de Catéchine.

Les solutions	1	2	3	4	5
C ($\mu\text{g/ml}$)	125	326	416	576	937

Tableau 19: Absorbance de différentes concentrations de Catéchine.

C ($\mu\text{g/ml}$)	0	125	326	416	576	937
A	0	0,37	0,66	0,87	1,25	1,75

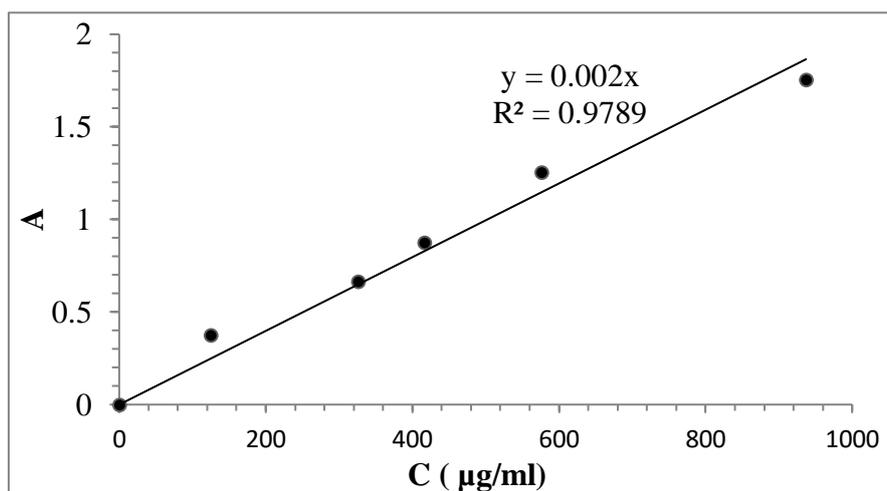


Figure 34: La courbe d'étalonnage de Catéchine.

Les résultats du dosage des deux extraits sont résumés dans le **tableau 20** et représentés dans la **figure 36**.

Tableau 20: Résultats du dosage des tanins des deux extraits.

Extrait Méthanolique	Inula Viscosa L	Inula Montana L
A	0,06	0,62
C (mg/ml)	0,03	0,31
T (mg EC / g E)	1,59	15,55

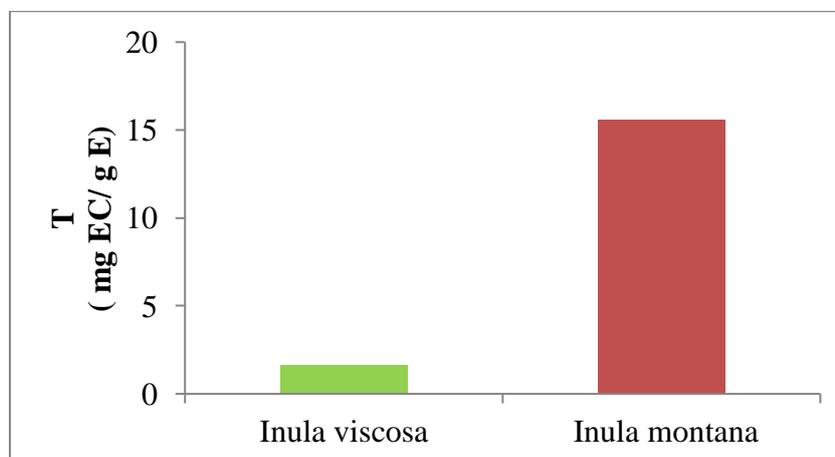


Figure 35: Teneur en tanins condensés d'extrait Inula viscosa L. et Inula montana L..

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique d'*Inula montana* est le plus riche en tanins condensés avec une teneur de 15,55mg EC/g E, par rapport à celle d'*Inula viscosa* avec une teneur de 1,595 mg EC /g E. Ces résultats confirment la présence des tanins galliques au niveau d'extrait des feuilles d'*Inula viscosa*.

Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et les tanins ne sont pas stables et diffère d'une plante à une autre, plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques tels que les facteurs géographiques, climatiques et la période de récolte ont une forte influence sur le contenu en polyphénols. Ce qui est vérifié par la comparaison entre les résultats obtenus chez les deux plantes étudiés.

6.4. Activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits

L'objectif de cette étude est de vérifier l'effet anti-dénaturation induit par l'extrait des feuilles d'*Inula viscosa* et *Inula montana* dans l'ovalbumine sous incubation.

- Les résultats de Diclofénac

Tableau 21: Les résultats de l'activité anti-thermo-dénaturantes de Diclofénac avant et après l'incubation.

	Les concentrations de diclofénac ($\mu\text{g/ml}$)	Les différentes dilutions d'ovalbumine :		
		1/50	1/75	1/100
		Les absorbances		
Avant l'incubation	50	0.003	0,007	0,018
	100	0.011	0,011	0,025
	200	0.018	0,013	0,049
	300	0,010	0,022	0,009
	Contrôle	0,028	0,012	0,02
Après l'incubation	50	0,831	0,116	0,130
	100	0,224	0,04	0,085
	200	0,198	0,110	0,106
	300	0,138	0,083	0,078
	Contrôle	1,040	0,028	0,094

Ces résultats montrent que la solution d'ovalbumine dont la concentration 1/50 donne un meilleur taux d'inhibition par rapport aux autres concentrations, les résultats des taux d'inhibition pour 1/50 sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 22: Les résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro de Diclofenac par l'activité anti-thermo-dénaturante.

C ($\mu\text{g/ml}$)	A	Le taux d'inhibition (%)
50	0,801	20,84
100	0,213	78,95
200	0,180	82,21
300	0,128	87,35
Contrôle	1,012	/

- **Les résultats des extraits :**

Tableau 23: Les résultats de l'activité anti-thermo-dénaturantes des extraits avant et après l'incubation.

		C ($\mu\text{g/ml}$)	Inula Viscosa	Inula Montana
		A		
Contrôle 0,09	Avant L'incubation	50	0,083	0,070
		100	0,086	0,193
		200	0,090	0,118
		300	0,094	0,133
Contrôle 0,68	Après L'incubation	50	0,253	0,329
		100	0,250	0,442
		200	0,209	0,357
		300	0,174	0,278

- **Les résultats du taux d'inhibition :**

Tableau 24: Les résultats de l'activité anti-inflammatoire in vitro des extraits par l'activité anti-thermo-dénaturante.

Les concentrations ($\mu\text{g/ml}$) :	Inula viscosa L.		Inula montana L.	
	Les absorbances	Le taux d'inhibition (%)	Les absorbances	Le taux d'inhibition (%)
50	0,170	71,18	0,259	56,10
100	0,164	72,2	0,249	57,79
200	0,119	79,83	0,239	59,49
300	0,08	86,44	0,145	75,42
Contrôle	0,59	/	0,59	/

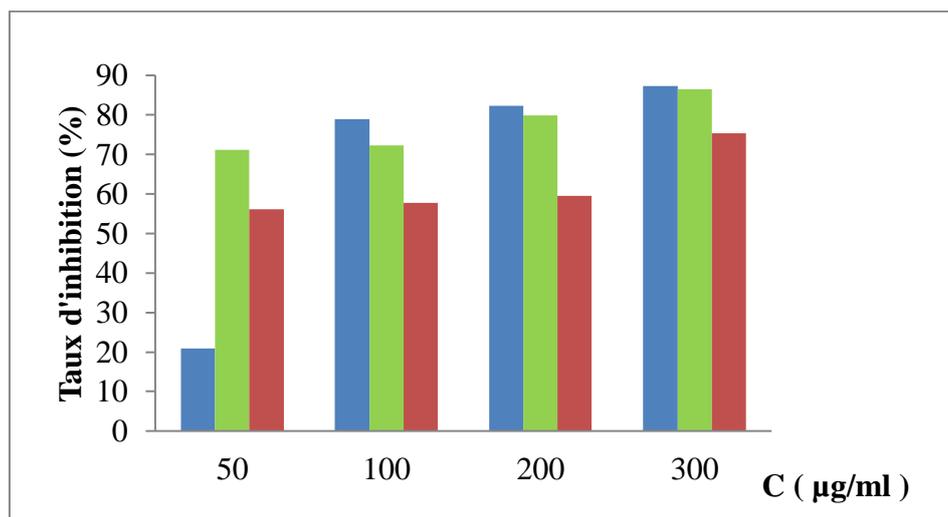


Figure 36: Résultats de test in vitro.

L'effet maximum d'inhibition de dénaturation de l'extrait des feuilles *Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. à la concentration de 300 (µg/ml) est de 86,44 % et 75,42 % respectivement, alors que le standard du Diclofénac à 300 (µg/ml) a montré une inhibition de 87,35 % de la dénaturation de ovalbumine.

La dénaturation des protéines est une cause d'inflammation bien démontrée. Dans le cadre de l'enquête sur le mécanisme de l'activité anti-inflammatoire, la capacité inhibitrice de l'extrait des feuilles des deux plantes a été étudiée contre la dénaturation des protéines de l'ovalbumine.

Les résultats ont clairement démontré que l'extrait des feuilles d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. à une concentration de 300 µg/ml présente une activité anti-dénaturante de l'ovalbumine de 86,44% et 75,42 respectivement obtenu par rapport au Diclofénac sodique.

6.5. Activité anti-inflammatoire in vivo en utilisant l'extrait aqueux d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L.

L'activité anti-inflammatoire in vivo des extraits aqueux d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. a été réalisé par le modèle de l'œdème aigu de la patte gauche de souris induit par la carragénine.

Les résultats :

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire des extraits à la dose 2mg/ml sont comparés à ceux de la référence Diclofinac 75 mg et avec celui du lot témoin.



Figure 37: pattes coupés des souris.

Tableau 25: poids des pattes des souris de chaque lot pour l'extrait aqueux d'*Inula viscosa* L.

Souris	Lot échantillon		Lot référence		Lot témoin	
	Patte gauche	Patte droite	Patte gauche	Patte droite	Patte gauche	Patte Droite
1	101	78	160	130	115	76
2	108	68	160	120	109	62
3	75	74	170	125	103	89
4	99	62	120	150	125	84
5	107	89	155	170	95	68
Moyenne	98	74.2	153	139	109,4	75,8

Tableau 26: poids des pattes des souris de chaque lot pour l'extrait aqueux d'*Inula montana* L.

Souris	Lot échantillon		Lot référence		Lot témoin	
	Patte gauche	Patte droite	Patte gauche	Patte droite	Patte gauche	Patte Droite
1	110	67	160	130	115	76
2	73	70	160	120	109	62
3	102	83	170	125	103	89
4	87	78	120	150	125	84
5	80	73	155	170	95	68
Moyenne	90.4	74.2	153	139	109,4	75,8

Tableau 27: Résultats de test anti-inflammatoire in vivo en utilisant l'extrait aqueux d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L.

Lots	Pourcentage d'œdème (%)	Inhibition de l'inflammation (%)
Référence	10,07	77,27
<i>Inula viscosa</i>	32,07	27,03
<i>Inula montana</i>	21,83	50,74
Lot témoin	44,32	/

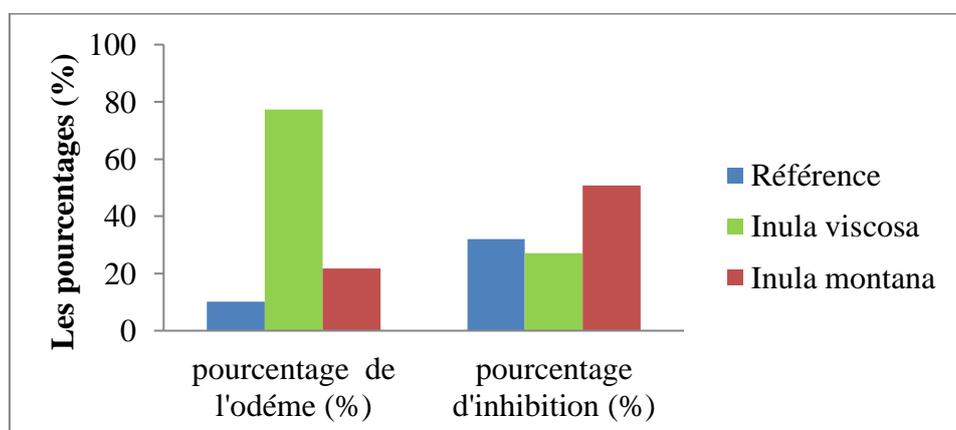


Figure 38: Résultats de l'activité anti-inflammatoire in vivo.

La réduction de l'œdème sous traitement avec l'extrait aqueux des feuilles d'*Inula viscosa* L. et d'*Inula montana* L. est importante puisque l'œdème est réduit d'une façon similaire à celui de Diclofénac comme référence. Cette réduction se manifeste par une augmentation de taux d'inhibition d'inflammation pour atteindre des valeurs de 27,03% et 50,74% respectivement. Le taux d'inhibition de l'extrait d'*Inula montana* L. est proche de la valeur obtenu par Diclofénac (77.27%).

Ces résultats montrent un pouvoir anti-inflammatoire de l'extrait aqueux d'*Inula viscosa* L. et d'*Inula montana* L. qui peut classer comme des anti-inflammatoires non stéroïdiens

comme le Diclofénac.

Si on procède à une comparaison entre *Inula viscosa* L. et *Inula montana* L., on note que cette dernière possède un anti-inflammatoire plus efficace. Donc, *Inula montana* L. donne un effet meilleur.

6.6. Evaluation de l'activité antioxydant

L'activité antiradicalaire des extraits des feuilles *Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. a été déterminée par la méthode de DPPH. Les résultats obtenus sont résumés dans le **tableau 28** et représentés dans la **figure 40**.

Tableau 28: Les résultats de l'activité antiradicalaire d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L..

Les concentrations ($\mu\text{g/ml}$) :	<i>Inula Viscosa</i> L.		<i>Inula Montana</i> L	
	Absorbance	Activité antiradicalaire (%)	Absorbance	Activité antiradicalaire (%)
25	0,740	11,2	0,736	11,65
50	0,704	12,97	0,784	5,89
100	0,725	15,49	0,674	19,09
200	0,376	54,86	0,369	48 ,62
300	0,198	76 ,23	0,428	55,7
400	0,119	85,71	0,109	86,91
Témoin	0,8331	/	0,8331	/

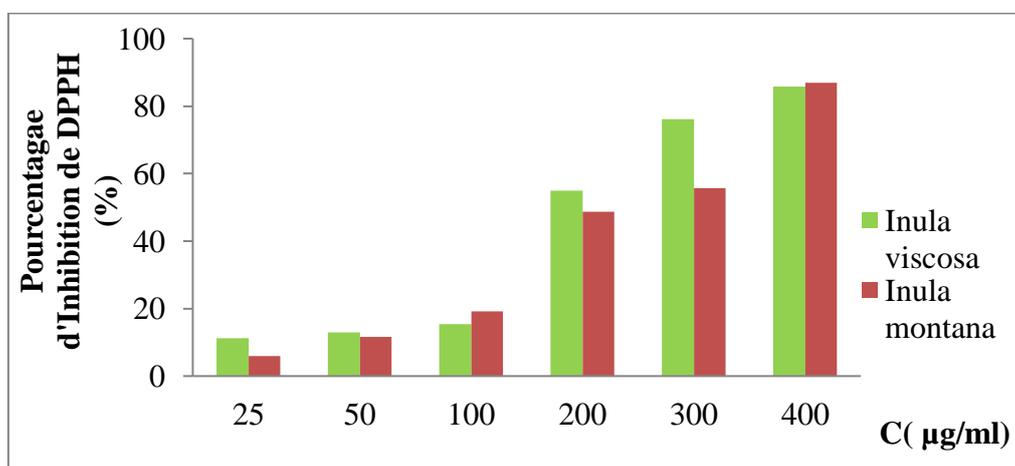


Figure 39: Pouvoir réducteur DPPH de l'extrait d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L.

D'après la **figure 40**, les pourcentages d'inhibition du radical DPPH augmentent au fur et à mesure que les concentrations des deux extraits augmentent. Cette augmentation d'inhibition du radical DPPH est significative en fonction de la concentration.

Les résultats obtenus montrent que les extraits de deux plantes révèlent une activité anti radicalaire. L'effet maximum d'inhibition de DPPH de l'extrait des feuilles *Inula viscosa* L. et *Inula Montana* L. à la concentration de 400 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) est de 85,71 % et 86,91 % respectivement.

- **Détermination de l'IC₅₀ :**

IC₅₀ est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur d'IC₅₀ est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée. La concentration de l'échantillon essentiel pour inhiber 50% du DPPH radicalaire a été calculée par la régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations d'extraits préparés.

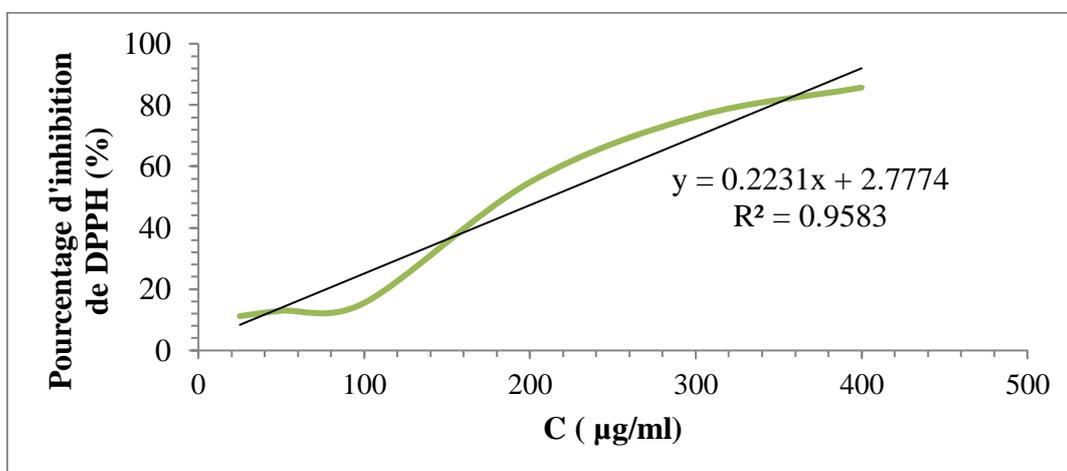


Figure 40: Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des concentrations de *Inula viscosa* L.

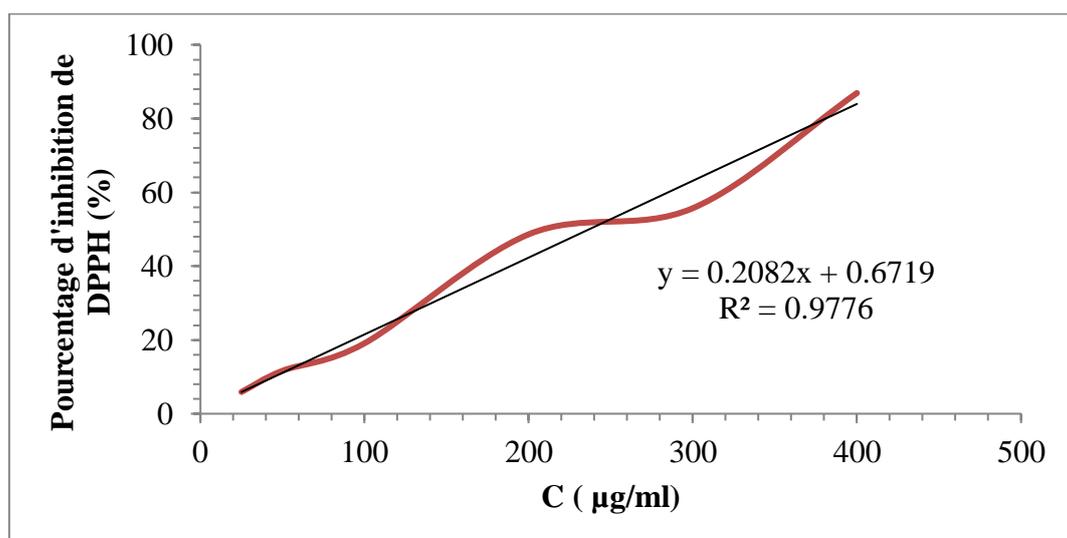


Figure 41: Pourcentage d'inhibition du radical libre en fonction des concentrations de *Inula montana* L.

Les valeurs d'IC₅₀ trouvées pour les extraits étudiés sont représentées dans la **figure 43** :

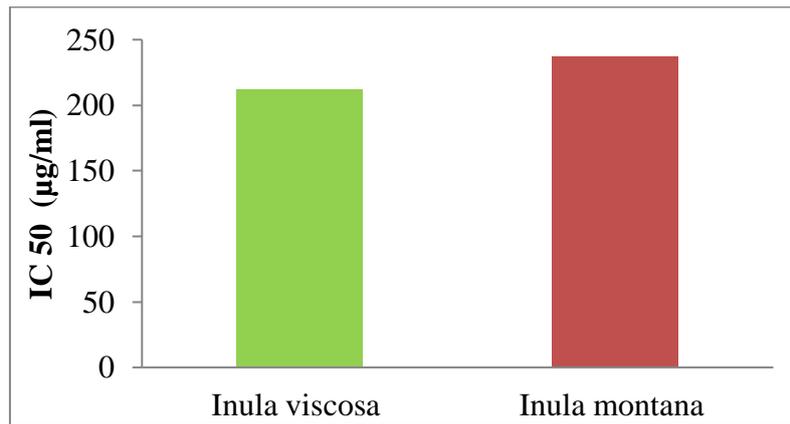


Figure 42: Valeurs des IC₅₀ d'extraits Inula viscosa L. et Inula montana L.

Les résultats présentés dans la figure ci-dessus montrent que les deux extraits testés possèdent une activité anti radicalaire avec un IC₅₀ de l'ordre de 211,79µg/ml, 237,15µg/ml pour Inula viscosa L. et Inula montana L. respectivement. Alors, l'extrait d'Inula montana L. possède une activité antioxydante supérieure suivie à l'extrait d'Inula viscosa L. .

6.7. Contrôle de produit fini d'Emulgel

6.7.1. Contrôle des paramètres organoleptiques

- **Aspect et couleur** : La figure ci-dessous confirme que la préparation possède un aspect opaque de couleur verte caractérisé par une bonne homogénéité et d'un étalement facile.
- **Odeur** : La préparation d'emulgel a une odeur de l'extrait.



Figure 43: Emulgel 0.5% à base d'extrait des polyphénols.

6.7.2. Contrôle des paramètres physicochimiques :

- **Centrifugation** : L'observation visuelle indique que la préparation est stable (pas de séparation des phases) avec une couleur homogène comme est montré dans la figure ci-dessous.



Figure 44: Résultat de test de centrifugation.

- **Microscope Optique** : L'Emulgel a été examiné sous un microscope à lumière pour étudier la structure globulaire de la base du gel, il a été dilué de manière appropriée et examiné au microscope optique avec un grossissement de 40 et 160.

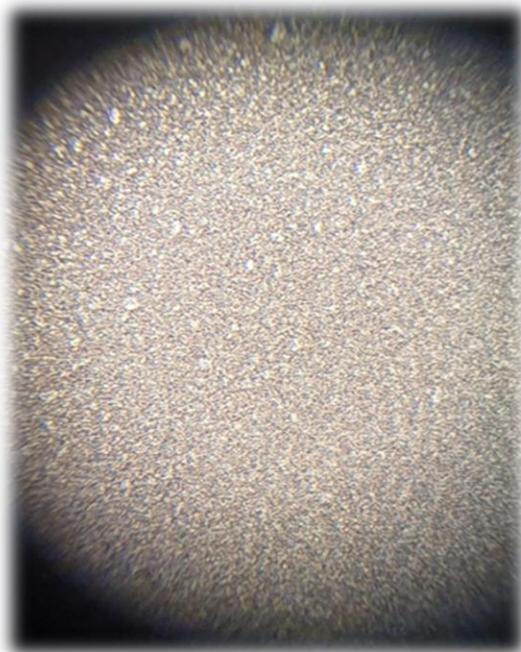


Figure 45: Grossissement ×40

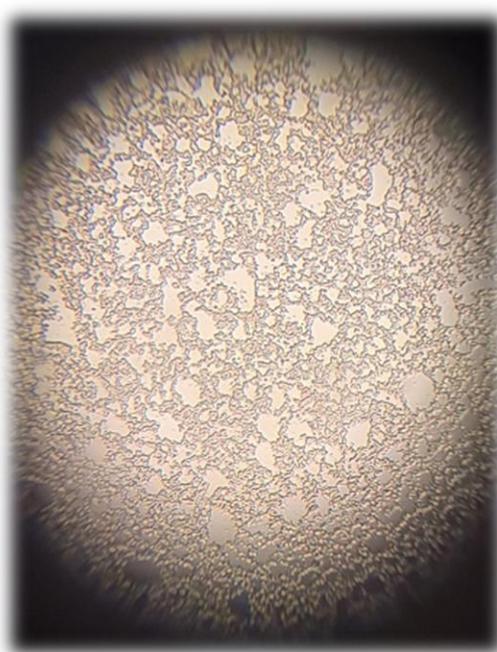


Figure 46: Grossissement ×160

L'Emulgel formulé présente une bonne consistance. Les **figures 46** et **47** montrent la présence de globules de forme irrégulière, ce qui indique la formation d'une émulsion dans la base du gel. Ceci a prouvé le succès de la méthode employée pour la préparation de l'émulgel.

- **Mesure de pH :** L'émulgel préparé à base de l'extrait des feuilles d'*Inula viscosa* L. possède un pH de 5.55 conforme aux normes établies par les recommandations relatifs aux préparations semi solides (pH = 5.5-6.5).
- **Mesure de conductivité :** L'émulgel possède une valeur de conductivité nulle, ce qui signifie l'absence du courant électrique dans l'émulgel et le sens dans l'émulsion est E/H.
- **Etude de comportement rhéologique :**

L'objectif de ce test est de caractériser le comportement rhéologique des formes semi-solides dans le domaine linéaire et sous écoulement. Cette partie concerne la caractérisation de comportement rhéologique de l'émulgel.

- **Test d'écoulement :**

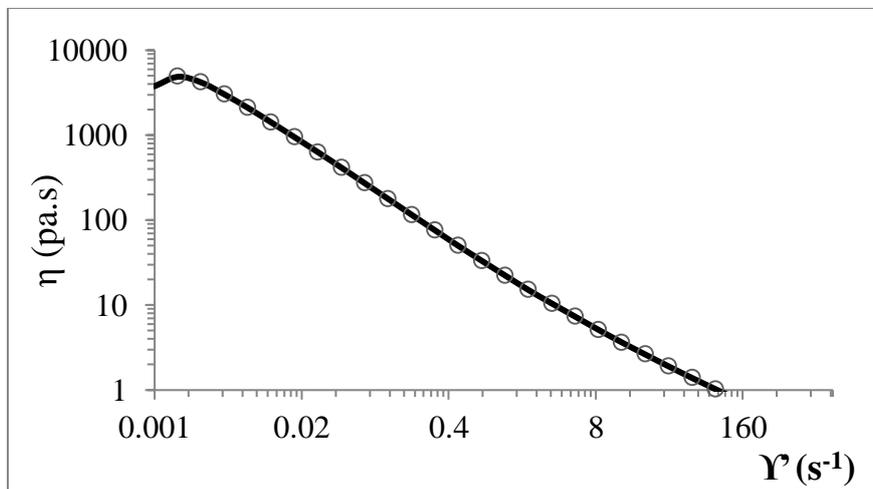


Figure 47: La variation de la viscosité (η) de l'émulgel en fonction de la vitesse de cisaillement γ^* (S^{-1}).

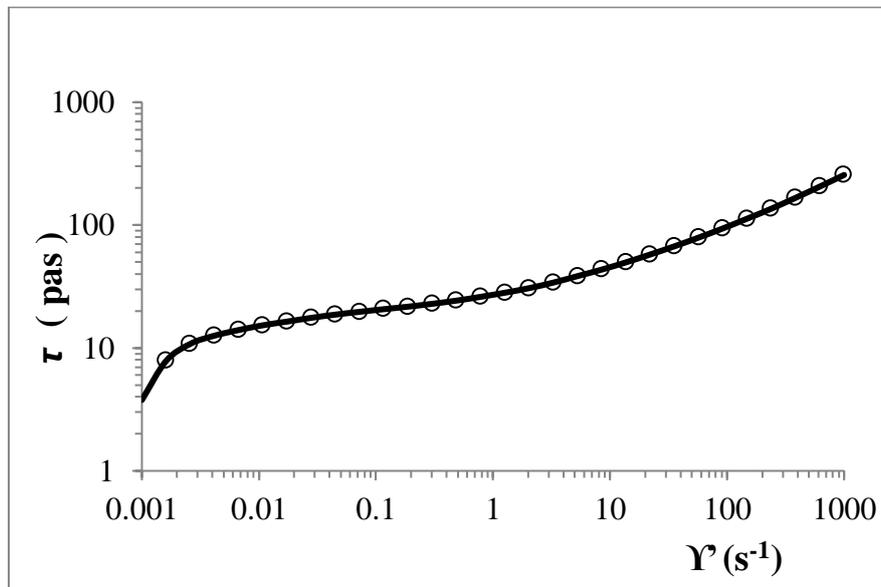


Figure 48: La variation de la contrainte de cisaillement (τ) de l'emulgel en fonction de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}^*$ (S-1).

Les figures 48,49 présentent la variation de la viscosité et la contrainte de cisaillement de l'emulgel en fonction de la vitesse de cisaillement, la viscosité diminue lorsque la vitesse de cisaillement augmente. Du même, la contrainte de cisaillement augmente au fur à mesure avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement. Ces variations prouvent que l'emulgel a un comportement non-newtonien (rhéofluidifiant). Pour de très faibles et très élevées valeurs de la vitesse de cisaillement, l'emulgel est newtonien, cela correspond aux première et seconde régions.

Ces variations de la viscosité et la contrainte de cisaillement en fonction de la vitesse de cisaillement de l'emulgel peuvent justifier pour les raisons suivantes :

- ✓ Aux faibles cisaillements : La viscosité est élevée, ce qui confirme que l'emulgel est dans un état de repos (stockage).
- ✓ Aux forts cisaillements : La viscosité est faible, ce qui confirme que l'emulgel est dans un état d'étalement.
 - **Test de viscoélasticité :**

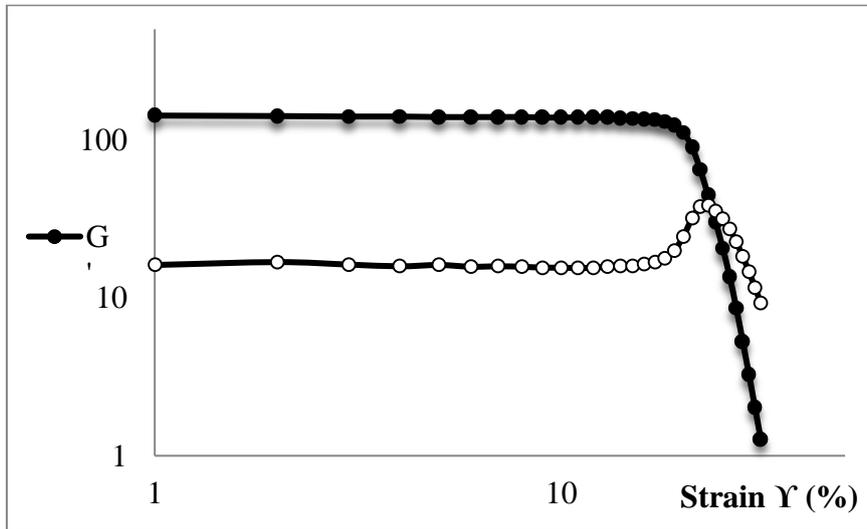


Figure 49: Variations des modules de conservation (élastique) G' et des modules au repos (visqueux) G'' de l'emulgel.

L'étude des propriétés viscoélastiques est essentielle pour comprendre les relations entre la microstructure et les propriétés rhéologiques. Examiner leur comportement aux amplitudes plus élevées est nécessaire pour déterminer leurs propriétés lorsqu'elles sont soumises à des déformations plus intenses et fournit notamment des informations quant à leurs différences structurelles.

La **figure 50** illustre la variation des modules de conservation (élastique) G' et des modules au repos (visqueux) G'' de l'emulgel. Dans le domaine du LVE (linear viscoelastic regions), on remarque que $G' > G''$, donc l'emulgel exhibe le comportement d'un solide viscoélastique. Hors LVE, G' commence à diminuer pour intercepter G'' au point de gel ($G' = G''$). Au-delà de ce point, G'' devient supérieur à G' . En conséquence, le comportement viscoélastique cède la place au comportement d'un liquide à déformation plastique qui n'est récupérable que partiellement.

6.8. Les suppositoires

- Détermination du facteur de déplacement f :

Série 01 : $F = 6,567$ g



$f = 0,6$

Série 02 : $Y = 6,687$ g

$P = 0,3$ g

- **Détermination la quantité exacte d'excipient M :**

Lorsque le facteur de déplacement est connu, il est possible de calculer la quantité exacte d'excipient à ajouter pour obtenir n suppositoires avec un dosage approprié. Cette quantité est donnée par l'équation suivante :

$$M = F - (f - P)$$



$$M = 6,267 \text{ g}$$

6.8.1. Contrôle de produits finis

- **Aspect :**

Les suppositoires sont de forme tronc-conique régulière, dont la composition est homogène, ils ont une surface lisse, de couleur verte avec une odeur de l'extrait. Ils ne marquent aucune cristallisation des extraits.



Figure 50: Suppositoire à base d'extraits des polyphénols.

- **Uniformité de masse :**

On observe que la masse moyenne de 20 suppositoires est de 1.133g, ainsi que la masse minimale et maximale de ces suppositoires sont 1.126g et 1.149g respectivement.

Toutes les masses sont incluses dans l'intervalle $[m_{\text{moy}} - 5\%, m_{\text{moy}} + 5\%]$. C'est-à-dire, ils sont incluses dans l'intervalle $[1.107\text{g} - 1.189\text{g}]$. Selon la pharmacopée, l'uniformité de masse est vérifiée.

- **Test de désagrégation :**

La désagrégation des suppositoires à base d'extrait inula viscosa L. a marqué un temps de 13:50 min. par ailleurs, le temps de désagrégation des suppositoires à excipients lipophile ne dépassent pas les 30 minutes. Donc, ce temps présente une conformité de désagrégation.

Conclusion

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie présente un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. Ces plantes possèdent des composés qui ont des propriétés anti-inflammatoires et anti oxydante.

Dans ce contexte, l'activité anti-inflammatoire des extraits des feuilles d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. les tests physico-chimiques, organoleptiques, les comportements rhéologiques ont été évalués.

L'extraction par solvant volatils à l'aide d'un soxhlet avec méthanol des feuilles d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. ont fournit des rendements de 18.15% et 14.81 % respectivement.

Le screening phytochimique confirme d'une présence des groupes chimiques communs comme polyphénols, flavonoïdes, quinones, saponines et coumarines et d'une absence de stéroïdes, anthocyanes, terpénoïdes ainsi qu'il confirme une différence dans les tanins et les alcaloïdes.

Les spectres d'IRTF des différents extraits enregistré mettant en évidence la présence d'une substance aromatique, la fonction hydroxyle.

Les tests in vivo des extraits des feuilles *Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. ont prouvé une activité anti- inflammatoire importantes de 27.03% et 50.74% respectivement.

La formulation d'emulgel et suppositoires à base d'extrait d'*Inula viscosa* L. répondent aux tests organoleptiques et physico-chimiques.

La recherche de l'activité anti-inflammatoire a montré que les polyphénols extraite d'*Inula viscosa* L. et *Inula montana* L. ainsi que l'emulgel et les suppositoires formulés par l'*Inula viscosa* L. possèdent une activité anti-inflammatoire.

Références bibliographiques

- [1]: Carillon, E.(2000). La phytothérapie face à l'évolution médicale.
- [2]: Organisation mondiale de la santé.(2000).Principes méthodologiques généraux pour la recherche et l'évaluation relatives à la médecine traditionnelle.
- [3]: Fouché, J., Marquet, A., and Hambuckers, A.(2000). Les plantes médicinales de la plante au médicament, Observation du monde des plantes.
- [4]: Salhi, S., Fadli, M., Zidane, L., Douira, A.. Floristic and ethnobotanical study of medicinal plants of Kénitra (Maroc). 2010 Lazaroa 31: 133-146.
- [5]: Tabuti J.R.S., Lye K.A., Dhillion S.S..Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. J. Ethnopharmacol. 2003. 88: 19-44
- [6]: Bouayyadi 2015. Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale dans la région du Gharb, Maroc. J. Appl. Biosci
- [7]: Dibong, S. D., Mpondo, M. E., Nigoye, A., Kwin, M. F. & Betti, J. L. Ethnobotanique ET phytothérapie des plantes médicinales de Douala, Cameroun. [Ethnobotany and phytothérapie of medicinal plants sold in Douala markets] — Journal of Applied Biosciences. 2011. 37: 2496 – 2507.ISSN 1997–5902.Published online at www.biosciences.elewa.org.
- [8]: Adenot, I., Le pharmacien et les plantes : cultivez votre expertise Date, in Ordre national des pharmaciens 2014: 75008 Paris. p. 14.
- [9]: Jean, C. and S.M. Chadouli, les plantes médicinales et aromatiques. Un exemple de développement humain au Maroc la coopérative féminine de Ben Karrich – Tétouan. 2012. p. 5-7.
- [10]: Lahsissene H., Kahouadji A., Tijane M., Hseini S., 2009. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc occidental). Revue de botanique .Nouvelle série N°186_2
- [11]: Mekkiou .R; phytochimie ; (2005) ; Université Constantine; Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre Genista (fabaceae):G.Saharae, G.Ferax ; 1-2
- [12]: Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Photochimie, Plantes médicinales. Editions Tec & Doc, Paris, éditions médicales internationales, pp: 483-560.
- [13]: Strang, C. 2006. Larousse médical. Larousse.
- [14]: Barkely, T., L. Brouillet, and J. Strother, Flora of North America-Asteraceae. New York: Oxford University Press. 2006, p. 3-70.
- [15]:Kaur, R., Chahal, K.K., n.d. Chemistry and biological activity of some alantoloid from Inula species-A REVIEW.

- [16]: Zhao, Y.-M., Zhang, M.-L., Shi, Q.-W., Kiyota, H.. Chemical constituents of plants from the genus *Inula*. *Chem. Biodivers.* , 2006. 3,371–384.
- [17]: Gaussen, H., Deuroy, J.F. and Ozenda, P. Précis de botanique II « les végétaux supérieurs ».Ed : Masson ,1982 ; pp 215-408.
- [18]: Bai N., Zhou Z., Zhu N., Zhang L., Quan Z., He K. .Antioxydative flavonoids from the flower of *Inula britannica*. *Journal of Food Lipids*, 2005.12, 141–149.
- [19]: Chiarlo Sui B. costituenti dell' *inula viscosa* .Ait. Contenuto in azuleni dell' olioessenziale .*Boll. Chim. Farm.*, 1968. 107(6) : 370 – 382.
- [20]: Fauron, F, R Moati, and Y Donadien. 1983. *Guide Pratique de Phytothérapie*. Maloïne.
- [21]: Fournier, P. 1947. *Livre Des Plantes Médicinales et Vénéneuses de France*. Le chevali.
- [22]: Ciccarelli, D, F Garbari, and A.M Pagni. 2007. “Glandular Hairs of Theovary , a Helpful Character for Asteroideae (*Asteraceae*) Taxonomy Ann.” *Fennici* 44: 1–7.
- [23]: Halimi, A. 1997. *Les Plantes Médicinales En Algérie*.
- [24]: Baba Aissa, F. “Flore d’Algérie et de Magherb.” In *Encyclopédie Des Plantesutiles*, Librairiem, 2000. 252–53.
- [25]: Zeggwagh N-A., M-L. Ouahidi, A. Lemhadri et M. Eddouks.J. *Ethno.* “Journal of Ethnopharmacologie” 2006. 108: 223–227.
- [26]: WUNDERLIN, Al. 2017. “No Title.”
- [27]: Franco-Mican S.X., Castro J., Campos M..2008. Observation du complexe parasite del’inule visqueuse en Espagne, et ses méthodes de propagation. *Le Nouvel Olivier*, n°66, novdéc.2008.
- [28]: Warlop F. Limitation des ravageurs de l’olivier par le recours à la lutte biologique par conservation. *Cahiers Agriculture* .2006, vol. 15(5), pp. 449-455
http://www.john-libbeyeurotext.fr/fr/revues/agro_biotech/agr/edocs/00/04/1F/42/article.phtml
- [29]: Quezel P., Santa S. 1963. *Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques Méridionales*. Centre national de la recherche scientifique. Tome 2 pp 218-940
- [30]: Bezanger - Beau Quesne L., Pinkas M. 1986. *Les plantes dans la thérapeutique moderne* 2^{ème} édition MALOINE –Paris. Pp 68-262-268.
- [31]: Ait Youcef M., 2006. *Plantes médicinales de Kabylie*. Edition Ibis Press, Paris. 349p
- [32]: Reeb C., 2010. *Plantes mellifères, l’Inule visqueuse, Abeilles et Fleurs*.N°720.Université Paris VI : 19-20.
- [33]: Oka, Y, BH Ben-Daniel, and Y Cohen.. “Control of *Meloidogynejavanica* by Formulations of *Inulaviscosa*LeafExtracts La Mondia.” *Journal of Nematology*, 2006. 46–51.
- [34]: PAROLIN, P, M ION SCOTTA, and C BRESCH. “Biology of *Dittrichia Viscosa*, a Mediterranean Ruderal Plant: A Review.” *Nternational of Experimental Botany* .2014.83: 251–62.

- [35]: ULUBELEN, A, and S GOUN. "Sesquiterpene Acids from *Inula Viscosa*." In *Phytochemistry*, 1986.1223–24.
- [36]: Bensegueni-Tounsi, L. 2001. "Etude in Vitro de l'effet Antibactérien et Antiphagique de : *Inulaviscosa*-*Lawsoniainernis*- *Asphodelusmicrocarpus*- *Aloevera*- *Juniperusoxydrus*." Université de Constantine.
- [37]: Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Catalán, J. V., "Dittrichia viscosa L.Greuter: Phytochemistry and biological activity", *Natural Product Communications*, (2008), vol. 3,no 111934578X0800301110
- [38]: Messaoudi, M., Chahmi, N., El Mzibri, M., Gmouh, S., Amzazi, S., Benbacer, L., ElHassouni, M., "Cytotoxic effect and chemical composition of *Inula viscosa* from threedifferentregions ofMorocco", *EuropeanJournal of MedicinalPlants*,(2016):1-9.
- [39]: Haoui,I.E.,Derriche,R.,Madani,L.,Oukali,Z., "Analysisofthechemicalcomposition of essential oil from Algerian *Inula viscosa* (L.) Aiton", *Arabian Journal ofChemistry*, (2015): vol. 8, no 4, 587-590.
- [40]: Benchohra MA., Hamel L., Bendimered F.Z., Benchohra M.(2011). Chemicacomposition of essential oil of *Inula viscosa*. *ScienceLib Editions Mersenne*, 3.
- [41]: Brahmi-Chendouh, N., Piccolella, S., Crescente, G., Pacifico, F., Boulekbache, L.,Hamri-Zeghichi, S., Akkal, S., Madani, K., Pacifico, S., "A nutraceutical extract from *Inulaviscosaleaves*:UHPLC-HR MS/MSbasedpolyphenolprofile,andantioxidantandcytotoxicactivities",*journalof foodand drug analysis*, (2019): vol.27, no3:692-702.
- [42]:Chahmi,N.,Anissi,J.,Jennan,S.,Farah,A.,Sendide,K.,ElHassouni,M.,"Antioxidantactivities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions ofMorocco",*Asian Pacific Journal ofTropical Biomedicine*, (2015): vol. 5,no 3 :228-233.
- [43]: BENAYACHE, S., BANAYACHE, F., DENDOUGHI, H., JAY, M. Les Flavonoïdes d'*Inula viscosa* L. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 1991, 25(4), p. 170-176.
- [44]: HMAMOUCHE, M. Les plantes médicinales et aromatiques marocaines. 2ème édition Imprimerie Fédala (Mohammadia), 2001, 389 p.
- [45]: BELLAKHDAR, J. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine Arabe Ancienne et Savoirs Populaires. Editions Le Fennec, Casablanca: Ibis Press, 1997, 764 p. ISBN: 2-910728-03-X.
- [46]:EDDOUKS, M., MAGHRANI, M., LEMHADRI, A., OUAHIDI, M.L., JOUAD, H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the South-East region of Morocco (Tafilalet).*Journal of ethnopharmacology*, 2002, 82(2), p. 97-103.
- [47]:HERNÁNDEZ, V., RECIO, M.C., MÁÑEZ, S., GINER, R.M., RÍOS, J.L. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism.*Life sciences*, 2007, 81(6), p. 480-488.

- [48]: MÁÑEZ, S., HERNÁNDEZ, V., GINER, R.M., RÍOS, J.L., RECIO, M.DEL.C. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Fitoterapia*, 2007, 78(4), p. 329-331.
- [49]: LAURO, L., ROLIH, C. Observation and research on an extract of *Inula viscosa*. *Bollettino della Societa italiana di biologia sperimentale*, 1990, 66(9), p. 829-834.
- [50]: BSSAIBIS, F., GMIRA, N., MEZIANE, M. Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Revue de Microbiologie Industrielle, Santé et environnement*, 2009, 3, p. 44-55.
- [51]: MAOZ, M., NEEMAN, I. Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 71(3), 479–482.
- [52]: ZEGGWAGH, N.A., OUAHIDI, M.L., LEMHADRI, A., EDDOUKS, M.J. Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 2006, 108(2), p. 223-227.
- [53]: ALKOFABI, A., ATTA, A.H. Pharmacological Screening of the anti-ulcerogenic Effects of Some Jordanian Medicinal Plants in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999, 67(3), p. 341-345.
- [54]: SCHINELLA, G.R., TOURNIER, H.A., PRIETO, J.M., MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P., RÍOS, J.L. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life sciences*, 2002, 70(9), p. 1023-1033.
- [55]: BEN SASSI, A.B., HARZALLAH-SKHIRI, F., BOURGOUGNON, N., AOUNI, M. Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against Herpes simplex virus type 1. *Natural Product Research*, 2008, 22(1), p. 53-65.
- [56]: ROZENBLAT, S., GROSSMAN, S., BERGMAN, M., GOTTLIEB, H., COHEN, Y., DOVRAT, S. Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical pharmacology*, 2008, 75(2), p. 369-382.
- [57]: Reynaud, J., Lussignol, M. Free Flavonoid Aglycones from *Inula montana*. *Pharm. Biol.* 1999. 37, 163–164. <https://doi.org/10.1076/phbi.37.2.163.6079>
- [58]: J.-M. Tison, B. de Foucault, F. Guiol, eds., *Flora Gallica: flore de France*, Biotopie Éditions, Mèze, 2014.
- [59]: AGOU Pierre, COLLIN Pascal, JUILLARD Pierre, De LACLOS Eric, MONY Christophe, PROUDHON Carole, Contribution à l'étude de la flore bourguignonne, *Bull. Sci. Bourgogne*. 50 (2002) 5–9.
- [60]: DELAHAYE Thierry, MOUTON Gérard, PRUNIER Patrice, Complément (II) à l'inventaire commenté et liste rouge des plantes vasculaires de Savoie, *Bull. Société Mycol. Bot. Région Chambérienne*. (2008) 94–104.
- [61]: J.-M. Tison, P. Jauzein, H. Michaud, *Flore de la France méditerranéenne continentale*, Naturalia Publ, Turriers, 2014
- [62]: Le réseau des botanistes francophones, (2017). <http://www.tela-botanica.org/>.

- [63]: C. Obón, D. Rivera, A. Verde, J. Fajardo, A. Valdés, F. Alcaraz, A.M. Carvalho, *Arnica*: A multivariate analysis of the botany and ethnopharmacology of a medicinal plant complex in the Iberian Peninsula and the Balearic Islands, *J. Ethnopharmacol.* (2012) .144.44–56. doi:10.1016/j.jep.2012.08.024
- [64]: Rameau, J.-C., Mansion, D., Dumé, G., 1989. Flore forestière française: guide écologique illustré. Institut pour le développement forestier : Ministère de l’agriculture et de la forêt, Direction de l’espace rural et de la forêt : Ecole nationale du génie rural, des eaux et des forêts, Paris.
- [65]: Garayev, E., Herbette, G., Di Giorgio, C., Chiffolleau, P., Roux, D., Sallanon, H., Ollivier, E., Elias, R., Baghdikian, B. New sesquiterpene acid and inositol derivatives from *Inula montana* L. 2017. *Fitoterapia* 120, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.05.011>
- [66]: Gonzalez Romero M.A., Villaescusa Castillo L., Diaz Lanza A.M., Bartolome Esteban C., Fernandez Matellano L. Phytochemistry and pharmacological studies of *Inula montana*. *Recent Res. Dev. Phytochem.* 2001. 5, 255–268.
- [67]: Martín, T., Villaescusa, L., Gasquet, M., Delmas, F., Bartolomé, C., Díaz-Lanza, A.M., Ollivier, E., Balansard, G. Screening for Protozoocidal Activity of Spanish Plants. *Pharm. Biol.* 1998. 36, 56–62. <https://doi.org/10.1076/phbi.36.1.56.4627>
- [68]: Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Atik Bekkara, F. Phenolic contents and antioxidant activities in vitro of some selected Algerian plants. *J. Med. Plant Res.* 2014. 8, 1198–1207.
- [69]: Pasquier, B., Godin, M., 2014. L’arnica des montagnes, entre culture et cueillette. *Jard. Fr.* 19–21. Pauli, G.F., Kuczkowiak, U., Nahrstedt, A., Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. *Magn. Reson. Chem.* 1999. 37, 827–836
- [70]: Kriplani, P., Guarve, K., Baghael, U.S. *Arnica montana* L. - a plant of healing: review. *J. Pharm. Pharmacol.* 2017. 69, 925–945. <https://doi.org/10.1111/jphp.12724>
- [71]: Amir, Les cueillettes de confiance, édition Forcalquier, 1998.
- [72]: I. Teixidor-Toneu, G.J. Martin, A. Ouhammou, R.K. Puri, J.A. Hawkins, An ethnomedicinal survey of a Tashelhit-speaking community in the High Atlas, Morocco, *J. Ethnopharmacol.* (2016) .188 .96–110. doi:10.1016/j.jep.2016.05.009.
- [73]: Ogbemudia, F.O. and E.O. Thompson, Variation in Plants Secondary Metabolites and Potential Ecological Roles – A Review. *International Journal of Modern Biology and Medicine*, 2014. 5(3): p. 111-130.
- [74]: Zenk, M.H. and M. Juenger, Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 2007. 68(2007): p. 2757-2772.
- [75]: Elkolli, M., Cours : structure et activités des substances naturelles : principes et applications in *Ecologie microbienne*. 2017, Université Ferhat Abbas de Sétif. p. 65.
- [76]: Lemouchi, R., Valorisation de quelques plantes du Nord (Est et Ouest) Algerien: activités biologiques, caractérisation et spécificité des huiles essentielles., in

Biologie Végétale et Environnement. 2017, Université Badji Mokhtar - Annaba. p. 4-10.

[77]: Bouratoua, A., Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques des espèces algériennes *Athamanta sicula* L. et *Ferula longipes* Coss. ex Bonnier et Maury (Apiaceae), in Chimie pharmaceutique. 2018, Université des frères mentouri constantine 1. p. 29.

[78]: Bruneton, J., Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4 ed. Technique et Documentation. 2009. p. 1268.

[79]: Kim, K.-H., et al., Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 2006. 95(3): p. 466-473.

[80]: Gedir, J.V., P. Sporns, and R.J. Hudson, Extraction of condensed tannins from cervid feed and feces and quantification using a radial diffusion assay. *Journal of Chemical Ecology*, 2005. 31(12): p. 2761-2773.

[81]: Kansole, M., et al., Ethnobotany and Ethnopharmacognosy of Lamiaceae Species from Central Burkina Faso: *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia oppositifolia* Vahl and *Orthosiphon pallidus* Royle Ex Benth. *American Journal of Ethnomedicine*, 2015. 2(4): p. 219-232.

[82]: Zargham, H. and R. Zargham, Tannin extracted from Sumac inhibits vascular smooth muscle cell migration. *McGill journal of medicine : MJM : an international forum for the advancement of medical sciences by students*, 2008. 11(2): p. 119-123.

[83]: Doughari, J.H., et al., Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *Journal of Medicinal Plant Research*, 2009. 3(11): p. 839-848.

[84]: Heber, D., Multitargeted therapy of cancer by ellagitannins. *Cancer Letters*, 2008. 269(2): p. 262-268.

[85]: Hopkins, W.G., Physiologie végétale. 2 édition américaine, de Boeck et Lancier S A, Paris ed. 2013. p. 514.

[86]: Jedinak, A., et al., Approaches to flavonoid production in plant tissue cultures. *Biologia Bratislava*, 2004. 59(6): p. 697-710.

[87]: Leonard, E., Y. Yan, and M.A.G. Koffas, Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2006. 8(2): p. 172-181.

[88]: H. Koenig, *Gidede Mycologie Médicale*. Ed. Ellipses, Paris. ,(1995). p 284.

[89]: R. Grillot, *Les mycoses humaines : Démarche diagnostique*. Ed. Scientifiques et médicales Elsevier, Paris. (1996). p392,

[90]: V. Guillaume, *Mycologie*. Ed. de Boeck, Bruxelles, (2006). .p55.

[91]: Saffidine, K., "Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L.", Thèse de doctorat en sciences, Université

Ferhat Abbas Sétif 1, (2015).

[92]: Boubekri, C., "Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques", Thèse de doctorat en chimie, Université Mohamed Khider de Biskra, (2014).

[93]: Chira, K., Suh, J.H., Saucier, C., Teissèdre, P.L., "Les polyphénols duraisins", *Phytothérapie*, (2008): vol. 6, no 2, :75-82.

[94]: Subramanian, S., G. Stacey, and O. Yu, Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends in Plant Science*, 2007. 12(7): p. 282-285.

[95]: Igor, P.L.B., Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (Rutaceae), in Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie. 2003, Bamako. p. 33.

[96]: Medimagh-Saidana, S., et al., Synthesis and antimicrobial activity of novel coumarin derivatives from 4-methylumbelliferone. *Medicinal Chemistry Research*, 2015. 24(8): p. 3247–3257.

[97]: Wrolstad, R.E., R.W. Durst, and J. Lee, Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 2005. 16(9): p. 423-428.

[98]: J.J. Guilhou, O. Dereure, L. Marzin. Efficacy of Daflon 500 mg in venous leg ulcer healing: a double-blind, randomized, controlled versus placebo trial in 107 patients. *Angiology*. 1997. V. 48. PP.77-85.

[99]: Rafamantanana, M.H., Mise au point et validation de méthodes analytiques pour le contrôle de qualité de plantes médicinales malgaches et la mise en place de cultures locales, in *Sciences Pharmaceutiques et Biomédicales*. 2012, Catholique de Louvain. p.177.

[100]: Jin-Yao S, Cui-Yu Y, Kai D, Hai-Sheng Y, Jian-Feng X. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of 3,4-oxo-isopropylidene-shikimic acid. *Pharmaceutical Biology*. (2016). 54 (10): 2282- 2287.

[101]: Vanlalhrui I, Malsawmtluangi C, Lahlhenmawia H. Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of the spadix of *Colocasia affinis*. *science vision*. (2019). 19 (2): 30–34

[102]: YOUNGBARE-ZIEBROU, M.N, OUEDRAOGO, N, LOMPO, M, et al. Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*, 2015, vol. 14, p 213–219 .

[103]: Rousselet M.C ; Vignaud J.M ; Hofman P et Chatelet F.P. (2005). Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3).

[104]: Dyckaets C ; Fouret P ; Hauw J.J. (2003). Anatomie pathologique. Université Marie Curie.

[105]: [Revillard J.P. Immunologie. 4^{ème} édition, chapitre 14, Espagne, (2001). 595p.

[106]: Espinosa E., Chillet P. Immunologie. Ellipse édition, (2006). 511p.

[107]: Genet N. (1997). Immunologie. 37^{ème} édition. Chapitre 6: Les systèmes non spécifiques de

défense, la réaction inflammatoire et les autres moyens, ISBN : 2-7430-0158-5, Paris, France, p.221-230.

[108]: lesbiologistesmedicaux.fr/images/cahiers/2005-Bioforma-35-L'inflammation.pdf

[109]: Cavaillon J. Cytokines et inflammation. *J. Veterinary Research, Bio Med Central*, (1993). 24(C4):p.368-369.

[110]: Male D., Roitt Y., Brostoff J. (2007). Mécanisme de l'immunité innée. In: *Immunologie*. Edition: Elsevier Masson. France: 600.

[111]: Shimizu, T. (2009). Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as Therapeutic Targets for the Regulation of Immunity and Inflammation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49:123-150.

[112]: Vane J., Botting R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Faseb Journal*. (1987). 1(2): 89-96.

[113]: Delatour P., Benoit E., Bourdin M., Gobron M., Moysan F., Polonovski J., Aron E., Cara M., et Auquier L. Enantio sélectivité comparée de la disposition de deux anti-inflammatoires non stéroïdiens, le kétoprofène et le carprofène, chez l'homme et l'animal. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, (1993). 177(3):p.515-527.

[114]: Ferradji A. (2011). Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*. Thèse de magister en biochimie. Université Ferhat Abbas – Setif, Faculté de Science de la vie et de l'anature, Alger : 90.

[115]: Mezzoug N., Elhadri A., Dallouh A., Amkiss S., Skali N.S., Abrini J., Zhiri A., Baudoux D., Diallo B., et El Jaziri A. Investigation of the mutagenic and antimutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, (2007). 629(2) :p.100-110.

[116]: Govindappa M., Naga Sravya S., Poojashri M.N., Sadananda T.S., et Chandrappa C.P. Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity of ethanolic extract and active phytochemical screening of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, (2011). 3(3):p.43-51.

[117]: Bourkhiss M., Hnach M., Paolini J., Costa J., Farah A., Satrani B. Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (VAHL) masters du Maroc. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, (2010). 79 :141 – 154.

[118]: Barros L., Heleno S.A., Carvalho A.M., Ferreira I. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolic. *Food and Science Technology*, (2010). 143(3): 544–550.

[119]: Boffa G.A., Jacquot-Armand Y., Fine J.M. Constantes de sédimentation, caractères électrophorétiques et immunologiques de deux protéines isolées du sérum de rat: L'albumine et L' α 1-macroglobuline. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), General Subjects*, (1994). 86: (3): 511-518.

- [120]: El Kalamouni C. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées: Institut National Polytechnique de Toulouse; 2010.
- [121]: Naima b. Etude de la composition polyphénolique et de certaines activités biologiques des extraits de quelques plantes médicinales de la famille des Ericacées (Erica et Arbutus unedo): université Abderrahman Mira de Bejaia; 2017.
- [122]: HERIZ Nejia. Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse) ; 2013.
- [123]: BOUDJOUREF Mourad. Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campestris L: Ferhat Abbas Sétif; 2011.
- [124]: Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G. Drogen E-O. Berlin : Springer-Verlag, p399-404, 1993.
- [125]: K. Anikumar [Enseigner la formulation chimique] Vangelis Antzoulatos 2015.
- [126]: M. P. RODRIGUEZ ROJAS: Emulsification en cuve agitée, thèse de l'université l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 2007.
- [127] : Olivier Doumeix: Opérations unitaires en génie biologique. 1. Les émulsions
- [128] : CABANE BERNARD: liquides: solution, dispersion, émulsion, gels. 2003 : [ch 15, p 240-243]. édition Dunod, Paris.
- [129]: Eléonore Bouyer a,b, Ghazlene Mekhloufi a,b, Véronique Rosilio a,b, Jean-Louis Grossiord a,b, Florence Agnely a,b : Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?; International Journal of Pharmaceutics.
- [130]: Julie GUERY : émulsions doubles cristallisables: stabilité, encapsulation et relargage; thèse de doctorat de l'université Paris VI 2006
- [131]: R. KUMAR, M.S. KUMAR, N. MAHADEVAN: multiple emulsions: a review, International Journal of Recent Advances in Pharmaceutical Research, 2012.
- [132]: E.A. PARUTA TUARAZ: émulsion inverse très concentrées, thèses de l'université de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 2010;
- [133]: HANSMOLLET, ARNOLD GRUBENMANN: formulation technology: emulsion, suspensions, solid forms (chap 2, p 63); Wiley-VCH, 2001
- [134]: DESTRIEUX M., « Emulsions stabilisées par des particules colloïdales stimulables : propriétés fondamentales et matériaux », Thèse de doctorat : Chimie-Physique : Université Bordeaux 1, (2010).
- [135]: DOUMEIX O., « Les opérations unitaires en génie : les émulsions biologiques. CRDP
- [136]: GUADALUPE VACAMEDINA: élaboration des émulsions natives issues des graines de soja

oteagineuses et transformation catalytique de la fraction lipidique en bio-lubrifiant secolabellisable, thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, 2010;

[137]: KDJALLOUL: cours de pharmacie galénique tome I, Edition opu, 1989.

[138]: KASSAD., « Etude d'une émulsion à visée anti-inflammatoire destinée à la voie orale », Thèse de doctorat: pharmacie: Université d'Alger, (1991).

[139]: ROJASM., « Emulsification en Cuve Agitée: Rôle du Protocole Opérateur sur l'Inversion de Phase Catastrophique », Thèse de doctorat: Génie de Procédés et de l'Environnement: école doctorale à Toulouse, (2007).

[140]: T .D. DIMITROVA, T D. GURKOV, N VASSILEVA kinetics of cream formation by the mechanism of consolidation in flocculating emulsions, journal of colloid and interface science, 2000.

[141]: M.BONNET: libération contrôlée du magnésium par des émulsions doubles : impact de paramètres de formulation, thèse de l'université l'université bordeaux 1, 2008.

[142]: T.FELICIE: conception et mise en oeuvre d'un procédé intensifié continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale, thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, 2009.

[143]: FOUILLOUXS., « Nanoparticules et microfluidique pour un système modèle d'émulsions de Pickering. Etude des mécanismes de stabilisation et déstabilisation », Thèse de doctorat: Physique et Chimie des Matériaux: Université Pierre et Marie Curie, (2011).

[144]: D.N.PETSEV: emulsion: structure, stability and interactions. 2004: [chap 09, p 353; 354], Elsevier.

[145]: M. Rosen: « Surfactants and Interfacial Phenomena », 3rd Ed., Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2004.

[146]: KHELIL S. « Etude de l'efficacité d'utiliser un tensioactif comme émulsifiant pour le lavage des sols contaminés par les hydrocarbures », Mémoire de Master académique: Raffinage et technologies des hydrocarbures : Université KASDIMERBAHOU ARGLA, (2012).

[147]: préparations d'émulsions par inversion de phase induite par agitation, thèse d'université Henri Poincaré-Nancy 1 2010.

[148]: Gibbs: J.W. The collected work of J.W. Gibbs. Longman's, Green, (1931).

[149]: K.TEIXEIRA DA SILVA DE LA SALLES: approche thermodynamique et cinétique de l'extraction à deux phases aqueuses à l'aide de tensioactifs non ioniques, thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, 2004.

[150]: JEAN-LOUIS SALAGER: surfactifs: types et usages, cahier firp n°f300-a, université des Andes, version 2 (2002).

[151]: A. BOUMENIR: effet de l'interaction des tensioactifs sur la stabilité d'une émulsion multiple. Mémoire de C.U. médea -2002.

- [152]:CHLOÉGIARDI:synthèsedesurfsactifsàbasedepolyoxazolinepropriétésphysicochimique setformulation,thèsesdel'écolenationalesupérieuredechimiedeMontpellier,2011
- [153]:BROCHETTE P., « Emulsification : Elaboration et étude des émulsions», Technique del'ingénieur,traitégéniedesprocédés,J2150:1-18,(1999).
- [154]: Y. Bar-Cohen, Electroactive polymer (EAP) actuators as artificial muscles-reality potential and challenges, SPIE Press (2001).
- [155]: Y. Osada, J.P. Gong, Y. Tanaka, Polymer gels, Journal of macromolecular science Part CPolymer reviews 44 (2004) 87–112.
- [156]: M. Barrow, McGraw-Hill, Physical chemistry, Gordon 4th Edition (1979)
- [157]: P.J. Flory, Principles of polymer chemistry; Cornell University Press: Ithaca, NY (1953).
- [158]: G. Miquelard-Garnier, Synthèse et propriétés mécaniques d'hydrogels polyélectrolytes modifiés par des groupements hydrophobes, Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie (2007).
- [159]: [Durand 1990] D. Durand, "Les réseaux macromoléculaires et les gels", Groupe français d'étude et d'application des polymères, 1990 : chap 5, 121-182.
- [160]: Kullar R, Saini S, Steth N, Rana AC. Emulgel a surrogate approach for topical used hydrophobic drugs. Int J Pharm Biol Sci 2011;1:117-28.
- [161]: Single V, Saini S, Joshi B, Rana AC. Emulgel: a new platform for topical drug delivery. Int J Pharm Biol Sci 2012;3:485-98.
- [162]: Stan-Posthuma JJ, Vink J, Le Cessie S, Bruijn JA, Bergman W, Pavel S. Topical tretinoin under occlusion on a typical navei. Asian J Pharm Clin Res 1998;8:539-48.
- [163]: Mohamed MI. Optimization of chlorphenesin emugel formulation. AAPS J 2004;6:81-7.
- [164]: Mishra AN. Controlled and novel drug delivery. 4th ed. CBS Publisher and Distributers, Delhi; 1997. p. 107-9.
- [165]: Swarbrick J. Encyclopedia of pharmaceutical technology. 3rd ed. Vol. 1. Informa Healthcare; 2007. p. 1311-23
- [166]:l'Europe,C.d.(2008).Pharmacopéeeuropéenne6èmeÉdition,Conseilde l'Europe.
- [167]:Ali, A., S. Kazmi, et al. "Medicament Release from Suppository Bases: III.Ibuprofen-PhysicochemicalCharacteristicsandBioavailabilitéinRabbits."DrugDevelopmentandIndustrial Pharmacy .(1982). :8(3):411-428.
- [168]:Gazengel,J.-M.andA.-M.Orecchioni(2013)."Lepréparateur enpharmacie."éditionLavoisier
- [169]: Le Hir, A. and M. Janot (2001). "Pharmacie galénique (bonnes pratique de fabricationdesmédicaments)."Abrégés de pharmaci

- [170]: Ramtani, S., C. Madi, et al. (2014). Elaboration d'un suppositoire à base de PCL/PEG chargé d'ibuprofène, Université de Bejaia.
- [171]: E. Montagnac (2010-2011). Galénique formes pharmaceutiques
- [172] : JAMINET, F. (1973). "Aspects biopharmaceutiques de la formulation des suppositoires dans „Les suppositoires" de Guillot B Ret Lombard AP." Maloine SA Paris.
- [173]: Kaloustian, J. and F. Hadji Minaglou (2013). La connaissance des huiles essentielles: qualité et aromathérapie: Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée, Springer Science & Business Media
- [174]: Allo, O., P. Blanc, et al. (2005). Pharmacie galénique BP, Wolters Kluwer France.
- [175]: S14, B. "Pharmacie Galénique" Chapitre V les excipients
- [176]: DENINE, R. (2014). "pharmacie Galénique".
- [177]: Alexandre, M., 2017. Optimization of mechanical behavior of PEKK / Carbon fibers structural composites by PEKK oligomers sizing.
- [178]: Luque-Garcia J.L and Luque de Castro M.D. Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: An expeditive approach for solid sample treatment-Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. Journal of Chromatography A 1034: (2004). 237-242.
- [179]: Petko Ivanov PENCHEV, "Etude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions", thèse de doctorat en génie des procédés et de l'environnement, université de TOULOUSE, le 20/07/2010
- [180]: Chemet F., Zill-e-Hume H., Khan M.k. (2011). Ultrason. Sonochem. 2011, 18, 813-835.
- [181]: Poux M., Cognet P et Gourdon C. (2010). Génie de procédés durables, du concept à la caractérisation industrielle. L'usine nouvelle, Dunod, Paris, ISBN 978-2-10-051605-6.
- [182]: Benamor. (2008). Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée dic. Thèse de doctorat. Université de la Rochelle. 207p.
- [183]: Penchev P.I (2010). Etude Des Procédés D'extraction et de Purification de Produits Bioactifs A Partir de Plantes Par Couplage de Techniques Séparatives A Basses et Hautes Pression. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.
- [184]: Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G. et Rakesh, D, D. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. ICS-UNIDO. p 23-24.
- [185]: Trease G.E., Evans W.C., 1989: A textbook of Pharmacognosy (13th edition) Bacilluere Tinal Ltd, London. 1994.
- [186]: Harbone J.B., : Phytochemical Methods : A guide to moderne techniques of plant

analysis 3e ed. :chapman and hill. 1998.303p.

[187]: Trease G.E., Evans W.C. (1989). A textbook of pharmacognosy. 13 th Ed bacilluere tinal ltd, London.

[188]: Harborne J.B. (1998). Phytochemical methods : A guide to modern techniques of plant analysis. 3ème Ed. 203-234, chapman et hall Thomson science (uk).

[189]: Houghton, P., J. et Raman, A., « Laboratory handbook for fractionation of natural extracts». Edition Springer, 1998, 199p.

[190]: Pharmacopée URSS, Tome II, 11eme édition, Moscou, (1991), 250 p.

[191]: TREASE E. et EVANS W C. (1987). Pharmacognosie, Billiaire Tindall, London. 13th Ed, pp: 61- 62.

[192]: V.L.Singleton , R.Orthofer , R.M.Lamuella-Raventos, "Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent" Methods Enzymol., 1999, Vol. (299), page: 152.

[193]: V.L.Singleton, J.R.Rossi, "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid" Am. J. Enol. Vitic, 1965, Vol. (16), page : 144.

[194]: Jia, Z., Mengcheng, T., Jianming,W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. 1999. Food Chemistry 64, 555–559.

[195]: H.P.S.Makkar, "In Quantification of tannins in tree foliage" Working document, FAO/IAEA, Vienna, 2000.

[196]: P.Schofield, D.M. Mbugua, A.N.Pell, "Analysis of condensed tannins" a review. Anim. Feed Sci. Technol. 2001, Vol. (91), page : 21.

[197]: B.Sun, , JM.Richardo-da-Silvia, , I.Spranger, "Critical factors of vanillin assay forcatechins and proanthocyanidins" J. of Agriculture and Food Chemistry,1998, Vol. (46),page : 4267.

[198]: R.Julkunen-Titto, "Phenolic constituents in the leaves of northem wiliows methods forthe analysis of certain phenolics" Journal of Agricultural and Food chemistry,1985, Vol.

[199]: Adrach verma, M., Ajay Kumar, P., Kavitha, D., Aurag, K.B. Antidenaturation and antioxidant activity of Annon cherimola in vitro. International-Journal of Pharma and Bio Science, (2011). 2 (2): 1-6.

[200]: Anderson, J.N. (2013). p: 39. Modern Bio Series. West Lafayette, Indiana.

[201]: Mondal R. D., Banerjee A., Bala A., Sengupta A. Avicennia Alba: The New phytochemical weapon to fight against acute inflammation. International Journal of Pharmacology. (2015). 2(5) :6-12

[202]: COLOT.M .1972 ; Notions thechniques de pharmacologie generals edition Masson

[203]: Sánchez-Moreno, C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food science and technology international*, (2002). 8(3), 121-137.

[204]: Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J. Sci. Technol*, (2004). 26(2), 211-219.

[205]: *Handbook of Pharmaceutical Excipients 6th Edition*, 2009

[206]: Saoudi, N., Z. Talantikite, et al. (2014). Formulation et évaluation d'un suppositoire de camptothécine, Université Abderrahman Mirabéjaia.

[207]: Le Hir, A. and M. Janot (2001). "Pharmacie galénique (bonnes pratiques de fabrication des médicaments)." *Abrégés de pharmacie*.