

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE BLIDA 1

Faculté De Technologie

Département Génie des procédés



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat LMD en Génie Des Procédés

Spécialité : Génie Pharmaceutique

Développement de nanosystèmes pour la délivrance de principes actifs par voie transdermique

Présentée par : Timizar Zineb

Y. DAGHBOUCHE	Professeur	Université Blida 1	Présidente
R. HAMMOUDI	Professeur	Université de Ouargla	Examinatrice
I. RAHIM	MCA	Université de Blida 1	Examinatrice
A. HADJ-ZIANE	Professeur	Université Blida 1	Directrice de thèse
K. BOUTEMAK	Professeur	Université Blida 1	Co-directrice de thèse

Blida 2025

ملخص:

يشيع استخدام *Teucrium polium L* خياطة الجراح كنبات طبي في الجزائر ضد مجموعة متنوعة من الأمراض التي تصيب الإنسان.

تعتبر المستخلصات والزيوت العطرية لنوع *Teucrium polium L* مركبات تستخدم في العديد من المجالات مثل مستحضرات التجميل والعلاج بالروائح العطرية وعلم الأمراض النباتية. وتستخدم المركبات الموجودة في هذه المستخلصات أو الزيوت العطرية في صياغة النظم النانوية الجديدة، والتي تتوسع حالياً بشكل سريع. ومع ذلك، فإن تغلغل هذه المركبات وامتصاصها في الجسم محدود للغاية، وتحتاج إلى أن تكون مستقرة في مصفوفة لتسهيل إطلاقها.

يتمثل الهدف الرئيسي من هذا العمل في تغليف المستخلص الإيثانولي والزيوت العطرية في مستحلبات نانوية (وضع متقدم) ودمجها في رقع من أجل تحديد مدى ملاءمتها للتطبيق عبر الجلد.

يكرس هذا العمل لاستخلاص المركبات النشطة من *Teucrium polium L*، ولا سيما المستخلص الإيثانولي الذي يعطي محصولاً بنسبة 2.2% باستخدام تقنية سوكليت واستخلاص الزيت العطري الذي يسجل محصولاً بنسبة 22.2% باستخدام جهاز clevenger. حدد التوصيف الكيميائي النباتي مجموعة متنوعة من المركبات، مثل البوليفينول، والفلافونويد، والعفص، والسابونوسيدات، والقلويدات. وكشف التحليل الكمي باستخدام طريقة القياس اللوني أن المستخلص كان غنياً بالفلافونويدات الكلية 2.02 ملغم مكافئ/غم من مستخلص البوليفينول الكلي 220.22 ملغم من مكافئ/غم من مستخلص. قمنا بدراسة تركيبة المستخلص الإيثانولي بمزيد من التفصيل عن طريق تحليل LC-MS/MS، حيث قمنا بتحليل بيانات مفصلة للمركبات الفينولية، مع تحديد ستة مركبات فلافونويدات باعتبارها المكونات الرئيسية للبوليفينول. تم الحصول على تركيبة الزيت العطري

عن طريق تحليل GC-MS والمكونات الرئيسية التي تم تحديدها كانت : Germacrène D (37.68%), Bicyclogermacrene (11.87%) suivis du Spathulenol (4.75%), 14-hydroxy-9-epi-trans- caryophyllène (4.36%), epi- α - Muurolol (3.78%) et δ -Cadinène (3.22%)

لتقييم إمكانات المستخلص الإيثانولي المضادة للأكسدة، استخدمنا طريقة (DPPH) وطريقة القوة المختزلة لمضادات الأكسدة الحديدية (FRAP)، مع استخدام حمض الأسكوربيك وهيدروكسيبتولون بوتيلاتيك (BHT) كمعايير. أظهر المستخلص نشاطاً معتدلاً في طريقتي 2،2-ثنائي الفينيل-8-بيكريل هيدرازيل (DPPH) و FRAP بتركيزات 24 ميكروغرام/مليلتر و 28 ملغم/مليلتر على التوالي. بالإضافة إلى ذلك، قمنا بتقييم القدرة المضادة للأكسدة للزيت العطري باستخدام طريقة DPPH، وأظهر الزيت العطري نشاطاً معتدلاً بتركيزات 2 ميكروغرام/ملتر، وتم اختبار المستخلص الإيثانولي والزيوت العطرية ضد البكتيريا المختلفة باستخدام تقنية الانتشار القرصي على وسط آجار. وأشارت النتائج إلى أن المستخلص الإيثانولي والزيوت الأساسية لـ *Teucrium polium L* كان لهما فعالية معتدلة ضد البكتيريا سالبة الجرام مثل بكتيريا الزائفة الزنجارية ATCC 9027 والإشريكية القولونية ATCC 8739، وكذلك البكتيريا موجبة الجرام مثل المكورات العنقودية الذهبية ATCC 6538 والعصية الرقيقة ATCC 6633. وقد أعطتنا تركيبة المستحلبات النانوية القائمة على المستخلص الإيثانولي والزيوت الأساسية حجم جسيمات بحجم 22 نانومتر و 24 نانومتر مع جهد زيتا 42.2 ملي فولت و 2 ملي فولت على التوالي، مع مؤشر تعدد التشتت أقل من 8. كانت الرقع المنتجة ذات مقاومة جيدة للطبي وسمك موحد، وأكدت أطياف FTIR وجود المركبات المغلفة. أعطت دراسة انتشار المادة الفعالة إطلاقاً مطوياً ومضبوطاً من خلال الرقع، وأظهر نشاط الشفاء الذي تمت دراسته على فئران ويستار تحسناً ملحوظاً في انكماش الجروح باستخدام الرقع والمستحلبات النانوية مقارنةً بالضوابط.

تظهر هذه النتائج أن المستحلبات النانوية واللصقات النانوية عبر الجلد القائمة على نبات *Teucrium polium L* توفر طريقة فعالة لتوصيل المكونات النشطة مع خصائص واعدة مضادة للأكسدة ومضادة للبكتيريا وشفاء الجروح.

الكلمة المفتاحية: تيوكريوم بوليوم، ل نشاط التئام الجروح، مستحلب نانوي، رقعة، توصيل عبر الجلد.

Abstract :

Teucrium polium L is commonly used as a medicinal plant in Algeria to treat a variety of human ailments.

Extracts and essential oils of *Teucrium polium* L are compounds used in a wide range of fields, including cosmetics, aromatherapy and plant pathology. The compounds in these extracts or EOs are used in the formulation of new nanosystems, which are currently expanding rapidly. However, the penetration and absorption of these compounds in the body are very limited, and they need to be stabilised in a matrix to facilitate their release.

The main aim of this work is to encapsulate the ethanolic extract and essential oil in nanoemulsions (an advanced mode) and incorporate them into patches in order to determine their suitability for transdermal application.

The present work is devoted to the extraction of the active compounds of *Teucrium polium*, in particular its ethanolic extract which gives a yield of 20.6% using the Soxhlet technique and the extraction of the essential oil which records a yield of 0.66% using a Clevenger apparatus. Phytochemical characterisation identified a variety of compounds, such as polyphenols, flavonoids, tannins, saponosides and alkaloids. Quantitative analysis using the colorimetric method revealed that the extract was rich in total flavonoids (20.78 mg EQ/g DW extract) and total polyphenols (227.43 mg GAE/g DW extract). We studied the composition of the ethanolic extract in more detail by LC-MS/MS analysis, establishing a detailed profile of phenolic compounds, with six flavonoids identified as the main polyphenolic constituents. The composition of the essential oil was obtained by GC-MS analysis and the main components identified were : Germacrene D (37.68%), Bicyclogermacrene (11.87%) followed by Spathulenol (4.75%), 14-hydroxy-9-epi-trans-caryophyllene (4.36%), epi- α - Muurolol (3.78%) and δ -Cadinene (3.22%). To assess the antioxidant potential of the ethanolic extract, we used the DPPH method and the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method, with ascorbic acid and butylated hydroxytoluene (BHT) as standards. The extract showed moderate activity in the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and FRAP methods at concentrations of 65 μ g/mL and 21 mg/mL, respectively. In addition, we evaluated the antioxidant potential of the essential oil using the DPPH method, the EO showed moderate activity at concentrations of 06 μ L/mL, the ethanolic extract and the EO were tested against various bacteria using the disk diffusion technique on agar medium. The results indicated that *T. polium* extract and EO had moderate efficacy against Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Escherichia coli* ATCC 8739, as well as Gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. The formulation of nanoemulsions based on ethanolic extract and HE gave us a particle size of 42 nm and 65nm with a zeta potential of 53.2 mV and 30mV respectively, with a polydispersity index

of less than 1. The patches produced had good folding resistance and uniform thickness, and the FTIR spectra confirmed the presence of the encapsulated compounds. The study of the diffusion of the active ingredient gave a prolonged and controlled release through the patches and the healing activity studied on Wistar rats showed significantly improved wound retraction with the patches and nanoemulsions compared with the controls.

These results show that transdermal nanoemulsions and patches based on the plant *Teucrium polium L* offer an effective method for delivering active ingredients, with promising antioxidant, antibacterial and wound-healing properties.

Keywords: *Teucrium polium L*, healing activity, , nanoemulsion, patch, Transdermal delivery.

Résumé :

Teucrium polium L est communément utilisée comme plante médicinale en Algérie contre une variété de pathologie humaine.

Les extraits et l'huile essentielle de l'espèce *Teucrium polium L* sont des composés utilisés dans de nombreux domaines comme, la cosmétique, l'aromathérapie ou la phytopathologie. Elle est utilisée pour traiter différents états pathologiques tels que les troubles gastro-intestinaux, les inflammations, les infections bactériennes, l'accélération de la cicatrisation des blessures et des plaies, le diabète et les rhumatismes. Néanmoins la sensibilité des extraits de plantes aux facteurs externes constitue un obstacle majeur pour leur utilisation comme principes actifs dans les médicaments, ce qui a incité les chercheurs à s'orienter vers des moyens de protection de ces composés. Les composés de ces extraits ou HE participent notamment à la formulation de nouveaux nanosystèmes qui sont actuellement en pleine expansion. Cependant, la pénétration et l'absorption de ces composés dans l'organisme qui sont très limitées, il faut les stabiliser dans une matrice de façon à faciliter leur relargage.

L'objectif principale de ce travail est d'encapsuler l'extrait éthanolique et l'huile essentielle dans les nanoémulsions, (une approche innovante), et les incorporer dans des patchs vise à déterminer ses intérêts pour une application transdermique.

Le présent travail consacré à l'extraction des composés actifs de *Teucrium polium*, notamment son extrait éthanolique qui donne un rendement de 20.6% en utilisant la technique de Soxhlet et l'extraction de l'huile essentielle qui enregistre un rendement de 0.66% à l'aide d'un appareil de Clevenger. La caractérisation phytochimique a identifié une variété de composés, tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, et les alcaloïdes. Lors d'une analyse quantitative utilisant la méthode colorimétrique, on a constaté que l'extrait était riche en flavonoïdes totaux (20,78 mg équivalent QE/g d'extrait) et en polyphénols totaux (227,43 mg équivalent GAE/g extrait). On a étudié plus en détail la composition de l'extrait éthanolique par analyse LC-MS/MS, établissant un profil détaillé des composés phénoliques, avec six flavonoïdes identifiés comme les principaux constituants polyphénoliques. La composition de l'huile essentielle a été obtenue par l'analyses GC-MS et les principaux composants identifiés sont : la Germacrène D (37.68%), le Bicyclogermacrene (11.87%) suivis du Spathulenol (4.75%), 14-hydroxy-9-epi-trans-caryophyllène (4.36%), epi- α - Muurolol (3.78%) et δ -Cadinène (3.22%). Pour évaluer le potentiel antioxydant de l'extrait éthanolique, on a utilisé la méthode du DPPH et la méthode du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP), avec l'acide ascorbique et l'hydroxytoluène butylé (BHT) comme standards. L'extrait a montré une activité modérée dans les méthodes 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et FRAP à des concentrations de 65 μ g/mL et 21 mg/mL, respectivement. De plus, on a évalué le potentiel antioxydant de l'huile essentielle en utilisant la méthode du DPPH, l'HE a montré une activité modérée à des concentrations de 06 μ L/mL. L'extrait éthanolique et l'HE ont été testé contre diverses bactéries en utilisant la technique de diffusion sur disque sur milieu gélose.

Les résultats ont indiqué que l'extrait et l'HE de ***T. polium*** avaient une efficacité modérée contre les bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 et *Escherichia coli* ATCC 8739, ainsi que contre les bactéries à Gram positif comme ***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027** et ***Escherichia coli* ATCC 8739**, ainsi que contre les bactéries à Gram positif comme ***Staphylococcus aureus* ATCC 6538** et ***Bacillus subtilis* ATCC 6633**.

A l'heure actuelle ou de nouvelles prospections au niveau de l'organisme et la conception de nouveaux équipements d'analyses ont concouru à la recherche de nouvelles formulations, les micros et les nanoparticules permettant d'une part de protéger le PA et d'améliorer les conditions de sa conservation et d'autre part d'avoir une concentration précise et utile de ce principe actif au sein de l'organisme et de cibler d'une manière très judicieuse les cellules visées. La conception et la préparation des nanoémulsions ont suscité un vif intérêt dans les applications pharmaceutiques en raison de leur structure chimique et physique ajustable, de leur libération contrôlée, de leur avantage par rapport aux formes conventionnelles. La formulation des nanoémulsions à base de l'extrait éthanolique et l'HE nous a donné une taille des particules de 42 nm et 65nm avec un potentiel zêta de 53.2 mV et 30mV respectivement, avec un indice de polydispersité inférieure à 1, les patchs élaborés ont une bonne endurance au pliage et épaisseur uniforme.

Les spectres FTIR confirment la présence des composés encapsulés. L'étude de la diffusion du principe actif a révélé une action prolongée et contrôlée à travers les patchs, ainsi que l'activité cicatrisante étudiée sur des rats Wistar a démontré une rétraction significative des plaques en utilisant des patchs et des nanoémulsions par rapport aux témoins.

Ces résultats montrent que les nanoémulsions et les patchs transdermiques à base de la plante ***Teucrium polium L*** offrent une méthode efficace pour la délivrance de principes actifs, avec des propriétés antioxydante, antibactérienne et cicatrisante prometteuses.

Mots clés : *Teucrium polium L*, activité cicatrisante, Nanoémulsion, patch, Délivrance transdermique.

Remerciement

الحمد لله الذي هدانا لهذا وما كنا لنهتدي لولا أن هدانا الله.

Louange à Allah, le très puissant, clément et miséricordieux de m'avoir aidé durant toute ma vie et qui m'a donné la force et la patience nécessaires pour réaliser ce modeste travail.

J'adresse mes sincères remerciements à ma directrice de thèse Professeur **HADJ-ZIANE.A**, Pour l'intéressant sujet qu'il m'avait proposé et qui n'a cessé de m'orienter et m'appuyer à chaque étape ; c'est par sa disponibilité, ses conseils précieux et son aide que ce travail s'est concrétisé.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude et toute ma reconnaissance à ma Co-promotrice professeur **BOUTEMAK.K**, d'avoir accepté de suivre ce travail avec bienveillance et intérêt, je vous remercie pour vos conseils et vos orientations.

J'exprime mes plus sincères remerciements à professeur **DAGHBOUCHE. Y**, pour avoir accepté de présider le jury de ma soutenance et pour le temps qu'elle a consacré à ma recherche.

Je tiens à remercier également madame **HAMMOUDI.R** professeur à université de Ouargla et madame **RAHIM.I** maître de conférence à université de Blida pour l'honneur qu'il me fait d'être dans mon jury de thèse et d'avoir accepté la lourde tâche de lire et d'examiner l'intégralité de ce manuscrit.

Je tiens à remercier particulièrement professeur **LARIBI.H** pour toutes nos discussions, pour son aide précieuse et ses conseils qui m'ont accompagné tout au long de mon cursus.

Je remercie aussi tout le personnel des laboratoires madame Zahira, Karima, Meriem, Nesrine, Nassima, monsieur Rachid et Taher, pour leurs aides, leurs sympathies et leurs soutiens sur le plan scientifique ou humain.

J'adresse ensuite mes remerciements les plus sincères à mes chères parents, mes sœurs mon frères et mon mari, pour leur patience, leur soutien, vous étiez toujours à côté de moi dans les moments difficiles pour m'écouter, me soutenir, me reconforter et m'encourager

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme et donc j'exprime, en quelques mots, ma profonde gratitude et reconnaissance pour tous ceux qui participent ou contribuent à ma réussite, soit par leurs conseils, par leur confiance, par leur soutien et leur amour, je vous remercie.

Dédicace

Avec une énorme joie, je dédie ce travail à ceux que j'aime et qui sont très chers à mon cœur :

A la plus belle bougie de ma vie qui a éclairé ma vie depuis ma naissance à ce jour, avec sa lumière douce j'ai pu parcourir ce chemin sous ses conseils et ses orientations ; « Maman, Je t'adore », tu resteras ma joie de vivre et ma raison d'être.

A mon très cher père qui n'a jamais cessé de veiller à mon instruction et mon éducation et de m'encourager au cours du long chemin de mes études ; « Papa, Merci beaucoup »

A ma grande mère qui m'a toujours aidée avec ses prières pour moi.

A mes adorables sœurs qui veillent à mon bonheur : Hadjer, Manel et Sarah.

A mon petit prince, mon frère Ayoub.

A mes nièces, Kaouther loujaine, Aroua khouloud et mon neveu Abdellah.

A mon mari Oussama, pour son encouragement et sa compréhension.

A l'âme de mes sœurs : Baya et Ibtiem.

Tous ceux qui m'aiment et que j'aime trouveront ici l'expression de ma plus profonde gratitude.

A vous tous Merci

Table des matières :

Résumé	
Remerciement	
Dédicace	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Abréviation	
Introduction générale	1
<i>Chapitre I : Teucrium polium L</i>	
I.1. Introduction	4
I.2. Plantes médicinales	4
I.3. Composition des plantes médicinales	4
I.3.1. Métabolites primaires	5
I.3.2. Métabolites secondaires	5
I.4. Présentation du genre <i>Teucrium polium L</i>	5
I.5. Noms vernaculaire	6
I.6. Habitat et distribution géographique de <i>Teucrium polium L</i>	6
I.7. Description botanique de <i>Teucrium polium L</i>	7
I.8. Position systématique	8
I.9. Données phytochimique de <i>Teucrium polium L</i>	8
I.10. Propriétés thérapeutiques et pharmacologiques	9
<i>Chapitre II : Peau, plaie et cicatrisation</i>	
II.1. Introduction	12
II.2. La peau	12
II.3. Anatomie de la peau	12

II.4. Les plaies	17
II.4.1. définition de la plaie	17
II.4.2. Classification des plaies	17
II.4.3. Types des plaies	18
II.5. La cicatrisation	19
II.5.1. Définition de la cicatrisation	19
II.5.2. Les différentes modes de cicatrisation	19
II.5.3. Les processus fondamentaux de la cicatrisation	20

Chapitre III : Formes transdermiques

III.1. Introduction	23
III.2. Définition des nanoémulsions	23
III.3. Les différents types de nanoémulsions	23
III.3.1. Nanoémulsion simple... ..	24
III.3.2. Nanoémulsion multiples	24
III.4. Propriétés physico-chimiques des nanoémulsions	24
III.5. Formulation des nanoémulsions	25
III.5.1. Méthode d'émulsification à haute énergie... ..	25
III.5.2. Méthode d'émulsification à faible énergie	27
III.6. Mécanisme de déstabilisation	29
III.6.1. Murissement d'Ostwald	29
III.6.2. Agrégation des gouttelettes	29
III.7. Contrôle de la stabilité... ..	30
III.8. Définition des patchs transdermiques	31
III.9. Délivrance transdermique des médicaments	32

III.10. La diffusion transdermique.....	32
III.11. Intérêt de la voie transdermique... ..	33

Chapitre IV : Matériels et Méthodes.

IV.1. Introduction	35
IV.2. Matériel végétal.....	35
IV.2.1. La récolte de la plante	35
IV.2.2. Préparation des échantillons.....	35
IV.3. Procédé d'extraction de la fraction éthanolique	36
IV.3.1. Extraction avec l'éthanol	36
IV.3.2. Calcul du rendement de l'extrait	36
IV.4. Criblage phytochimique... ..	36
IV.4.1. Extrait aqueux	36
IV.4.2. Extrait éthanolique	37
IV.5. Dosage des polyphénols totaux	40
IV.6. Dosage des flavonoides totaux	41
IV.7. Evaluation de l'activité antioxydante	41
IV.7.1. La méthode de DPPH	42
IV.7.2. La méthode de FRAP... ..	43
IV.8. Evaluation de l'activité antibactérienne... ..	44
IV.8.1. Souches utilisées.....	44
IV.8.2. Préparation de l'inoculum	44
IV.8.3. La technique de diffusion en milieu gélosé... ..	44
IV.8.4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)... ..	45
IV.9. Analyse LC-MS/MS.....	46

IV.10. Formulation des nanoémulsions	47
IV.11. Caractérisation des nanoémulsions.....	47
IV.12. Activité cicatrisante.....	48
IV.13. L'étude histologique.....	49
IV.14. Elaboration du patch dermique.....	49
IV.15. Caractérisation des patchs	50
IV.15.1. Caractérisations physico-chimiques des patchs	50
IV.16. Etude de la diffusion du PA par la cellule de FRANZ	51
IV.17. Extraction des huiles essentielles	52
IV.17.1. Calcul du rendement.....	52
IV.17.2. Analyse physico-chimique de l'huile essentielle	53
IV.17.3. Analyse par chromatographie GC/MS... ..	55
IV.18. Formulation des nanoémulsions	55
IV.19. Caractérisation des nanoémulsions.....	56
IV.20. Elaboration du patch dermique.....	56
IV.21. Caractérisation des patchs	57
IV.21.1. Caractérisations physico-chimiques des patchs	57
IV.22. Etude de la diffusion du PA par la cellule de FRANZ.....	57
IV.23. Activité cicatrisante.....	58
IV.24. Etude histologique... ..	58

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Rendement de l'extrait.....	59
----------------------------------	----

V.2. Criblage phytochimique.....	59
V.3. Dosage des polyphénols totaux	61
V.4. Dosage des flavonoides totaux	62
V.5. Evaluation de l'activité antioxydante	63
V.5.1. La méthode de DPPH	63
V.5.2. La méthode de FRAP... ..	65
V.6. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	67
V.7. Analyse LC-MS/MS... ..	68
V.8. Caractérisation des nanoémulsions.....	71
V.9. Activité cicatrisante... ..	74
V.10. Etude histologique... ..	76
V.11. Caractérisation des patches.....	78
V.11.1. Caractérisations physico-chimiques des patches.....	78
V.11.2. Caractérisation spectroscopique FTIR.....	79
V.12. Etude de la diffusion du PA par la cellule de FRANZ	81
V.13. Rendement d'extraction.....	82
V.14. Analyse physico-chimique de l'huile essentielle.....	82
V.15. Analyse par chromatographie GC/MS... ..	83
V.16. Evaluation de l'activité antioxydante	87
V.16.1. La méthode de DPPH	87
V.17. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	89
V.18. Caractérisation de nanoémulsion.....	90
V.19. Caractérisation des patches.....	94
V.19.1. Caractérisations physico-chimiques des patches.....	94
V.20. Etude de la diffusion du PA par la cellule de FRANZ	96
V.21. Activité cicatrisante	97

V.22. Etude histologique...	99
Conclusion générale	100
Références bibliographiques.....	103
Annexes	114

Liste des figures :

Figure I.1 : Répartition géographique de l'espèce <i>T. Polium L</i> en Algérie	7
Figure I.2 : <i>Teucrium polium L</i> . A : feuilles, B : inflorescences.....	8
Figure I.3 : Partie végétative de <i>Teucrium polium L</i>	8
Figure II.1 : Illustration de coup de la peau	13
Figure II.2 : Illustration des couches et cellules de l'épiderme.....	14
Figure II.3 : Illustration du derme.....	15
Figure II.4 : Illustration de l'hypoderme.....	16
Figure II.5 : Illustration des annexes cutanées	17
Figure II.6 : Les types de cicatrisation cutanée.....	20
Figure II.7 : Les étapes schématisques de la cicatrisation.	22
Figure III.1 : Les différents types de structures des nanoémulsion.....	24
Figure III.2 : Schéma du fonctionnement d'un homogénéisateur à haute pression.....	25
Figure III.3 : Illustration de la sonde à ultrason	26
Figure III.4 : Représentation du principe de la microfluidisation	26
Figure III.5 : Représentation du procédé de l'émulsification par membrane... ..	27
Figure III.6 : Illustration du phénomène d'émulsification spontanée.....	27
Figure III.7 : Illustration de la formation de nanoémulsion par la méthode PIT	28
Figure III.8 : Illustration de la méthode Inversion de phases par la composition.....	28
Figure III.9 : Mûrissement d'Ostwald	29
Figure III.10 : Illustration des phénomènes de séparation gravitationnelle	30
Figure III.11 : types de patchs transdermiques	32
Figure III.12 : Route de pénétration des molécules à travers la peau	33
Figure IV.1 : Réaction entre le radical DPPH• et l'antioxydant pour former DPPH stable	42

Figure IV.2 : Illustration de la méthode d'antibiogramme.....	45
Figure IV.3 : Illustration de la cellule de FRANZ	51
Figure V. 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	61
Figure V. 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine	62
Figure V. 3 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	63
Figure V. 4 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait éthanolique.	63
Figure V. 5 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.....	64
Figure V.6 : Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique	65
Figure V. 7 : Pouvoir réducteur du BHT	66
Figure V.8 : Chromatogramme d'extrait éthanolique de <i>T. polium L</i>	69
Figure V.9 : Comportement viscoélastique de la nanoémulsion pour une fréquence $f=1\text{Hz}$	73
Figure V.10 : Test de fréquence (stabilité) de nanoémulsion pour une fréquence $f=0,01-100\text{ Hz}$	73
Figure V.11 : Test d'écoulement de nanoémulsion sur pour un cisaillement $0.001-1000\text{ }^{-1}$	74
Figure V.12 : Illustrations des coupes histologiques issues des différents groupes expérimentaux, (a), (b) le contrôle négatif, (c), (d) la référence, (e), (f) traité avec l'extrait éthanolique brute et (g), (h) traité avec la nanoémulsion.	77
Figure V. 13 : Une photo prise sur un film à base de PVA/EC	79
Figure V.14 : Adhésion des patchs sur le derme ; (a) : patch collé et (b) : décollement du patch.....	79
Figure V.15 : La perméation de l'extrait éthanolique à partir des NEs et de NEs dans patchs transdermiques par la cellule de FRANZ	80
Figure V.16 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium L</i>	82
Figure V.17 : Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle.....	86
Figure V.18 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.....	86

Figure V.19 : Comportement viscoélastique de la nanoémulsion pour une fréquence $f=1\text{Hz}$	91
Figure V.20 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement $0.005-500\text{ s}^{-1}$	92
Figure V.21 : Une photo prise sur un film à base de CMC/Gel/PVA.....	93
Figure.V.22 : Adhésion des patches sur le derme ; (a) : patch collé et (b) : décollement du patch.....	94
Figure V.23 : La perméation de l'HE à partir des NEs et de NEs dans patches transdermiques par la cellule de FRANZ	95
Figure V.24 : Illustrations des coupes histologiques issues des différents groupes expérimentaux, (a), (b) le témoin, (c), (d) la référence, (e), (f) traité avec la nanoémulsion et (g), (h) traité avec le patch.	98

Liste des tableaux :

Tableau II. 1 : Les stades et les caractéristiques des plaies	18
Tableau V.1.Résultats de screening phytochimique de la partie aérienne de <i>Teucrium polium</i> L.....	60
Tableau V. 2 : Activité antioxydante exprimée par l'IC ₅₀ (µg/ml).....	64
Tableau V. 3 : Pouvoir réducteur exprimée par l'IC ₅₀ (mg/ml)	66
Tableau V.4 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition induite par l'extrait	67
TableauV.5 : Analyse LC-MS/MS de l'extrait éthanolique de T. poliumL	69
TableauV.6 : Les données de l'analyse de la taille des particules, de l'indice de polydispersité (PI) et du potentiel zêta de nanoémulsion	71
TableauV. 7 : Pourcentage de rétraction % des plaies de différents groupes	76
Tableau V.8 : Épaisseur, variation de poids et pliage d'endurance du patch transdermique.....	78
Tableau V.9 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Teucrium polium</i>	84
Tableau V. 10: Activité antioxydante exprimée par l'IC ₅₀	88
Tableau V.11 : Diamètre des zones d'inhibition (mm).	89
TableauV.12 : La taille des particules, de l'indice de polydispersité (PI) et du potentiel zêta de nanoémulsion.	90
Tableau V.13 : La stabilité de nanoémulsion stocké	92
Tableau V.14 : Épaisseur, variation de poids et pliage d'endurance du patch transdermique	94
Tableau V.15 : Pourcentage de rétraction % des plaies de différents groupes.....	95

Abréviations :

AFNOR : Association française de normalisation

ATCC : American type culture collection

BHT : Butyle hydroxytoluène

CMI : Concentration minimale inhibitrice

Dls : Diffusion dynamique de la lumière

DMSO : Dimethyl sulfoxide

DPPH : 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle

ETPL : Extrait de T.polium L

E/H : EaudansHuile

FDA : Food And Drug Administration

FRAP : Pouvoir antioxydant réducteur ferrique

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

g: Gramme

GC/SM : Chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

h: Heure

HE : Huile Essentielle

H/E : Huile dans Eau

HHP : Homogénéisation à haute pression

IUPAC : Union internationale de chimie pure et appliquée

J : Jours

Kg : kilogramme

LC-MS/MS : La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

M ext : la masse de l'extrait sec

M ech : la masse de l'échantillon végétale.

min : Minute

MH : Muller Hinton

mgeq.AG/g extrait : milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche

mg EQ/ g extrait : milligramme d'équivalent de quercitine par gramme de matière sèche

NEs : Nanoémulsions

NPUAP : National Pressure Ulcer Advisory Panel

Pfp : Pourcentage de fermeture de la plaie

PI : Indice de polydispersité

PIC : Inversion de phases par la composition

PIT : Température d'inversion de phases

T.polium : Teucrium polium

TDDS : systèmes d'administration transdermique de médicaments

UFC : Unité Faisant Colonie

µl : Microlitre

Introduction générale

Les innovations des recherches dans le secteur pharmaceutique ne cessent de croître en vue de développer de nouvelles formes galéniques qui permettent d'assurer une bonne distribution des substances médicamenteuses dans l'organisme et améliorer la sécurité et l'efficacité thérapeutique du médicament en réduisant les effets secondaires indésirables ou toxiques vis-à-vis de l'organisme ainsi que les potentiels dégradations des substances actives par les enzymes au cours de l'acheminement du médicament, depuis son administration jusqu'à son site d'action.

L'un des plus grands défis auxquels sont confrontés les chercheurs est de trouver et d'utiliser des ingrédients actifs naturels pour créer nos médicaments au lieu de commencer par la chimie ou des matériaux synthétiques. Se tourner vers les plantes médicinales comme substitut naturel aux médicaments de synthèse [1].

Il est devenu courant que les consommateurs cherchent à éviter les ingrédients ou matériaux à risques et préfèrent ceux fabriqués à partir d'ingrédients naturels offrant des effets efficaces, sains et en plus respectueux de l'environnement. Il faut aussi reconnaître que l'une des sources les plus importantes de ces ingrédients naturels reste bien les plantes. Ces dernières furent utilisées par l'être humain depuis des siècles en médecine traditionnelle en raison de leurs vertus thérapeutiques. La recherche sur ces espèces végétales a conduit à la découverte de nouveaux candidats médicaments utilisés contre diverses maladies. L'utilisation des plantes à des fins de guérison est à l'origine de la médecine moderne [2]. Leur capacité à produire une large gamme de composés est bien connue et les huiles essentielles fréquemment extraites de leurs feuilles et de leurs fleurs sont utilisées dans diverses applications biologiques et thérapeutiques.

Teucrium. polium L. ou la germandrée tomenteuse «Kayatta ou Djaâda, Gattaba» est une espèce Méditerranéenne très ancienne utilisée en médecine traditionnelle et connue par sa richesse en métabolites secondaires tels que les huiles essentielles et les polyphénols [3]. L'extrait et l'huile essentielle de la germandrée tomenteuse, Lamiaceae sont très connus pour les nombreuses propriétés thérapeutiques, composés de plusieurs substances chimiques. Ils sont utilisés dans les pathologies inflammatoires, la jaunisse, l'anorexie, les spasmes gastro-intestinaux, le diabète et dans les infections bactériennes, l'accélération de la cicatrisation des blessures [4].

L'utilisation thérapeutique des plantes (phytothérapie) est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent. En effet, les huiles essentielles sont non seulement volatiles et chimiquement instables en présence d'air, de lumière, d'humidité et de températures élevées [5], mais présentent également des propriétés hydrophobes [6], ce qui réduit leur biodisponibilité et leur absorption dans l'organisme [7].

Néanmoins la sensibilité des extraits de plantes aux facteurs externes constitue un obstacle majeur pour leur utilisation comme principes actifs dans les médicaments. En vue de trouver des solutions à ces problèmes évoqués, les chercheurs se sont orientés vers des moyens de protection de ces composés, plusieurs techniques ont été développées entre autres l'encapsulation. C'est un ensemble de technologies visant à enrober un principe actif afin d'assurer sa protection lors de son acheminement vers son site d'action, le masquage du goût, l'augmentation de sa solubilité avec le contrôle de sa libération.

La nanotechnologie d'encapsulation permettant d'obtenir des nanoparticules ou de nanoémulsions de tailles comprises entre 1 et 100 nm se sont émergées comme des systèmes innovants de formes posologiques à libération contrôlée et sont devenues extrêmement populaires dans la thérapie moderne en raison de leurs avantages par rapport aux formes conventionnelles.

Dans cet objectif, la conception et la préparation des patchs transdermiques ont suscité un vif intérêt dans les applications pharmaceutiques; cet intérêt pour cette forme pharmaceutique particulière peut s'expliquer par l'amélioration du confort du patient grâce à une libération de la substance active prolongée et contrôlée dans le temps avec des prises plus espacées, des doses moins importantes et donc moins d'effets secondaires. Ce confort se trouve également amélioré grâce au fait que les PA ne subissent pas l'effet du premier passage hépatique et par conséquent les effets indésirables s'en trouvent diminués [8].

Aussi, l'activité cicatrisante miraculeuse citée dans la littérature dans les soins traditionnels des blessures nous a incités à concevoir un patch transdermique incorporé de nanoémulsions à base des matières actives extraites du *T. polium*. C'est dans ce contexte précis que s'inscrit notre travail. Il s'agit d'extraire les composés actifs de *T. polium* (extrait et huile essentielle). Après caractérisation, formuler une nanoémulsion qui servira de réservoir pour ces substances en les incorporant dans une forme d'administration transdermique qui est un système dans lequel les médicaments sont administrés par voie

transcutanée pour les effets systémiques à un taux prédéterminé et contrôlé [9]. Le principe actif diffuse progressivement à travers les couches dermiques en assurant des activités biologiques et thérapeutiques.

Afin de structurer notre manuscrit, nous l'avons scindé en deux parties.

- La première partie de l'étude consiste en une synthèse bibliographique qui inclut trois chapitres : Le premier chapitre présente l'espèce ***T. polium L.***, une brève description sur sa classification botanique, sa composition chimique, sa répartition géographique, ses utilités traditionnelles et enfin sur ses activités pharmacologiques, thérapeutiques et biologiques. Le deuxième décrit l'anatomophysiologie de la peau et le processus de la cicatrisation. Le troisième chapitre est dédié à une présentation générale de la nanoémulsion ainsi que les méthodes de formulations et aussi leurs avantages et inconvénients. Ce chapitre décrit aussi les patchs transdermiques, leur définition et en particulier sur leur composition, ensuite les différents types de systèmes transdermiques y compris leurs intérêts.

- La deuxième partie expérimentale est subdivisée en deux chapitres :

Dans le quatrième chapitre, la démarche méthodologique depuis la collecte des plantes, leur séchage, broyage, extraction jusqu'à l'encapsulation dans les nanoémulsions en passant par l'évaluation des activités biologiques des extraits et des huiles essentielles récupérés. Aussi bien que la formulation des nanoémulsions et caractérisations pour terminer avec l'élaboration du patch dermique et détermination de ses caractéristiques. Le cinquième et dernier chapitre a été consacré à la mise en exergue et la discussion de tous les résultats obtenus, en comparaison avec les études antérieures réalisées dans le même contexte.

Une conclusion générale clôture cette thèse en mettant l'accent sur les résultats clés obtenus avec des perspectives et recommandations pour la continuité dans cet axe de recherche scientifique non seulement prometteur mais aussi passionnant.

Chapitre I :
Teucrium polium L

I.1. Introduction

Face aux limites majeures de l'utilisation des médicaments synthétiques, l'intérêt des recherches s'est orienté vers l'étude de la chimie des plantes, et particulièrement vers la découverte et le développement des nouvelles substances bioactives.

Aujourd'hui de nombreux nouveaux médicaments à base de plantes et avec différentes formes galéniques ont été proposés et appliqués pour la prévention ou le traitement de diverses maladies.

L'Algérie compte dans sa flore une grande diversité de plantes médicinales et aromatiques par sa situation géographique. Ces plantes appartiennent à différentes familles botaniques y compris les Lamiaceae qui poussent spontanément dans les régions semi-arides, arides et sahariennes.

De nombreuses études ont été menées sur la plante ***Teucrium polium (Lamiaceae)*** et ont été présentées dans ce chapitre et mettent en valeur des données bibliographiques issues de son genre, sa famille, sa description botanique et géographique, son usage en médecine traditionnelle et ses utilisations biologiques et pharmacologiques.

I.2. Plantes médicinales

Les plantes médicinales sont universellement considérées comme des sources importantes de nouvelles substances chimiques ayant des effets thérapeutiques potentiels [10]. Selon la pharmacopée Française, une plante médicinale est définie comme « une drogue végétale au sens de la pharmacopée Européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses ». Une « drogue végétale » est une plante ou une partie de plante utilisée à l'état frais ou le plus souvent sous la forme sèche [11].

I.3. Composition des plantes médicinales

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées [12]. La plante est considérée comme le siège d'une activité métabolique aboutissant à la synthèse de métabolites primaires et secondaires [13].

I.3.1. Métabolites primaires

Ce sont des molécules organiques, ils sont indispensables à l'existence de la plante, se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie et jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction des cellules, ils sont classés en quatre grandes familles, à savoir ; les glucides, les lipides, les acides aminés (Protéines) et les acides nucléiques [13, 14].

I.3.2. Métabolites secondaires

Ces molécules sont nécessaires pour la défense de la plante contre les agressions extérieures [14]. Ils accumulent fréquemment un grand nombre de composés qui ne sont pas issus directement de la photosynthèse, mais résultent des réactions chimiques ultérieures, ces composés sont appelés «métabolites secondaires» [12] (exclusivité du monde végétal). Ils sont d'une grande variété structurale, ayant une répartition limitée [13], et représentent une source importante de molécules bioactives utilisables par l'Homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [12]. Ces métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles, les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes [13]. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possède une très large gamme d'activités biologiques [14].

I.4. Présentation du genre Teucrium

Nom générique des germandrées désignant en Latin teucrium en grec teukpiontroie, ou de teucros [12, 15]. Le genre **Teucrium**, considéré comme le genre le plus répandu et le plus important dans la région méditerranéenne. Dans la flore internationale le genre **Teucrium** appartient à la famille des Lamiaceae ou labiées, il est généralement aromatique, pousse à l'état sauvage et spontané dans diverses régions du globe [16-18]. Ce genre a été divisé en six sections [16], avec environs 340 espèces et variétés [12, 19-21]. Les espèces appartenant à ce genre : Les **Teucrium arduini L. représentent la section Stachyobotrys**, **la section Chamaedrys par Teucrium chamaedrys L.**, **la section Scorodonia par Teucrium scordium L.**, **et la section polium par T. polium L. et Teucrium montanum L.**

Ce sont principalement des herbes vivaces, sous-arbustes ou arbustes sauf *Teucrium botrys* est une plante herbacée annuelle [16]. Ces espèces sont identifiables grâce à la forme du calice et de l'inflorescence [3], dont 20 se trouvent en Algérie [19, 20, 22-24], près de 50 sont connus en Europe [25] et comprend environ 12 espèces en Iran [21, 26].

I.5. Noms vernaculaire

La synonymie de l'espèce diffère en fonction de deux critères : la population et la localisation de la plante [14]. *Teucrium polium L* est connue sous le nom français: Germandrée blanc-grisâtre, Germandrée tomenteuse, Germandrée polium, Polio de montagnes, germandrée feutrée [15, 16, 27], sous le nom anglais: Felty germander, Ezovion[27, 28], son nom en Italie: Camedrio polio, Canitola, Polio et son nom en espagnol : Poleomontano, Timo mascle, Tomilloterrero, Zamarilla[12, 29]. Elle est reconnue sous plusieurs noms vernaculaires arabes ou Berbère : Gattaba[15, 27], khayatit-lajrah ou Djaâda (Algérie) [27, 28], Takmazzut(Touaregs-Algerie) [24, 30],Timzourin (Berbère-Algerie)[27], Guettabet El Ajrah (Tunisie)[31], Jaada (Maroc)[32], Hachichetelrih (Liban)[27], kalpooreh (Iran)[33, 34], Elgaslam et Elhelal (Yémen)[27] et Jaa'd ou Djaâda(l'Arabie saoudite) [35].

I.6. Habitat et distribution géographique de *Teucrium polium L*

Teucrium polium L est omni présente dans le monde [36]. Elle se trouve dans la majorité des pays du Moyen-Orient et de la Méditerranée [37]. Cette espèce est originaire du sud-ouest d'Asie, d'Europe et d'Afrique du nord [38]. En Algérie, une vingtaine de variétés de cette espèce poussent spontanément, elle est très répandue dans les hauts plateaux algérois, oranais et Constantinois, aussi dans l'Atlas Saharien. On la rencontre aussi du sommet de chélia jusqu'à l'étage saharien, connue comme étant héliophile. Elle prédomine la région du Tell, assez commune dans l'espace méditerranéo-saharienne et dans les montagnes Teffedest du Hoggar, plus rare au Sahara septentrional, au Tassili et au Tademaït [27].

L'espèce végétale de ce genre pousse dans les pelouses arides, les rocaillies de basse altitude (varie entre 1200 et 2600 m), collines et les déserts arides [27, 38]. Elle se développe généralement dans des régions appartenant aux bioclimats semi-arides et arides.

Elle préfère la lumière du soleil et les sols bien drainés [35]. C'est une espèce très variable et de nombreuses sous espèces ont été décrites dont certaines sont parfois érigées au rang d'espèce [39].



Figure I.1 : Répartition géographique de l'espèce *T. Polium L* en Algérie

I.7. Description botanique de *Teucrium polium L*

C'est une plante herbacée vivace [40], dégage une agréable odeur aromatique (odeur poivrée) par frottement. L'espèce peut atteindre de 10 à 35 cm de hauteur [16, 35]. Les feuilles crénelées sont blanches, tomenteuses des deux côtés, sont étroites ou ovales-allongées, avec des bords arrondis roulés vers le bas et les tiges sont prostrées [15,31, 40]. Les fleurs blanches, rarement purpurines, s'épanouissent depuis le mois de mai jusqu'au mois d'août [15]. Ils forment des inflorescences d'aspect blanc, en têtes compactes globuleuses ou ovoïdes serrées d'au moins un centimètre de diamètre [41]. Les capituliformes sont situées au sommet des tiges [27]. Le calice est vert-grisâtre, couvert de poils courts et cotonneux en forme de cloche avec 5 dents courtes triangulaires plates ou acuminées sous-égales, dont la supérieure est plus grande et obtuse au sommet, les inférieures aiguës; ces dents ont environ le tiers de la longueur du reste du calice [15, 35], La corolle est blanche avec des lobes obtus et ovales, l'inférieur plus grand; les lobes supérieurs sont poilus. Les étamines ne sont pas enroulées sur elles-mêmes après la floraison [15]. Les fruits mûrs sont constitués de 4 parties de couleur marron clair à brun foncé avec une surface grillagée [14, 42].

**A****B**

Figure I.2 : *Teucrium polium* L. **A** : feuilles [27], **B** : inflorescences [15].

I.8. Position systématique

Selon **Quezel et Santa (1963)** [23], *Teucrium polium* L est classé comme suit :

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Embranchement : *Phanérogames*

Sous-embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Angiospermes*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Lamiales*

Famille : *Lamiacées*

Genre : *Teucrium*

Espèce : *Teucrium polium* L



Figure I.3 : Partie végétative de *Teucrium polium* L

I.9. Données phytochimiques de *Teucrium polium* L

L'évaluation de la composition chimique de *T. polium* récoltée de différents secteurs géographiques, se base sur l'analyse chromatographiques des extraits [43]. Les recherches (métabolites secondaires) et plus de 134 substances actives à large spectre

ont démontré que ce genre est riche en composés chimiques thérapeutiques (métabolites secondaires), et plus de 134 produits chimiques structurellement actifs ont été isolés des parties aériennes, des racines et des grains de *T. polium* [10].

La caractérisation et l'analyse des différents extraits ont révélé la présence de plusieurs composés incluant principalement les sesquiterpènes [36, 38, 44], monoterpènes [38, 44], neo-clerodane diterpenoides et triterpenoides [45-47]. De plus, de nombreuses études ont montré que cette plante contient les stérols et les flavonoïdes [34, 38, 43, 46, 48]. L'analyse des extraits a montré aussi la présence des stéroïdes, des acides gras [47], des iridoïdes [27] et des composés polyphénoliques [34, 49, 50]. D'autres constituants ont été aussi identifiés, il s'agit des glycosides tels que verbascosides et poliumosides (connus sous le nom de phénylethanoïde) au niveau des parties aériennes de la plante et contient aussi les alcaloïdes [34, 46], les terpénoïdes [38, 46], les huiles essentielles [35, 37, 51], les saponines et les tanins [34].

I.10. Propriétés thérapeutiques et pharmacologiques

L'espèce *Teucrium polium L* est utilisée depuis plus de 2000 ans en médecine traditionnelle [38]. Cette espèce a prouvé des effets thérapeutiques importants contre divers types de pathologies. Les recherches expérimentales, pharmacologiques, thérapeutiques et cliniques menées au cours des 45 dernières années ont montré que l'extrait et les composants individuels isolés de différentes parties de *T. polium* ont des effets biologiques spécifiques. Ces travaux de recherches scientifiques ont confirmé le bien-fondé des notions populaires découlant d'un pur empirisme [15].

La poudre et les extraits des parties aériennes de cette plante médicinale sont utilisés dans de nombreuses régions du monde et ont prouvés leurs rôles primordiales dans la prévention et le traitement de diverses maladies telles que le cancer [52, 53], les maladies inflammatoires [16, 46, 53], l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires [44]. Cette plante présente aussi un effet magique dans le traitement des plaies et est utilisée pour accélérer la cicatrisation des blessures [28, 54-57], l'extrait de cette espèce est utilisée comme un antioxydant [32, 42, 58], il est appliqué entre autres pour traiter les maladies parasitaires telles que l'amoebicose [32, 59]. *Le Teucrium* est une plante médicinale qui permet la résistance aux antibiotiques, peut être utilisée pour la protection

contre les agents pathogènes et les substances antimicrobiennes et également les antibactériens [60].

Cette plante est prescrite dans les périodes de stress, elle permet la détente, la relaxation des muscles en augmentant leur force, la diminution de l'anxiété et la lutte contre la fatigue et l'agressivité [15].

Les propriétés antistress et antioxydantes permettent de lutter contre le vieillissement de la peau [30]. De plus, elle favorise le sommeil et permet également de stimuler la mémoire, d'augmenter sa concentration et sa lucidité [15].

Les extraits de cette plante présentent des propriétés diurétiques, antipyrétiques [48, 61], antispasmodiques [38, 52], toniques, antifongiques, antirhumatismales, carminatives [16, 52] et anorexiques [38].

De plus, différents extraits de cette espèce ont été utilisés chez des patients diabétiques comme agent hypoglycémiant [47, 49, 50, 52] et insulintropes, ils ont montré qu'ils permettent la réduction du poids corporel et l'abaissement de l'hypertension artérielle [62]

Un extrait méthanolique de *T. polium* a montré une meilleure protection des globules rouges (GR) contre la peroxydation lipidique [63].

Récemment et en pharmacologie moderne, l'évaluation des effets cytotoxiques d'un extrait éthanolique de *T. polium*, sur quatre lignées cellulaires, a montré que l'extrait supprimait la croissance de toutes les lignées cellulaires testées [51, 64].

L'extrait aqueux de *T. polium* augmente la cytotoxicité contre N-méthyl-N-nitro-Nnitro soguanidine sur des cultures de cellules primaires des hépatocytes des rats et réduit significativement les index mitotiques et les cellules nécrotiques [65].

Des études ont été menées sur les extraits hydroalcooliques et d'acétate d'éthyle pour la mise en évidence des propriétés antinociceptives [38], hypolipidimiques [10, 16], hypercholesterolemiques [46], hypotensives [10] et hypatoprotecteur [10, 16, 43, 58, 62].

Teucrium polium présentait de longues histoires d'utilisations thérapeutiques en médecine traditionnelle, dans la médecine populaire saoudienne, les parties aériennes de la plante en infusion sont utilisées par la population locale de Bédouins pour le traitement des troubles fébrifuges et vermifuges [66, 67]. En médecine populaire marocaine, elle est utilisée pour le traitement de diverses maladies, notamment les troubles digestifs, les et les problèmes hépatiques [68]. Cette espèce est également utilisée pour le traitement des problèmes gastro-intestinaux [48] et antiulcéreux [10] ainsi contre les coliques spasmodique [69], le thé de *T. polium* est utilisé dans la médecine traditionnelle iranienne pour traiter des

affections telles que les douleurs abdominales, des maux de tête, les indigestions, le rhume et les maladies urogénitales [33, 38] et la jaunisse [69].

Depuis longtemps, l'infusion de la germandrée fût utilisée, pour combattre la goutte, la bronchite chronique et les mucosités abondantes. En bain de bouche, elle soigne les gingivites [70]

Chapitre II :
Peau, plaie et cicatrisation

II.1. Introduction

La peau est l'enveloppe du corps, dont le rôle principal est la protection contre les agressions extérieures, elle constitue une véritable barrière physiologique entre les organes internes et l'environnement extérieur. Elle permet aussi de limiter au maximum la déshydratation de notre corps [71]. Toute modification de la peau peut entraîner des conséquences graves, donc il est très important de conserver l'intégrité de cette « fonction barrière ». Afin de garder un bel aspect de la peau et favoriser la cicatrisation, des topiques réparateurs cutanés ou transcutanés sont présent sur le marché pour applications [72].

Dans ce chapitre sont présentés, la peau et sa structure y compris ses différentes couches et ses annexes, les plaies qui sont les plus communément rencontrées chez l'Homme avec leurs caractéristiques ainsi les différents types des plaies existantes. La cicatrisation avec ses types et les processus fondamentaux de fonctionnement y seront présentés.

II.2. La peau

La peau aussi appelée tégument est l'organe le plus large et le plus visible du corps humain. Elle couvre entièrement le corps avec une surface totale d'environ 1,5-2 m² [73] et de 15 % de la masse totale d'un adulte [74]. A la fois souple et résistante, elle est capable de résister aux attaques constantes des agents du milieu externe comme les radiations UV, des allergènes ou des microorganismes. Elle permet la régulation de la température et de la pression artérielle, en plus elle assure la fonction sensorielle grâce aux terminaisons nerveuses, ce qui permet le contact avec l'environnement externe [75].

II.3. Anatomie de la peau

La peau présente une épaisseur moyenne qui varie de 2 à 3 millimètres en fonction de sa localisation sur le corps (dos, ventre, bras, jambes), elle varie selon le sexe, l'âge et la région du corps et elle est constituée de trois couches distinctes, de l'extérieur vers l'intérieur de l'organisme : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.[76], comme illustré sur la figure ci-dessous :

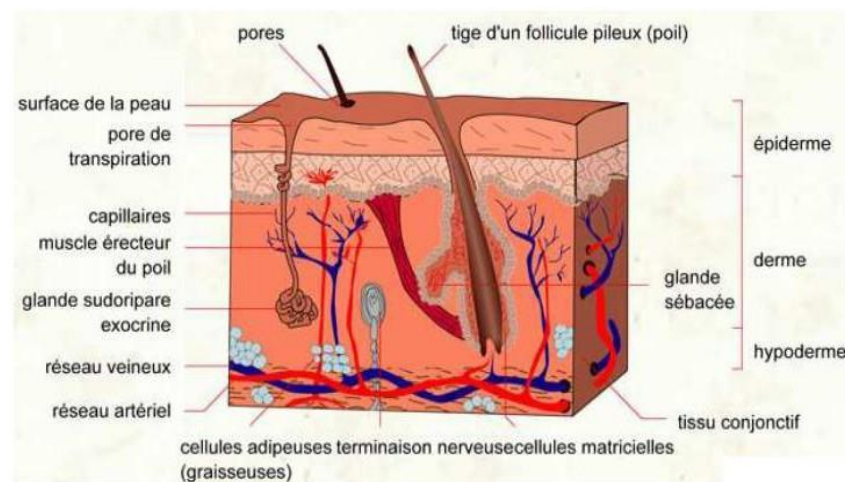


Figure II.1 : Coupe schématique de la peau. [77]

a. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium de revêtement stratifié, pavimenteux et kératinisé [77]. Il est en contact direct avec l'environnement extérieur, il protège l'organisme contre celui-ci. En fait, c'est la couche protectrice de la peau humaine dont l'épaisseur représente quelques dizaines de micromètres [78]. L'épiderme est normalement constitué de 4 types de cellules : Les kératinocytes avec un taux de 80% des cellules épidermiques. Elles proviennent de l'ectoderme. Ce sont elles qui en migrant de la profondeur vers la surface donnent à l'épiderme ses caractéristiques morphologiques : stratification en plusieurs couches et cellules superficielles pavimenteuses et anuclées. Les autres cellules de l'épiderme (20%) sont dispersées entre les kératinocytes. Ce sont les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. Les mélanocytes et les cellules de Merkel proviennent des crêtes neurales alors que les cellules de Langerhans ont pour origine la moelle hématopoïétique [79]. Cette couche protectrice est constituée de plusieurs couches :

- ✓ La couche basale.
- ✓ La couche de Malpighi ou couche épineuse.
- ✓ La couche granuleuse.
- ✓ La couche cornée claire.

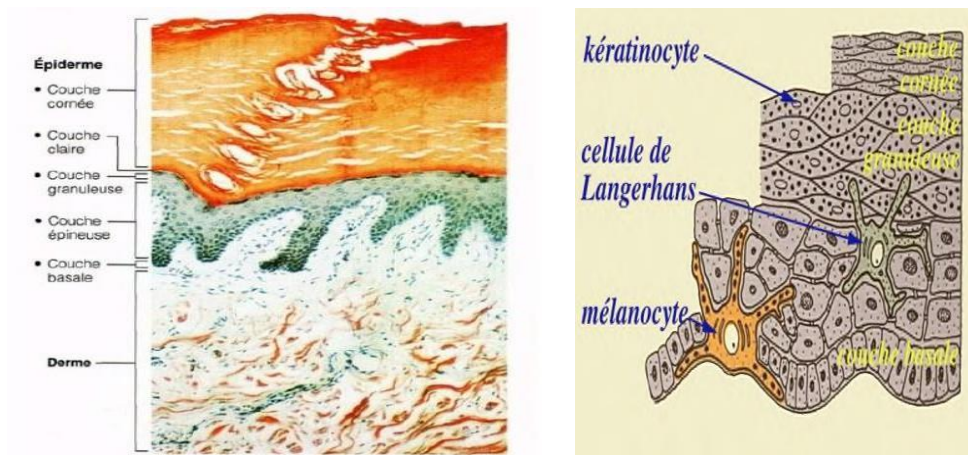


Figure II.2 : Illustration des couches et cellules de l'épiderme [80].

b. La jonction dermo-épidermique

Cette structure particulière comme son nom l'indique sépare l'épiderme du derme kératinisé [79]. Elle se trouve aux frontières de deux tissus, l'un épithélial, l'autre conjonctif, cette couche mince située sous la couche basale est constituée de la membrane basale (formée par les membranes plasmiques des cellules basales) et de plusieurs couches de substances dermiques telles que glycoprotéines, collagène de type IV, fibronectine [81].

c. Derme

Communément appelé tissu conjonctif lâche, le derme est une structure complexe bien plus épaisse que l'épiderme [80], son épaisseur varie considérablement selon le sujet et la région (comprise entre 1 et 4 mm) [81], il est particulièrement fin au niveau des paupières et du prépuce et en revanche très épais au niveau des plantes des pieds. Il comporte deux zones : le derme papillaire superficiel (riche en cellules), qui représente environ 1/5 de l'épaisseur totale du derme et le derme réticulaire ou profond (riche en fibres), qui représente environ 4/5 du derme. La limite entre les deux parties n'est pas toujours visible au microscope [80, 81].

Le derme est composé principalement d'une matrice extracellulaire (substance fondamentale)[82], dans laquelle se trouvent des cellules telles que les fibroblastes, ainsi que des macrophages, mastocytes et les lymphocytes polynucléaires éosinophiles [80, 81], Il est constitué de protéines fibreuses telles que la collagène (support structural), l'élastine et le réticuline (responsables de l'élasticité et l'extensibilité du derme) et d'un gel interfibrillaire composé de protéoglycanes, glycoprotéines, sels et eau [81]. Il comprend également

d'importantes ramifications vasculaires (les vaisseaux sanguins), un vaste réseau nerveux et des annexes épidermiques telles que les glandes sudoripares, glandes sébacées et follicules pileux [81, 82].

Le derme est responsable de la texture, de l'élasticité, de la solidité et la souplesse, de l'hydratation, de la nutrition ainsi que la cicatrisation de la peau. Son rôle est majeur lors de la cicatrisation par seconde intention ou la contraction fait intervenir ses propriétés élastiques [81, 83].

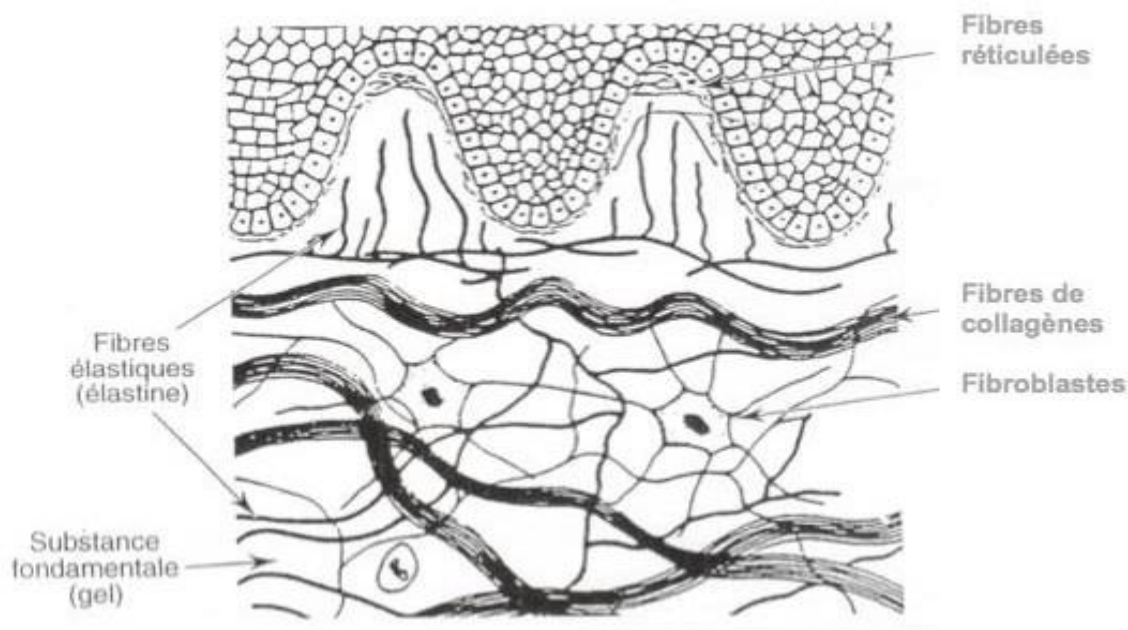


Figure II.3 : Illustration schématique du derme [84].

d. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif adipeux blanc, reliant le derme au fascia conjonctif profond, au périoste ou au périchondre, c'est la couche la plus profonde de la peau [83]. Il représente 15 à 20% de la masse corporelle et varie selon les régions du corps, du sexe, de l'âge, du mode de vie et du déterminisme génétique [84]. Il s'agit d'un tissu conjonctif lâche [80], qui se compose principalement de cellules adipeuses, les adipocytes blancs, regroupées en lobules et en lobes, séparés par des cloisons conjonctives constituées de fibres de collagène et de réticuline [84]. Ce tissu est largement vascularisé et traversé par des fibres nerveuses [85]. L'hypoderme a un rôle de protection de l'organisme contre les chocs (le froid, la pression et agressions) [77]. Il contribue à la mobilité et à l'élasticité de la peau [80]. Il joue également un rôle fondamental dans la thermorégulation grâce au caractère isolant de la graisse [84].

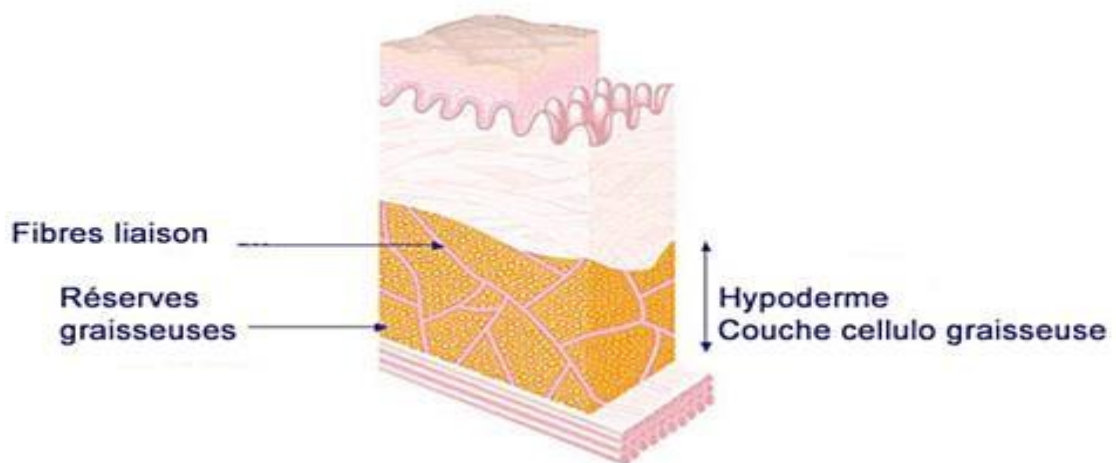


Figure II.4 : Illustration de l'hypoderme [84].

e. Annexes cutanées

Ce sont des invaginations profondes dans le derme, allant jusqu'à l'épiderme [81]. Elles sont constituées :

- ✓ Des follicules pilo-sébacés : Ces structures correspondent à l'association d'un follicule pileux avec une ou plusieurs glandes sébacées. Ces structures sont toujours associées à un muscle horripilateur ou arrecteur qui constitue l'appareil pilosébacé [81]. Elles ont un rôle dans la fonction tactile, dans la thermorégulation et dans l'absorption cutanée [84].
- ✓ Des glandes sudorales ou glandes sudoripares : Ce sont des glandes sécrétant la sueur [81]. Ces glandes ayant un rôle essentiel dans la thermorégulation [84]. Elles sont de deux types:
 - **Les glandes sudoripares eccrines** : sont les « reins de la peau », ce sont des glandes exocrines responsables de la plus grande partie des sécrétions sudorales grâce à une partie sécrétrice, le peloton sécrétoire et un long canal excréteur qui traverse le derme [84]. Elles sont les plus nombreuses, particulièrement au niveau des paumes des mains et des plantes des pieds [86].
 - **Les glandes sudoripares apocrines** : sont composées d'un peloton sécrétoire situé dans le derme profond et d'un canal excréteur dermique qui rejoint le follicule au-dessus de l'infundibulum pileux [77]. Ces glandes sécrètent une sueur plutôt laiteuse, odorante, visqueuse et riche en substances organiques [84]. Elles sont présentées presque uniquement au niveau des aisselles et du périnée [86].

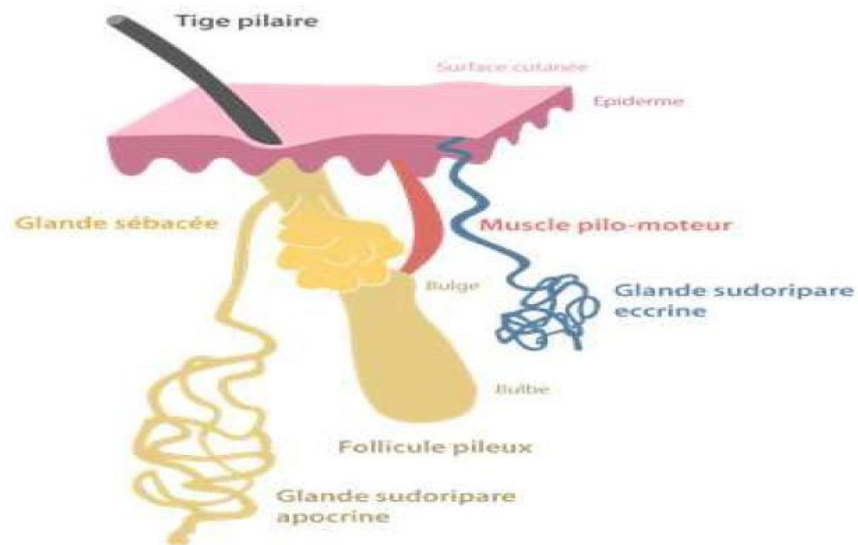


Figure II.5 : Illustration des annexes cutanées

II.4. Les plaies

II.4.1. Définition de la plaie

Une plaie est définie comme étant une rupture de la structure anatomique normale et fonctionnelle de la peau (une interruption du revêtement cutané). En d'autres termes ; c'est une déchirure des tissus superficiels et profonds due à un accident (blessure, brûlure) ou à une intervention chirurgicale. Elle est généralement associée à une perte de substance cutanée.

Lors d'une lésion cutanée, Cet écartement est dit passif s'il n'est lié qu'à l'élasticité des tissus. Si la contraction d'un muscle sous-jacent ou un mouvement (articulaire) participe à cet écartement, il est dit mécanique [83]. Les lésions de la peau peuvent être différenciées par leur profondeur (plaies superficielle, profonde, pénétrante), leur forme (linéaire, punctiforme, irrégulière), leur nombre (unique ou multiple) et leur complexité (association de différents types de lésion) [87].

II.4.2. Classification des plaies

Les plaies revêtent des aspects très variés, il existe plusieurs classifications afin de les évaluer, de prévoir les évolutions, les risques de complications [83] et de choisir un traitement adapté. Les plaies peuvent être classées en fonction de leur origine, leur

nature lésionnelle des tissus altérés et leurs caractères physico-chimiques, bactériologiques, histologiques, et cliniques [88].

Tableau II. 1 : Les stades et les caractéristiques des plaies [87].

Stade	Caractéristiques de la plaie
Stade I	Zone d'érythème avec décoloration de la peau, chaleur et œdème.
Stade II	Perte tissulaire partielle touchant l'épiderme, le derme ou les deux avec absence de nécrose et a contours rouges, chauds, partiellement indurés.
Stade III	Perte tissulaire totale atteignant le tissu sous-cutané et pouvant au fascia sous-jacent sans toutefois le pénétrer. Présence de nécrose et d'inflammation.
Stade IV	Perte tissulaire totale atteignant le muscle, l'os et les structures de soutien, telles que tendon et capsule articulaire avec destruction et nécrose importantes ; infection systémique possible.
Stade X	Escarrification jaunâtre ou tissu nécrosé noir épais recouvrant le lit de la plaie (limite ainsi l'évaluation de l'extension de la plaie). Toutes les plaies (sauf le stade I, où la peau est intacte) peuvent passer par ce stade ; il faut enlever l'escarre et les tissus morts afin d'évaluer le vrai stade de la plaie.

II.4.3. Types de plaies

On distingue deux types de plaies :

a. La plaie aiguë

La plaie aiguë présente un temps de cicatrisation normal [84], en l'absence de facteur local ou général pouvant retarder la cicatrisation. Les étiologies incluent notamment les : brûlures, greffes, plaies chirurgicales, morsures, abcès, gelures et des abrasions profondes [89].

b. La plaie chronique

Une plaie est considérée comme chronique après quatre à six semaines d'évolution [84], il s'agit de plaies qui ne cicatrisent pas ou difficilement malgré la mise en place des meilleures conditions possibles, certains patients vivent avec des plaies chroniques pendant de longues années. Elle peut être comme des : ulcères de jambes, escarres, plaies des diabétiques et plaies tumorales [89].

II.5. La cicatrisation

II.5.1. Définition de la cicatrisation

La cicatrisation est un phénomène biologique naturel qui permet de reconstruire et de réparer une zone lésée et de réunir les berges d'une plaie. Il peut s'agir de la régénération d'un tissu ou d'un organe, souvent la peau, ou de la consolidation d'un élément séparé en deux tels que dans le cas d'une fracture osseuse [90]. Le temps de cicatrisation d'une plaie dépend de la gravité et de la nature de la lésion.

II.5.2. Les différents modes de cicatrisation

Les différents modes de cicatrisation offrent des approches variées pour guérir une plaie, avec des choix basés sur des critères spécifiques.

a. Cicatrisation par première intention

La cicatrisation par première intention, mise au contact de l'épiderme et du derme des deux berges de la plaie [91], souvent utilisée pour les plaies chirurgicales (évolution d'une plaie suturée). Ce type de cicatrisation nécessite des conditions et des critères précises telles qu'une plaie propre, sans corps étrangers ni tissus nécrotiques, sans saignement, et avec un alignement précis des bords pour une cicatrisation rapide et une cicatrice discrète [92].

b. Cicatrisation par seconde intention

La cicatrisation par seconde intention, plus courante pour les plaies traumatiques, ce processus naturel prend plus de temps car les bords de la plaie sont éloignés [92], pour cela, l'organisme doit faire appel à de nouveaux tissus appelés tissus de granulation pour obtenir la fermeture de la plaie [91], parfois des séquelles fonctionnelles et esthétiques persistent.

c. Cicatrisation par troisième intention

La cicatrisation par troisième intention ou cicatrisation de première intention retardée combine le traitement de la cicatrisation par seconde intention avec une fermeture chirurgicale ultérieure, permettant de gagner du temps par rapport à une cicatrisation par seconde intention.

Ce type de cicatrisation a lieu quand des complications telles qu'un œdème important ou une infection sont présentes [92]. La figure ci-dessous illustre ces mécanismes :

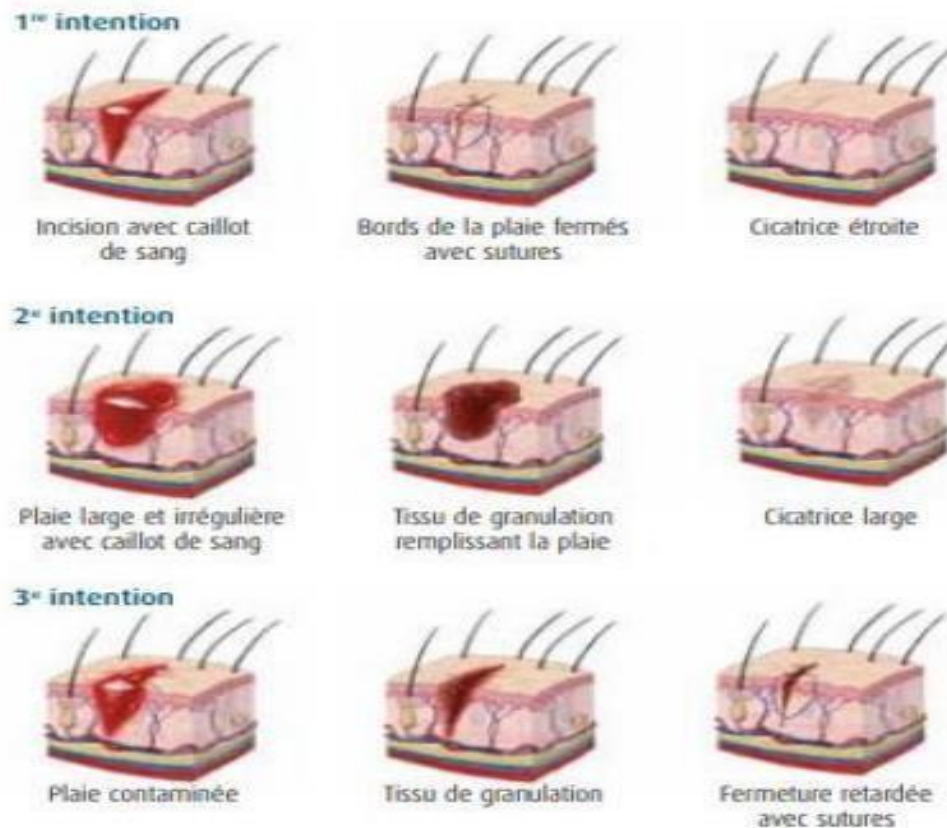


Figure II.6 : Les types de cicatrisation cutanée [92].

II.5.3. Les processus fondamentaux de la cicatrisation

Au cours des dernières années, les avancées significatives en biologie cellulaire et moléculaire ont amélioré la compréhension du processus de la cicatrisation et la régénération des tissus [88]. La cicatrisation cutanée fait intervenir différentes phases qui entraînent la disparition d'une lésion et le remplacement des cellules atteintes par des cellules saines.

a. La phase vasculaire

La phase vasculaire ou hémostase commence immédiatement après la lésion tissulaire. L'effraction vasculaire entraîne un saignement qui déclenche l'étape d'hémostase par vasoconstriction. Ce phénomène naturel entraîne une diminution du flot sanguin et minimise la perte de sang. L'hémostase implique la libération, l'activation et l'agrégation plaquettaire ainsi que le relargage de nombreux médiateurs, protéines [84] et facteurs de coagulation pour former un caillot de fibrine. Ce caillot sanguin permet de combler la plaie et les polynucléaires affluents [87] et d'unir les bords de la plaie, il permet aussi de limiter la perte de fluides et l'infection. En

outre, ce caillot de fibrine fournit une matrice extracellulaire nécessaire à la migration ultérieure des neutrophiles, fibroblastes et des cellules endothéliales [88] et il protège la peau de l'extérieur. Cette phase dure généralement de 1 à 2 jours.

b. La phase inflammatoire

La présence d'une blessure nécessite toujours une réponse inflammatoire. Cette phase commence après 6 heures de la constitution de la lésion et dure en moyenne 3 à 5 jours [88], l'importance et la durée de la phase inflammatoire sont variables selon l'agent agresseur et l'intensité des dégâts tissulaires [93]. Cette phase se caractérise par des signes tels que, la rougeur et la chaleur qui résultent d'une augmentation du débit sanguin au niveau de la lésion [84], le gonflement provoqué par la formation d'exsudat [87], la douleur est provoqué par l'œdème qui comprime les fibres nerveuses [84]. Cette phase permet d'arrêter l'hémorragie et de détruire les bactéries.

Des molécules chimiotactiques attirent vers le lit de la blessure des cellules inflammatoires notamment les neutrophiles et les macrophages, dont le rôle principal est d'amorcer la phagocytose pour combattre les bactéries, les pathogènes (corps étrangers) et les débris cellulaires.

Les neutrophiles et les macrophages produisent des facteurs chimiotactiques qui recrutent d'autres cellules inflammatoires et libèrent des facteurs de croissance ; des cytokines et des protéases ; qui attirent les fibroblastes et les cellules endothéliales vers le site de la plaie, ils ont un rôle essentiel dans la formation du tissu cicatriciel.

c. La phase de granulation ou proliférative

La phase de granulation dure environ 3 semaines et, lors de la cicatrisation normale, l'épithélialisation se prépare également dès ce moment. Des fibroblastes prolifèrent au sein de la plaie, favorisant la formation et la réorganisation d'une matrice extracellulaire et de nouveaux vaisseaux sanguins ainsi que la multiplication des cellules précurseurs des kératinocytes, à partir des berges de la plaie, des follicules pileux et des glandes sudoripares. Les macrophages sécrètent des facteurs de croissance qui stimulent la prolifération des fibroblastes qui produisent du collagène, dont les fibres s'orientent selon les forces auxquelles elles sont soumises. Leur prolifération est régie par un certain nombre de facteurs. L'arrêt de cette prolifération se fait en règle générale lorsque le tissu de granulation aura comblé la perte de substance et lorsque la prolifération fibroblastique est remontée au niveau des berges.

d. La phase de maturation ou de remodelage

Cette phase est également appelée phase de maturation. L'épithélium formé au cours de la phase précédente est fragile et doit être remodelé afin de former une cicatrice résistante [92]. La phase de maturation est caractérisée par la réduction de la vascularisation jusqu'à ce qu'elle ne soit plus vascularisée et la diminution des cellules inflammatoires. Cette phase est caractérisée aussi par la maturation et l'épaississement de l'épiderme, la normalisation du réseau capillaire, la maturation cicatricielle et le remodelage de la matrice extracellulaire [87]. Ce dernier débute 2 à 3 semaines après la lésion tissulaire et peut durer plusieurs mois voire même quelques années après la fermeture de la plaie et diffère selon la nature de la plaie.

La cicatrice subit un remodelage supplémentaire pour s'adapter aux contraintes mécaniques environnantes, devenant ainsi plus plate, lisse et moins visible avec le temps.

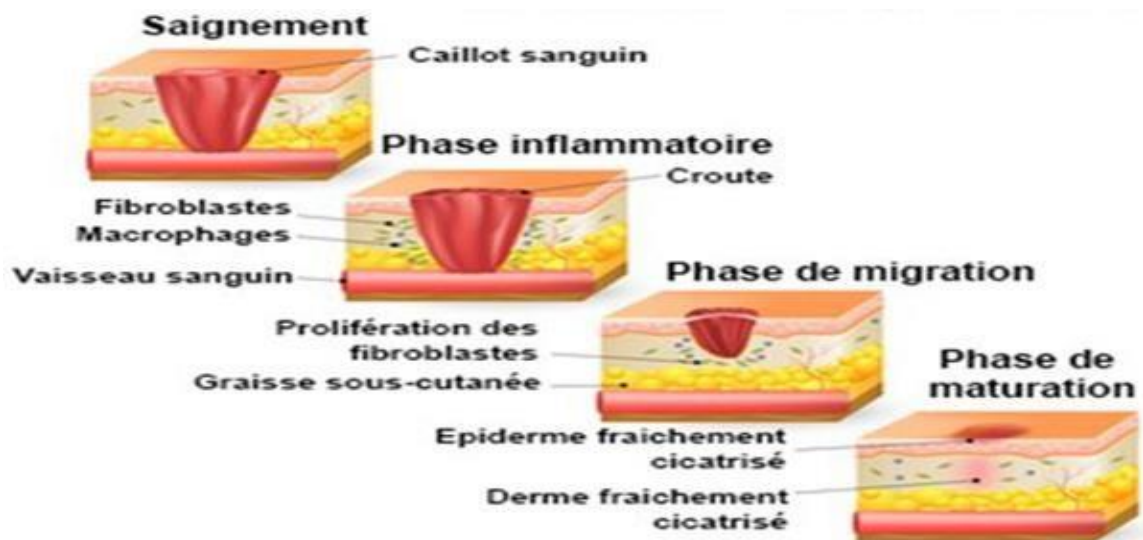


Figure II.7: Les étapes schématisques du mécanisme de cicatrisation.

Chapitre III :
Formes transdermiques

III.1. Introduction

Avec l'avènement des nanotechnologies, l'administration transdermique des médicaments est devenue de plus en plus une voie d'administration plus avantageuse par rapport aux autres voies traditionnelles [94]. Elle permet de fournir des dispositifs et des matériaux présentant des nouvelles propriétés physiques, chimiques et biologiques en raison de leurs tailles nanométriques, offrant donc l'avantage de protéger les médicaments de la dégradation; soit de réduire le nombre de doses nécessaires et assurer un traitement efficace [95, 96]. La diffusion des médicaments à travers la peau est un concept prometteur depuis longtemps, vu la rapidité d'accès,

Dans ce chapitre seront présentées, les nanoémulsions avec les différents types, les propriétés physico-chimiques et les méthodes d'élaboration. Les patchs transdermiques et ses types, la délivrance et la diffusion transdermique des médicaments y seront aussi abordés.

III.2. Définition des nanoémulsions

Selon l'IUPAC [97], une émulsion est une dispersion de gouttelettes d'un liquide dans une phase continue d'un autre liquide, non miscibles entre eux. Les nanoémulsions (NEs) sont des systèmes « métastables », c'est-à-dire hors équilibre thermodynamique. Leur diamètre est de 20 à 200 nm [98]. En effet, leur petite taille leur permet d'acquérir des propriétés nettement avantageuses, en voici quelques exemples :

- ✓ Une surface élevée par unité de volume.
- ✓ Une meilleure stabilité face aux phénomènes de gravité en raison de la petite taille des gouttelettes.
- ✓ De bonnes propriétés d'apparence, de texture et de rhéologie.
- ✓ De bonnes propriétés de transport d'actifs grâce à une meilleure pénétration cutanée.

III.3. Les différents types de nanoémulsions

Il existe trois catégories de nanoémulsions : huile dans eau, eau dans huile et bi-continue (multiple). Chaque type présente des qualités particulières [99].

III.3.1. Nanoémulsion simple

a. Nanoémulsion directe : (notée H/E pour Huile dans Eau) dans laquelle de petites gouttelettes d'huile sont dispersées dans la phase aqueuse continue.

b. Nanoémulsion inverse : (notée E/H pour Eau dans Huile) dans laquelle de petites gouttelettes d'eau sont dispersées dans un milieu huileux.

III.3.2. Nanoémulsions multiples

Il s'agit de nanoémulsions ou de dispersions d'une nanoémulsion dans une phase dispersante [100]. La dispersion d'une nanoémulsion H/E dans une phase huileuse (H) : donne une nanoémulsion H/E/H. La dispersion d'une émulsion E/H dans une phase aqueuse (E) : donne une nanoémulsion E/H/E.

Dans les nanoémulsions multiples, on distingue trois phases : interne / intermédiaire et externe.

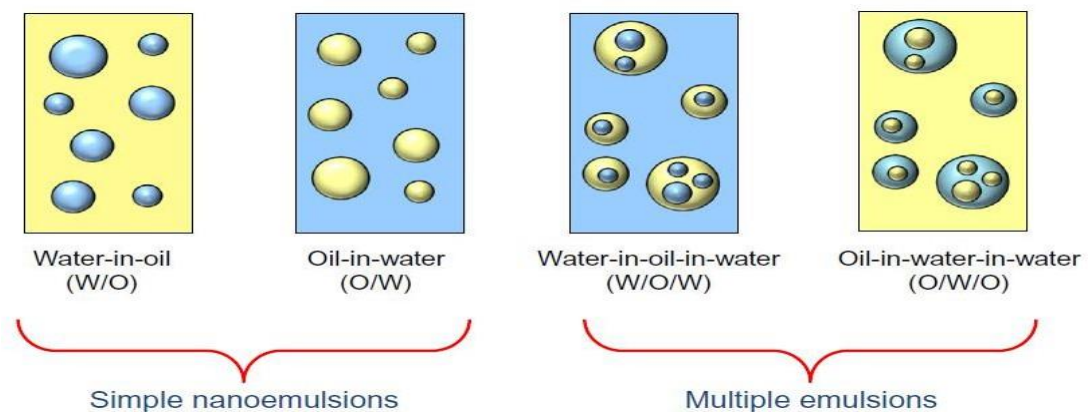


Figure III.1 : Les différents types des structures des nanoémulsions.

III.4. Propriétés physico-chimiques des nanoémulsions

Les nanoémulsions sont de plus en plus utilisées dans de nombreux domaines de par leurs propriétés physico-chimiques très intéressantes.

Apparence : Les gouttelettes étant petites, les ondes lumineuses sont de dispersion très faible. Cela permet la création de produits transparents [101].

✚ **Texture** : Le faible diamètre des gouttelettes influence également les propriétés rhéologiques, avec une très faible viscosité, semblable à l'eau. Les produits présentent donc un aspect fluide [101].

✚ **Stabilité** : Du fait que la faible taille des gouttelettes, la stabilité est meilleure [101].

Le principal seul mécanisme d'instabilité que peuvent subir les NEs est le mûrissement d'Ostwald.

III.5. Formulation des nanoémulsions

III.5.1. Méthode d'émulsification à haute énergie

Dans la méthode d'émulsification à haute énergie, les nanoémulsions sont émulsifiées grâce à des appareils à forces mécaniques qui permettent la formation de très fines gouttes. Ces méthodes sont sophistiquées et coûteuses car elles consomment beaucoup d'énergie. Elles garantissent l'uniformité des gouttelettes des nanoémulsions [102].

a. Homogénéisation à haute pression (HHP)

Ce procédé commence par la réalisation d'une émulsion grossière. Cette pré-émulsion est ensuite introduite dans l'homogénéisateur et elle passe à travers un petit orifice à une pression de fonctionnement comprise entre 500 et 5000 psi [103] afin de réduire la taille des émulsions à la taille souhaitée [100]. La figure ci-dessous illustre le principe :

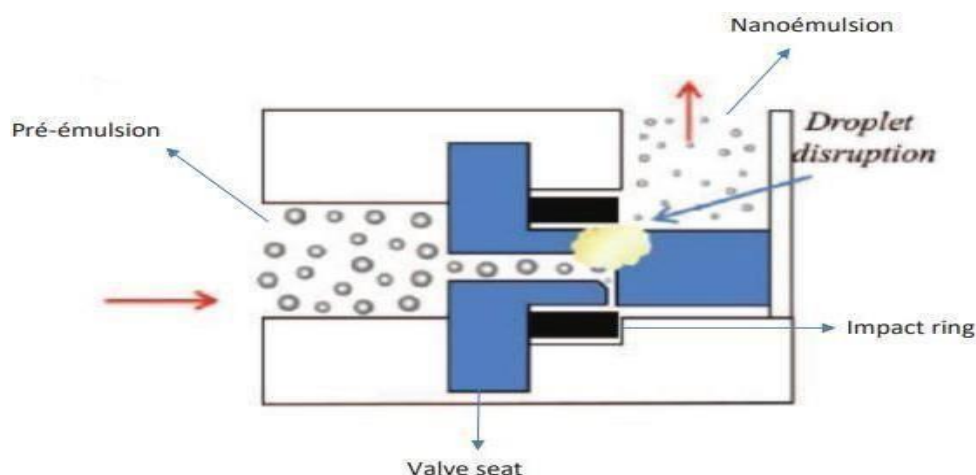


Figure III.2 : Schéma de fonctionnement d'un homogénéisateur à haute pression [103].

b. Emulsification assistée par ultrasons

L'émulsification assistée par ultrasons a attiré une attention considérable pour la fabrication des nanoémulsions en raison de sa capacité à produire de petites gouttelettes avec un bon rendement énergétique et un coût relativement faible [104].



Figure III.3 : Illustration de la sonde à ultrasons [104].

c. Emulsification par microfluidisation

La microfluidisation est la nouvelle technique la plus utilisée dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique afin d'obtenir des émulsions de petites gouttelettes [103]. Dans cette technologie, il s'agit d'une pompe forçant une pré-émulsion grossière dans un canal d'écoulement étroit, (Figure III.4). Cette conception entraîne la formation de très fines gouttelettes [105]. La microfluidisation est similaire aux HHP avec le seul changement dans la conception des canaux [100].

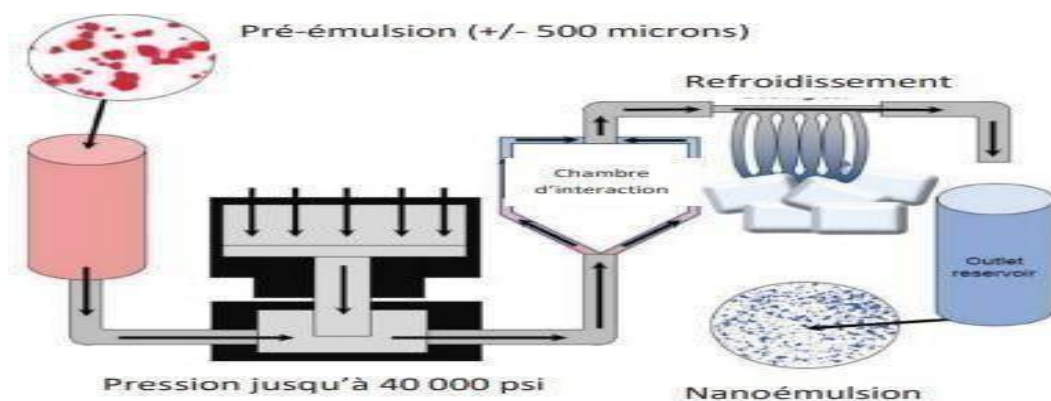


Figure III. 4: Représentation du principe de la microfluidisation [105].

d. Emulsification par ultrafiltration

Ce procédé est également appelé émulsification par membrane. Il a pour principe de forcer les

gouttelettes à traverser les pores d'une membrane très fine et dont la taille a été prédéfinie [106].

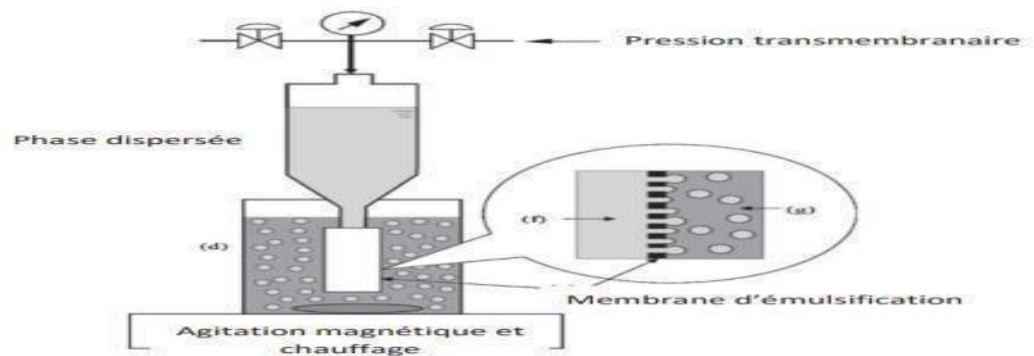


Figure III.5 : Représentation du procédé de l'émulsification par membrane [106].

III.5.2. Méthodes d'émulsification à faible énergie

Les procédés à faible utilisation d'énergie s'appuient sur le contrôle des phénomènes se produisant à l'interface [107]. Ces méthodes sont intéressantes car elles profitent de l'énergie stockée dans le système pour favoriser la formation de petites gouttelettes [108].

a. Emulsification spontanée

Les NEs sont générées par un simple mélange de deux phases liquides à température constante, ce qui va alors provoquer une forte perturbation à l'interface des deux phases avec une augmentation de l'aire interfaciale [109].

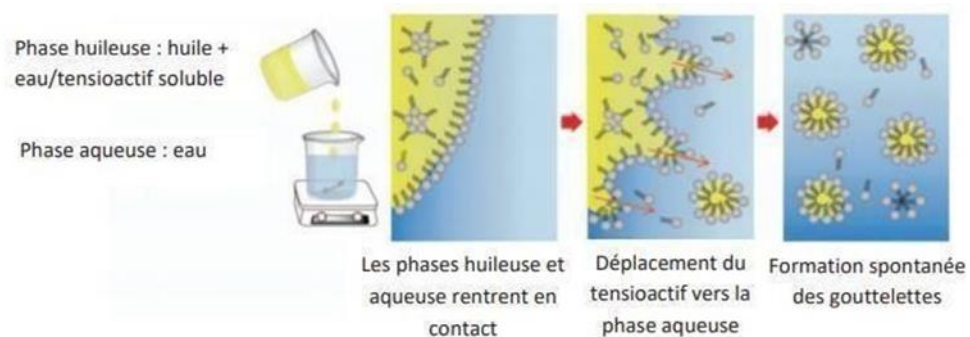


Figure III.6 : Illustration du phénomène d'émulsification spontanée [99].

b. Température d'inversion de phases (PIT)

La préparation des NEs par la méthode de température d'inversion de phases est divisée en 3 étapes principales [109].

- Formation d'une émulsion macroscopique laiteuse.
- Le mélange est chauffé progressivement jusqu'au point PIT au minimum.
- Enfin, la solution est rapidement refroidie à température ambiante sous agitation, provoquant la formation de nanoémulsions H/E.

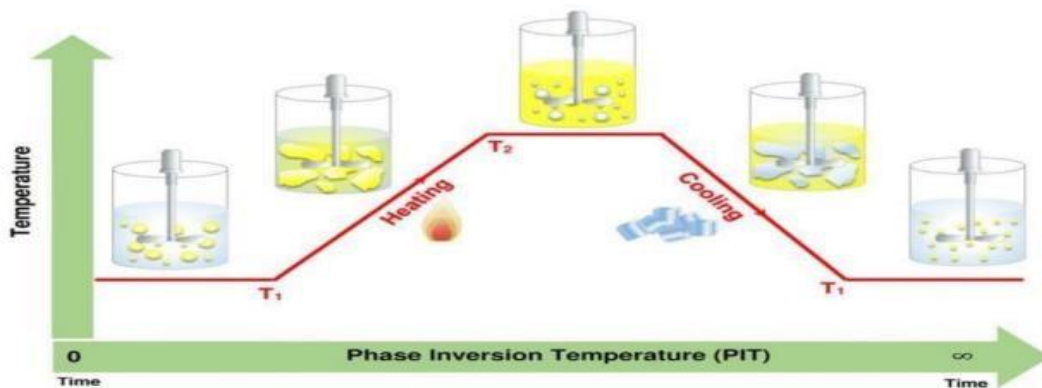


Figure III.7 : Illustration de la formation de nanoémulsions par la méthode PIT [99].

c. Inversion de phases par la composition(PIC)

Le processus de la préparation des nanoémulsions par la méthode PIC consiste à incorporer progressivement de l'eau dans le mélange huile-surfactant ou d'incorporer de l'huile dans le mélange eau-surfactant [99]. Cette méthode utilise moins de forces motrices par rapport à la méthode d'émulsification spontanée et elle modifie la composition tout en maintenant une température constante ; sans avoir besoin d'énergie thermique ni de solvants organiques ; elle est plus adaptée pour une fabrication à grande échelle que la méthode PIT.

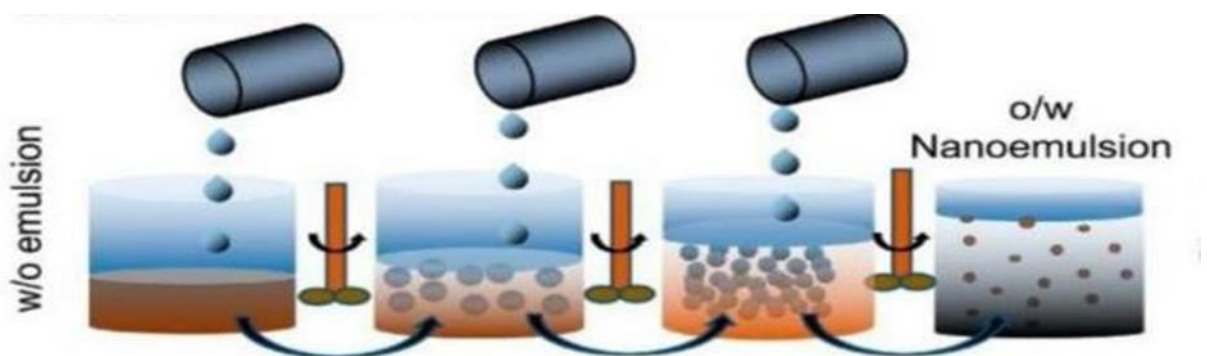


Figure III.8 : Illustration de la méthode Inversion de phases par la composition [99].

III.6. Mécanismes de déstabilisation

Les nanoémulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables à cause des interactions moléculaires défavorables qui se produisent à l'interface huile-eau en raison de l'effet hydrophobe. Plusieurs mécanismes peuvent se produire simultanément et la présence de l'un d'entre eux peut favoriser la survenue d'un autre [110].

III.6.1. Murissement d'Ostwald

Le mûrissement d'Ostwald est un processus par lequel les gouttelettes les plus petites rétrécissent alors que les plus grandes gouttelettes se développent.

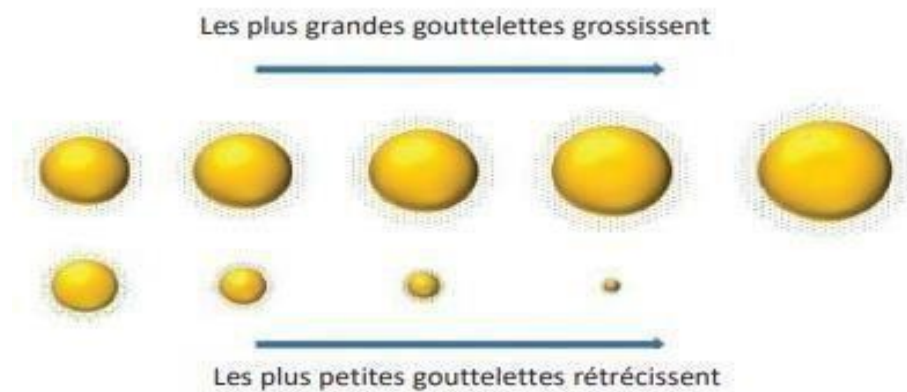


Figure III.9: Mûrissement d'Ostwald [110].

III.6.2. Agrégation des gouttelettes

les nanoémulsions sont des systèmes métastables, Il existe deux types d'agréations dans une NEs : la coalescence et la floculation ; ces agrégations sont formées à cause du déplacement des gouttelettes liées au mouvement Brownien, à la gravité ou à l'agitation mécanique [111].

a. Floculation

La floculation est le processus par lequel deux ou plusieurs gouttelettes d'une émulsion s'agglomèrent en raison des forces d'attraction qui agissent entre elles.

b. Coalescence

La coalescence est le phénomène par lequel des gouttelettes entrent en collision

et fusionnent entre elles conduisant à la formation d'une plus grosse gouttelette.

c. Séparation gravitationnelle

Ce phénomène se produit dès lors que la densité des gouttelettes est inférieure ou supérieure à celle du liquide environnant. Si les gouttelettes ont une densité plus faible, ces dernières auront tendance à remonter, c'est le *crémage*. Si elles ont une densité supérieure, elles auront tendance à descendre.



Figure III.10: Illustration des phénomènes de séparation gravitationnelle [111].

III.7. Contrôle de la stabilité

Les NEs peuvent être déstabilisées et perdre alors leurs propriétés. En effet, il est possible de ralentir ou d'inhiber ces phénomènes suite à plusieurs phénomènes de déstabilisation: électrostatique ; stérique; rhéologique et électro-stérique.

a. Stabilisation électrostatique

Cette méthode est utilisée dans les cas des phénomènes d'agrégation de gouttelettes. Elle a pour but d'envelopper les gouttelettes d'une double couche ionique et s'appuie sur la répulsion des charges de même signe.

b. Stabilisation stérique

Cette technique est utilisée pour prévenir les phénomènes de floculation [112]. Lors de l'utilisation de ce procédé, l'opérateur va ajouter des polymères dans le système, qui s'adsorbent à l'interface des gouttelettes. Celles-ci vont alors créer une barrière physique permettant d'augmenter la distance entre les gouttes.

c. Stabilisation rhéologique

La stabilisation rhéologique consiste à ajouter des agents permettant d'augmenter la

viscosité de la phase continue rendant alors les gouttelettes moins mobiles et la probabilité de choc plus faible [113].

d. Stabilisation électro-stérique

Cette méthode est la combinaison des deux mécanismes de stabilisation, électrostatique et stérique. Pour réaliser une stabilisation électro-stérique, il est nécessaire d'utiliser des stabilisants macromoléculaires ioniques tels que les protéines.

III.8. Définition des patchs transdermiques

Les patchs également connus sous le nom de systèmes d'administration transdermique de médicaments (TDDS) ou timbres transdermiques, sont des dispositifs conçus pour administrer et délivrer des doses de médicaments ou des agents thérapeutiques à travers la peau pour des effets locaux ou systémiques [114].

Leur développement a vu le jour au début des années 70 et le premier patch, approuvé par le FDA « Food And Drug Administration » en 1979, traitait le mal du transport [115]. Afin d'obtenir un débit contrôlé pendant une période donnée, des membranes spéciales sont incorporées. Il existe deux types de patchs [116] :

a. Les systèmes à réservoir :

Sont des composés d'une couche de support, un revêtement pour une protection externe imperméable à la substance active, d'une couche de protection à enlever avant l'application du patch, d'un compartiment réservoir contenant le médicament et d'une membrane perméable qui régule la diffusion à travers la peau.

a. Les systèmes dits matriciels :

Sont des systèmes qui comprennent des couches supérieures et inférieures identiques à celles du premier type, ainsi que des médicaments dissous et dispersés dans un polymère. La diffusion dans ce type de patchs est contrôlée essentiellement par les propriétés physico-chimiques des médicaments.

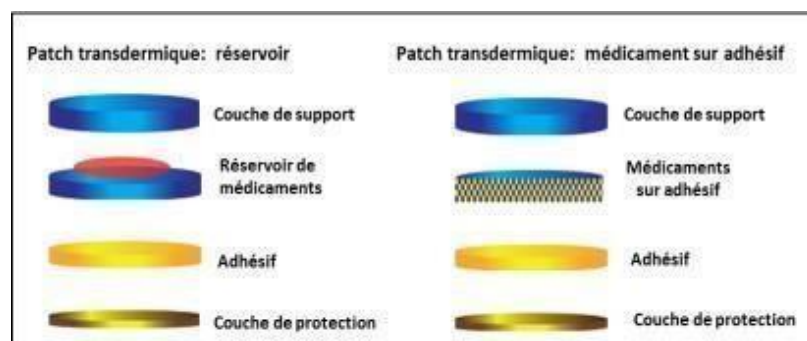


Figure III.11 : types de patchs transdermiques [116].

III.9. Délivrance transdermique des médicaments

La délivrance transdermique est une méthode indolore d'administration des médicaments par voie systémique, consistant à appliquer une formulation médicamenteuse sur une peau saine et intacte. Le médicament pénètre initialement dans la couche cornée, puis passe à travers l'épiderme et le derme plus profond sans accumulation de médicament dans la couche dermique [117].

III.10. La diffusion transdermique

La diffusion est un processus cinétique passif qui détermine le mouvement de molécules sous l'effet d'un gradient de concentration, d'une région de concentration élevée vers une région moins concentrée. La diffusion du médicament se fait alors de la surface de la peau vers les couches profondes jusqu'à ce que les concentrations soient à l'équilibre. Les molécules au contact de la surface de la peau se voient confronter à l'obstacle de la couche cornée. L'analyse approfondie de cette couche montre qu'elle est partiellement hydratée et 20 % de lipides, ceci explique la possibilité du passage et de la diffusion de substances liposolubles et hydrosolubles. Il existe deux chemins potentiels pour atteindre le derme : la voie intercellulaire et transcellulaire, comme présenté sur la Figure III.12.

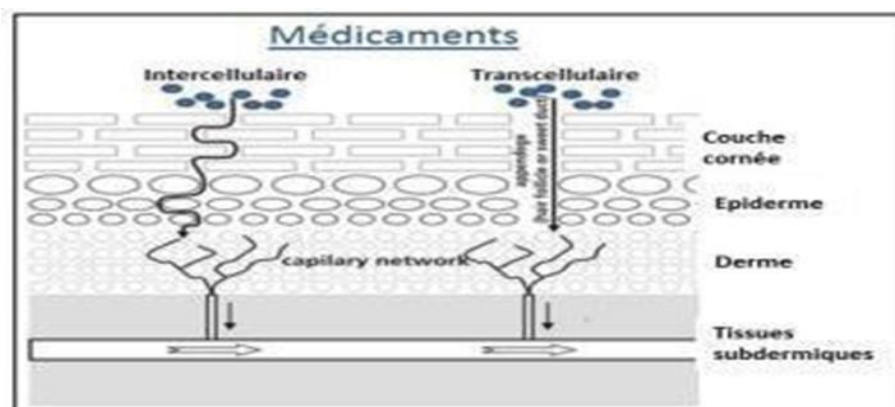


Figure III.12 : Voies de pénétration des molécules à travers la peau

Par la voie intercellulaire, les molécules passent à travers les espaces entre les cellules. Même si le chemin est plus long, cette voie est la plus rapide. La composition de bicouches lipidiques favorise les molécules lipophiles et hydrophiles. La voie transcellulaire est la plus directe, donc la plus courte mais aussi la plus résistante au passage des molécules. Ces dernières passent latéralement à travers les cellules de la couche cornée. Elle comporte aussi les conduits naturels comme les pores et les poils qui favorisent le passage des substances [118].

III.11. Intérêt de la voie transdermique

Le processus de diffusion est influencé par plusieurs facteurs qui peuvent être groupés en deux parties : des facteurs qui influencent l'efficacité de la barrière cutanée et des facteurs qui jouent sur le comportement des molécules vis-à-vis de cette barrière.

La première catégorie est liée au patient ; l'épaisseur de la couche cornée et le nombre de follicules. La variabilité intra et interindividuelle est un paramètre important à maîtriser, il peut changer selon la couleur de peau et l'âge du patient.

La deuxième catégorie est liée au principe actif; ce sont les propriétés physicochimiques et biologiques des molécules qui déterminent le taux de la diffusion et même la stabilité d'un produit médicamenteux [119].

Hormis ces facteurs qui pénalisent la diffusion, cette dernière présente d'autres limitations comme le nombre très réduit de candidats potentiels, la faible quantité diffusée du principe actif, ce qui amène à augmenter la taille du patch et prolonger son activation, et puis le manque de maîtrise et de contrôle de la dose administrée.

Du fait de ces restrictions conséquentes, des méthodes sont en cours de recherche pour promouvoir la diffusion et atteindre une efficacité thérapeutique significative. Ces techniques peuvent être physiques comme l'électroporation, les microaiguilles, la sonophorèse et l'ionophorèse. Ou chimiques se basant sur des techniques liées à la perturbation d'une façon réversible de la couche cornée en la rendant plus perméable à une large gamme de molécules [120].

L'administration des médicaments par voie transdermique présente de nombreux avantages [121]:

- La libération du principe actif est très souvent prolongée par rapport à une administration orale, ce qui permet de diminuer la fréquence de doses et donc favorise l'observance.
- D'un point de vue pharmaceutique, cette forme permet une libération continue et prolongée de principe actif dans la circulation générale.
- Il n'y a pas d'effet de premier passage hépatique, ce qui permet de diminuer les doses administrées et les effets secondaires.
- L'effet pharmaceutique peut être facilement stoppé par retrait du dispositif.

Chapitre IV
Matériels et Méthodes

IV.1. Introduction

La présente étude a déroulé au sein de laboratoire génie chimique du département de génie des procédés (Université de Blida 1), la première phase de la partie expérimentale consistait en l'extraction des substances bioactives de la partie aérienne de la plante *Teucrium polium L.* La méthode d'extraction par soxhlet a été utilisée pour l'obtention de l'extrait brut et l'huile essentielle a été récupérée par Clevenger. Les tests biologiques ont été réalisés sur l'extrait et l'HE par évaluation des activités antioxydantes par le protocole du DPPH et FRAP et l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Les extraits et l'HE obtenus ont été incorporés en qualités de principes actifs dans des formes galéniques innovantes ; les nanoémulsions et caractérisés par des méthodes physico-chimiques et rhéologiques pour à la fin concevoir des patchs transdermiques. A activité cicatrisante. Cette dernière a été évaluée *in-vivo* sur des rats Wistar.

IV.2. Matériel végétal

IV.2.1. La récolte de la plante

Les parties aériennes (feuilles, fleurs et tiges) de *Teucrium polium L.* ont été récoltées dans la région de Dirrah wilaya de Bouira, en période de floraison ; de mai à juin 2020, à une altitude de 525 m (36° 22' 00" N, 3° 53' 00" E). Les échantillons ont été identifiés et authentifiés au laboratoire botanique du département de biotechnologie (Université de Saad Dahlab Blida 1, Algérie), en collaboration avec l'Herbier de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, d'El-Harrach, Alger.

IV.2.2. Préparation des échantillons

La matière végétale collectée a été triée et débarrassée de matières étrangères, ensuite séchée à température ambiante, à l'air libre à l'ombre, jusqu'à la stabilisation de la masse (pendant 15 jours) afin d'éviter d'éventuelles risques d'oxydation des polyphénols et de préserver au maximum l'intégrité des molécules. Une fois la plante complètement séchée, elle a été broyée en poudre fine à l'aide d'un broyeur à couteau. La poudre végétale obtenue a été ensuite récupérée, conservée et stockées dans des sacs propres dans un environnement sombre et à température ambiante (25°C ± 2°C) jusqu'à l'utilisation.

IV. 3. Procédé d'extraction de la fraction éthanolique

IV. 3.1. Extraction avec l'éthanol

L'extrait éthanolique a été obtenu par extraction d'une quantité de 10g de la matière végétale avec 100 mL d'EtOH (96%) à l'aide d'un appareil Soxhlet pendant 6 heures, l'extrait éthanolique a subi une évaporation sous vide dans un évaporateur rotatif de type Heidolph à une température de 40°C. Cette méthode adoptée est similaire à la méthode décrite par Chirane et al [122], avec quelques modifications.

IV. 3. 2. Calcul du rendement de l'extrait

Le rendement déterminé après évaporation totale du solvant, est exprimé en pourcentage par rapport au poids sec et est calculé par la formule suivante.

$$R (\%) = \frac{m_{ext}}{m_{éch}} * 100$$

m_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

$m_{éch}$: la masse de l'échantillon végétale séchée en g.

IV.4. Criblage phytochimique

Afin d'évaluer la composition et déterminer les groupes chimiques majoritaires (métabolites secondaires) retrouvés dans la plante, deux solvants de polarités différentes ont été utilisés (Eau, EtOH). Le principe a été basé soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur formation de complexes colorés en utilisant des réactions de colorations [123].

IV.4.1. Extrait aqueux (E2)

Il consiste à introduire 1g du matériel végétal dans 20 mL d'eau distillée, l'ensemble a été agité pendant deux heures à l'air ambiant, le mélange a été filtré et l'extrait aqueux a été soumis aux différents tests.

IV.4.2. Extrait aqueux (E2)

Il consiste à introduire 1g du matériel végétal dans 20 mL d'eau distillée, l'ensemble a été agité pendant deux heures à l'air ambiant, le mélange a été filtré et l'extrait aqueux a été soumis aux différents tests.

IV.4.3. Extrait éthanolique (E3)

Une quantité de 1g de poudre végétale a été mise en contact avec 20mL d'EtOH, l'ensemble est macéré pendant deux heures à l'air ambiant, le mélange est filtré et l'extrait éthanolique a été soumis aux différents tests. Les différents composants de l'extrait sont :

a. Dosage des Saponosides

L'identification des saponosides a été réalisée en ajoutant une faible quantité d'eau à 2mL de l'extrait aqueux, la solution a été par la suite fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé au repos pendant 20 minutes [124]. La formation d'une mousse (hauteur supérieure à 1 cm) stable, persistante indique la présence de saponines [125, 126]. La teneur en saponosides a été évaluée selon les critères décrits par Trease et Evans, 1987 et sont les suivants :

- Pas de mousse = test négatif
- Mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- Mousse de 1-2 cm = test positif
- Mousse plus de 2 cm = test très positif

b. Dosage des Alcaloïdes

Une quantité de 3mg du matériel végétal a été mise en contact avec 15mL d'acide sulfurique (H_2SO_4) (10%) [127]. L'ensemble a été mis sous agitation pendant 3 heures. Ensuite, le mélange est filtré et le filtrat a été réparti dans trois tubes ;

Dans le premier tube : 1mL de filtrat plus 3-5 gouttes **du réactif de Mayer**, un test positif a été révélé par l'apparition d'un précipité blanc-jaunâtre. [128]

Dans le deuxième tube : 1mL de filtrat plus 2-5 gouttes **du réactif de Bouchardat**. S'il apparaît un précipité brun, donc on est en présence d'alcaloïdes. [125, 126]

Dans le troisième tube : 1mL de filtrat plus 5 gouttes **du réactif de Dragendorff**. L'apparition d'un précipité rouge orangé indique la présence des alcaloïdes [123, 127].

c. Dosage des Polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a permis d'identifier les polyphénols, une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% a été ajoutée à 2mL d'extrait aqueux, l'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence des polyphénols [123].

d. Dosage des Flavonoïdes

1g du produit végétal a été macéré dans 15mL d'HCl à 1% pendant une nuit. Après filtration, les tests suivants ont été réalisés.

Prise de 10mL du filtrat, l'alcaliniser avec du NaOH. L'apparition de la couleur jaune-orange indique la présence de flavonoïdes [125].

L'ajout à 5mL du filtrat, 2,5mL d'alcool amylique (pentanol), la phase alcoolique colorée en jaune indique la présence de flavonoïdes libres (génine) [124].

e. Dosage des Anthocyanes

5mL de la solution d'acide sulfurique H_2SO_4 à 10% a été ajouté à 5mL de l'extrait aqueux puis l'ajout de 5 gouttes d'hydroxyde d'ammonium NH_4OH à 25%. Une coloration rouge en milieu acide et bleue violacée en milieu basique indique la présence des Anthocyanes [124, 125].

f. Dosage des Tanins

La présence des tanins a été mise en évidence par l'addition à 1mL d'extrait éthanolique de la plante 2mL d'eau et de 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée à 1%. Un test positif a été révélé par l'apparition d'une coloration bleue-verte. L'apparition d'une coloration verte foncée a indiqué la présence des tanins catéchiques et l'apparition d'une coloration bleue-verte a indiqué la présence des tanins galliques [124, 127].

Tanins catéchiques (Stiasny)

A 1 mL de l'infusion, 0,5mL de réactif de Stiasny a été ajouté, le mélange obtenu a été chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 minutes. L'apparition d'un précipité rose clair a montré la présence des tanins catéchiques [124].

Tanins galliques

Pour révéler la présence des tanins galliques, on filtre le mélange précédemment chauffé et on prélève 0,5mL du filtrat. Le filtrat est ensuite saturé avec 10mL de l'acétate de sodium 1%, on ajoute à ce mélange, 100µL d'une solution de FeCl_3 à 1%. Le développement d'une teinte bleu-noire indique la présence des tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny [124].

g. Dosage des Composés réducteurs

Les sucres réducteurs ont été mis en évidence dans l'extrait aqueux par le réactif de Fehling. La détection des composés réducteurs consiste à traiter 5mL d'extrait aqueux avec 5mL de liqueur de Fehling. Puis chauffer au bain-marie à 70°C de 2-3 minutes. La formation d'un précipité rouge brique indique une réaction positive [126].

h. Dosage des Anthraquinones libres

On a ajouté 5mL d'une solution de l'ammoniaque (NH_4OH) (20 %) à 10mL de l'extrait éthanolique ou aqueux avec agitation. L'apparition d'une coloration plus ou moins rouge a indiqué la présence des anthraquinones libres [123].

i. Dosage des Terpénoïdes

A 1mL de l'extrait éthanolique ou aqueux, on a ajouté 0,4mL de chloroforme (CHCl_3) et 0.6mL de H_2SO_4 concentré. La présence des terpénoïdes est mise en évidence par l'apparition d'un anneau marron à l'interface [129].

j. Dosage des Quinones

1g de poudre végétale a été macéré dans 15 à 30mL d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 heures, les extraits ont été filtrés et concentrés à l'évaporateur rotatif. La

présence des quinones libres est confirmée par l'ajout de quelques gouttes de NaOH à 10%, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet [124].

k. Dosage des Coumarines

Les coumarines ont été révélées à partir de 2mL de l'extrait aqueux placé dans un tube dans lequel sont ajoutés 3mL de NaOH (10%). Après agitation de la solution, l'apparition d'une couleur jaune indique la présence des coumarines [124].

l. Dosage des Huiles essentielles

1g de matériel végétale a été introduit dans 10mL de dichlorométhane puis l'extrait a été évaporé à sec. Le résidu a été ensuite dissous dans 3mL d'éthanol. Puis, la solution a été évaporée à sec de nouveau. La sensation d'une odeur parfumée indique la présence d'huiles essentielles [127].

IV.5. Dosage des polyphénols totaux

- **Le principe**

Les polyphénols ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu, cette méthode permet de connaître le contenu polyphénolique total d'un échantillon donné. Le réactif FCR est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), de coloration jaune [12]. Cette méthode conduit à la formation de produits de réduction de couleur bleue [130]. L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon analysé par UV/ visible à une longueur d'onde de l'ordre 760 nm.

- **Mode opératoire**

La détermination du taux des polyphénols totaux a été réalisée par la méthode décrite par Chirane M., et al 2019 [122]. 0.25mL de l'extrait éthanolique de la partie aérienne a été mélangé avec 1.25mL de 10% (v/v) du réactif de Folin-Ciocalteu après 3 minutes de réaction.

1mL de la solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à une concentration de 75 g/L sont ajoutés. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (Hetachi U 5100).

Les concentrations des polyphénols ont été déduites à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage établie avec un polyphénol standard acide gallique. Les résultats sont exprimés en

milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait. Les tests ont été répétés trois fois afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

IV.6. Dosage des flavonoïdes totaux

- **Le principe**

Le dosage des flavonoïdes est réalisé à l'aide de la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium (AlCl_3) qui forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et qui absorbe dans le visible à 415 nm.

- **Mode opératoire**

La détermination du taux des flavonoïdes totaux a été réalisée par la méthode décrite par Jaadan H., et al 2020 [131].

Une quantité de 2mL de l'extrait et de standard a été ajoutée à 0.1mL de la solution d' AlCl_3 (10 % (m / v)), 0.1mL d'acétate de sodium (1 M) et 2,8mL d'eau distillée. Le mélange a été agité et incubé pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 415 nm par UV/VIS.

Les concentrations en flavonoïdes ont été déduites à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage établie avec un flavonoïde standard Quercétine (0 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 $\mu\text{g/mL}$) et les résultats sont exprimés en milligramme équivalent Quercétine par gramme d'extrait. Les tests ont été effectués trois fois afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

IV.7. Evaluation de l'activité antioxydante

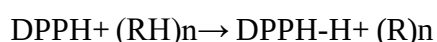
Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des composés phénoliques, des huiles essentielles, des aliments et des systèmes biologiques. La plupart de ces méthodes sont basées sur la coloration ou la décoloration d'un réactif dans un milieu réactionnel. Dans ce contexte, le pouvoir antioxydant des extraits et des huiles essentielles de la partie aérienne de la plante *Teucrium polium L* a été réalisé par les méthodes :

IV. 7.1.La méthode au DPPH

- **Le principe du pouvoir du piégeage du radical DPPH'**

La méthode du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) est la plus simple à réaliser [132]. Le DPPH est considéré comme un composé modèle pour les radicaux libres des produits naturels.

Le DPPH[•] (2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle) est un radical libre stable, dû à la délocalisation de l'électron de réserve sur la molécule entière. Ainsi, DPPH[•] ne se dimérise pas, comme c'est le cas avec la plupart des radicaux libres. La délocalisation sur la molécule DPPH[•] détermine l'apparition d'une couleur pourpre, avec une bande d'absorption avec un maximum d'environ 517nm. Lorsque DPPH[•] réagit avec un donneur d'hydrogène, la forme réduite (DPPH) est générée, accompagnée de la disparition de la couleur violette [130, 133]. Par conséquent, la diminution de l'absorbance dépend linéairement de la concentration en antioxydant. On peut résumer la réaction de la manière suivante:



Où (RH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picrylhydrazine (jaune).

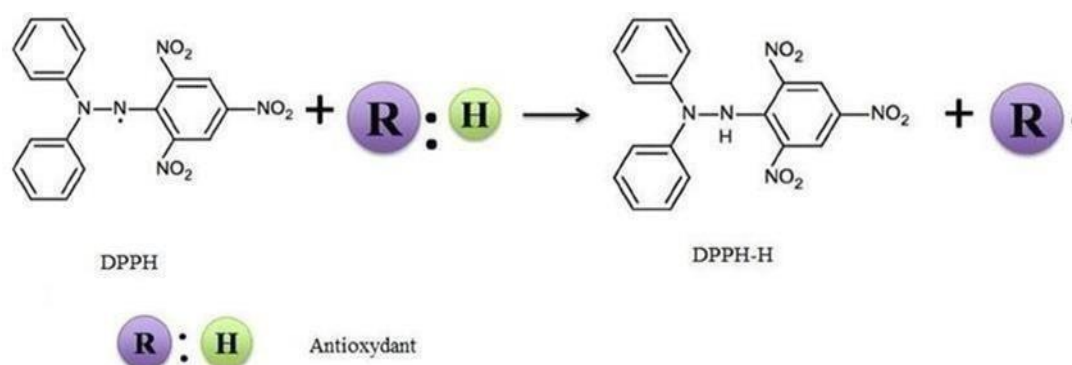


Figure IV.1 : Réaction entre le radical DPPH[•] et l'antioxydant pour former DPPH stable [134].

• Mode opératoire

Pour étudier l'activité anti radicalaire des différentes concentrations de l'extrait éthanolique de *Teucrium polium* L, on a opté pour la méthode qui utilise le DPPH (diphénylpicryl-hydrazyl) comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par Meriga, B., et al 2012 [135].

Pour la solution d'extrait éthanolique (**E1**), 200µL de (**E1**) de la plante à différentes concentrations (0 ; 20 ; 40; 50 ; 70 ; 90 ; 100 µg/mL) a été ajouté à 800µL de la solution de

DPPH (0.004% préparée dans le méthanol). Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 200µL de méthanol avec 800µL de la solution méthanolique de DPPH.

Pour l'huile essentielle, 200µL de l'huile essentielle de la plante à différentes concentrations (0 ; 1.25 ; 2.5; 5 ; 10 ; 20 ; 40 µL/mL) ont été ajoutés à 800µL de la solution de DPPH (0.004% préparée dans le méthanol). Parallèlement, un contrôle négatif a été préparé en mélangeant 200µL de méthanol avec 800µL de la solution méthanolique de DPPH.

La lecture de l'absorbance a été faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

Le contrôle positif a été représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. Le pourcentage d'inhibition a été estimé selon l'équation ci-dessous :

$$PI \% = \frac{(Abs\ controle - Abs\ échant)}{Abs\ controle} * 100$$

IV. 7.2. La méthode FRAP

- **Le principe du pouvoir antioxydant réducteur ferrique**

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique permet de mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) [136], de couleur bleu.

- **Mode opératoire**

Le pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) des extraits testés a été déterminé selon la procédure d'AL Atki et al 2020 [137].

200µL d'extrait ont été mélangés avec 500µL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 500µL de ferricyanure de potassium [$K_3Fe(CN)_6$] 1%. La solution obtenue a été incubée à 50°C pendant 20 minutes. Le mélange a été acidifié avec 500µL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% qui a ensuite été centrifugé à 3000 tr / min pendant 10 minutes. La couche supérieure de la solution (2,5 mL) a été mélangée avec 500µL d'eau distillée et 100 µL de $FeCl_3$ (0,1%), et l'absorbance a été mesurée à 700 nm (Hitachi U 5100). Le BHT était utilisée comme standard. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé [122, 138].

IV.8. Activité antibactérienne

La méthode de diffusion sur disque a été employée pour la détermination et l'évaluation de l'activité antibactérienne *in vitro*. A cet effet, l'extrait éthanolique et l'huile essentielle ont été testés contre plusieurs bactéries de type Gram⁺ et Gram⁻.

IV.8.1. Souches utilisées

Dans notre étude, les souches testées sont des bactéries pathogènes, deux souches de type Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) et deux souches de type Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633). Toutes les souches bactériennes ont été conservées à 4-5°C dans des tubes préalablement stérilisés et remplis de 10mL de gélose nutritive inclinée.

IV.8.2. Préparation de l'inoculum

Pour préparer l'inoculum, 5 colonies similaires, des souches bactériennes jeunes, bien isolées ont été prélevées à l'aide d'une anse en plastique puis transférées dans des tubes contenant de l'eau distillée stérile.

La suspension bactérienne obtenue a été secouée pendant 15 -30 secondes jusqu'à son homogénéisation, afin d'avoir une turbidité voisine à celle de 0,5 Mc Farland [139], soit une densité optique égale à 0,08 à 0,10; lue à une longueur d'onde de 625 nm correspondant à 10⁸UFC/mL (Unité Faisant Colonie) [140].

IV.8.3. La technique de diffusion en milieu gélosé

Le test de la sensibilité des bactéries a été réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé, encore appelée méthode des disques [17, 141]. Dont 15mL de gélose Mueller Hinton (MH) ont été coulés dans des boîtes de Pétri stériles et laissés pendant 20 minutes. Après solidification, 1mL de suspension bactérienne de 10⁸UFC/ml [34], a été inoculée par inondation sur toute la surface de gélose MH. Des disques stérile de 6mm de diamètre ont été imprégnés d'un volume de (5µL– 10µL) [142], des concentrations croissantes de l'extrait éthanolique (25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 ; 200 ; 300; 400 mg/mL et l'extrait brut) et des concentrations croissantes de l'HE (2,5; 5; 10; 20; 40; 80 µL/mL) ont été placés à la surface du milieu solidifié. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

L'effet antibactérien a été évalué par la mesure des zones d'inhibition contre le test des

souches bactériennes [32]. Plus la zone d'inhibition est grande plus le germe est sensible [143].

Les résultats sont symbolisés par des signes suivant la sensibilité des souches vis-à-vis de l'extrait [20].

Résistant (-) : $\varnothing < 08 \text{ mm}$

Sensible (+) : $09 < \varnothing < 14 \text{ mm}$

Très sensible (++) : $15 < \varnothing < 19 \text{ mm}$

Extrêmement sensible (+++) : $\varnothing > 20 \text{ mm}$

Le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de notre extrait. La sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait [143] et les antibiotiques utilisés comme composés de référence sont : Gentamicine [61] et Tetracycline [34, 61].

Des essais témoins ont été effectués in vitro pour le DMSO pur vis-à-vis de chaque type de souche bactérienne.

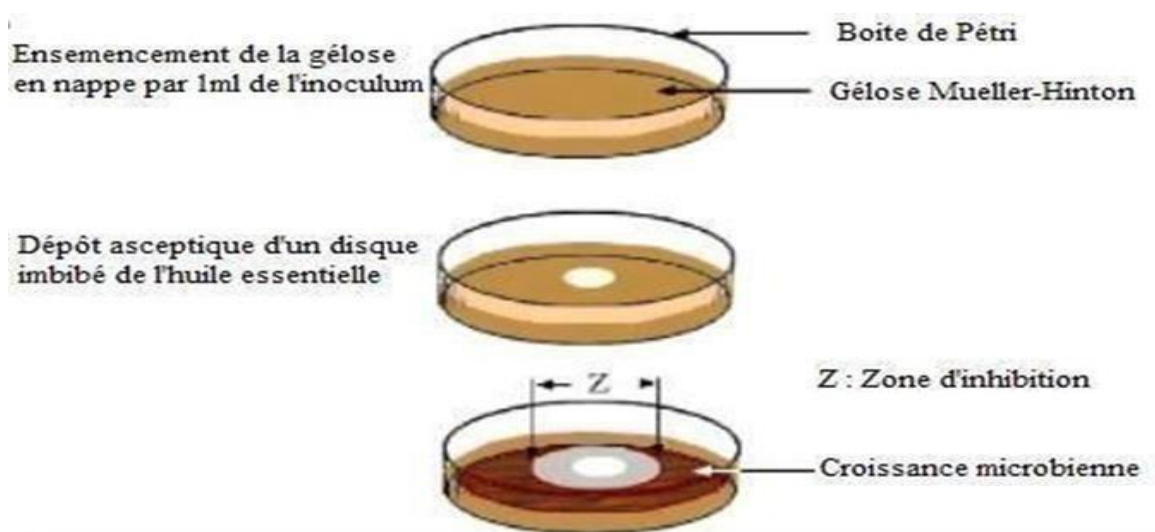


Figure IV.2 : Illustration de la méthode d'antibiogramme [144].

IV.8.4. Concentrations minimales inhibitrices (CMI)

La détermination des CMI est faite en utilisant la méthode de micro-dilution en milieu gélosé à partir d'une gamme de concentrations de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle. Une série de dilutions a été réalisée à partir de la solution mère (1000 mg/mL) pour l'extrait et une solution mère (100 $\mu\text{L/mL}$ de l'HE préparée dans 500 $\mu\text{L/mL}$ de DMSO pur). Ces

concentrations sont de (25 ; 50 ; 75 ; 100 ; 150 ; 200 ; 300 et 400 mg/mL) pour l'extrait éthanolique et de l'ordre de (2,5; 5; 10; 20; 40 et 80 µL/mL) pour l'huile essentielle. .

2mL de chaque dilution sont alors incorporés à 38mL de milieu Muller Hinton. Les mélanges sont immédiatement répartis dans deux boîtes de pétrie à raison de 20mL par boîte. Après solidification, l'inoculation des géloses, contenant l'extrait ou non (témoin), est effectuée en surface sous forme des dépôts de 1µL de chaque souche microbienne. Après incubation à 35°C pendant six jours, la croissance est comparée à celle du témoin. La CMI est définie comme la plus petite concentration de produit pour laquelle aucune croissance bactérienne n'est visible comparativement au témoin.

IV.9. Analyse de l'extrait par LC-MS/MS

- **Le principe**

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, est une technique analytique puissante qui combine les capacités de séparation de la chromatographie liquide (LC) avec les capacités d'analyse chimique de la spectrométrie de masse (MS). La chromatographie liquide (LC), consiste à dissoudre l'échantillon dans un solvant ensuite le passer à travers une colonne contenant une phase stationnaire. Les différents composants d'un mélange interagissent de manière différente avec ce matériau et se déplacent à des vitesses différentes, ce qui permet leur séparation. Après la séparation par (LC), les composés seront analysés par spectrométrie de masse (MS) qui fournit des informations plus précises avec l'identification des composés basée sur leurs masses moléculaires et leurs structures.

Cette combinaison de deux techniques de pointe offre une sensibilité élevée dans l'identification et la quantification précises de composés dans des échantillons complexes.

- **Mode opératoire**

L'analyse quantitative des composés phénoliques dans l'extrait brut de *T. polium* a été réalisée par LC-MS/MS (Agilent Technologies 1260 Infinity II, spectromètre de masse Triple Quad 6460). Une colonne Poroshell 120 SB-C18 (3,0 × 100 mm, ID, 2,7 µm) a été utilisée d'après Erenler et al [145].

Dans ce processus, des échantillons de 50 mg ont été transférés dans des tubes Penendorf, puis 2 mL d'éthanol ont été ajoutés à la solution obtenue qui a été bien agitée, puis soumise à une extraction à l'hexane, suivie d'une centrifugation à 9 000 tr/min pendant 10 minutes. De la phase méthanolique dans la solution résultante, un volume de 100 µL a été prélevé et dilué à

900 μ L en utilisant un mélange de 450mL d'eau et de 450mL de méthanol.

L'échantillon dilué résultant a été filtré et analysé par LC/MS-MS avec un volume d'injection mobile constituée de 5,12mL, un débit de 0,400 mL/min, un temps de traitement de 30 minutes, de l'acide formique (0,1 %) et du formiate d'ammonium (5,0 mM) dans de l'eau A dans du méthanol B ont été utilisés pour la phase mobile. Le programme de gradient pour la phase mobile B a été ajusté à 25 % pendant 1 à 3 min, 50 % pendant 4 à 12 min, 90 % pendant 13 à 21 min et 3 % pendant 22 à 25 min pour la phase mobile B. La température de la colonne était de 40°C. La tension capillaire était de 4 000 V, le débit de gaz de nébulisation (N_2) était de 11 L/min et la pression était de 15 psi, la température du gaz était de 300°C.

IV.10. Formulation des nanoémulsions

Les nanoémulsions ont été préparées par la méthode d'émulsification spontanée en utilisant l'extrait brut comme principe actif [146]. La phase aqueuse contenant l'extrait éthanolique dissous dans l'eau (6% m:V) a été mélangée avec la phase huileuse contenant de l'huile oléique et du Span 80 (10% V:V), tout en agitant avec un agitateur magnétique à 350 tr/min et chauffé à 40°C pendant 20 min pour conférer au mélange un aspect homogène. L'émulsion a été préparée par l'ajout du tampon phosphate pH 7,0 goutte à goutte à la phase huileuse en agitant constamment, en continu pendant 1 h à 40°C.

IV.11. Caractérisation des nanoémulsions

- **Mesure de la distribution de taille des nanoémulsions par Dls**

La taille moyenne des NEs obtenues a été mesurée par diffusion dynamique de la lumière. Les mesures ont été effectuées avec un granulomètre de marque HORIBA (SZ-100, USA).

Les diamètres hydrodynamiques ont été calculés à partir de la fonction d'autocorrélation de l'intensité de la lumière diffusée par les particules. Tous les échantillons ont été dilués avec de l'eau distillée (1: 5) (v/v) avant d'être placés dans la cellule en verre. Toutes les mesures ont été effectuées à 25°C.

- **Potentiel zêta**

Le taux de mouvement des particules sous l'influence d'un champ électrique oscillant externe a été mesuré avec un Zêta-mètre HORIBA (SZ-100, USA). Le potentiel zêta a été calculé à partir de la valeur de la mobilité électrophorétique.

Tous les échantillons ont été dilués puis placés dans une cellule de type GOLD PLATING de 6 mm de diamètre, Toutes les mesures ont été effectuées à 25°C.

- **Etude de la stabilité thermodynamique des NEs**

Le test de stabilité thermodynamique de la NEs a été réalisé par contrôle de la stabilité des phases. Les NEs ont été diluées avec de l'eau distillée (1:5) (v/v). Les différentes formulations ont été observées visuellement après 24h de repos, ensuite chaque semaine pendant un mois.

- **Etudes du comportement rhéologique**

Des mesures de viscosités sous cisaillement et de viscoélasticités ont été réalisées afin de quantifier le changement du comportement d'un état liquide vers un état gel en utilisant un rhéomètre MCR302 avec une géométrie cône- plan (un diamètre de 60 mm, un angle de 1° à T 20 °C) pour les dispersions qui sont très visqueuses et les gels.

IV.12. Evaluation de l'activité cicatrisante

Pour évaluer l'effet cicatrisant de l'extrait éthanolique et la nanoemulsion élaborée à base de l'extrait de la plante *T. polium L*, un modèle de plaie d'excision a été réalisé sur 20 rats albinos Wistar sains, issus de l'institut Pasteur d'Alger, d'un poids approximatif de 200±20g. Les animaux ont été répartis en 4 lots égaux.

Une fois l'animal anesthésié par une injection du kétamine et d'acépromazile, il a été placé en décubitus ventral sur la table. Il a été maintenu en position à l'aide de ruban adhésif à l'extrémité des membres antérieurs et postérieurs. Une surface au dos du rat a été rasée à l'aide d'une lame de rasoir. Cette zone a été complètement nettoyée et désinfectée par l'alcool et le coton et d'une solution antiseptique à base de povidone iodée (Bétadine solution ND), appliquée avec des compresses, ensuite un cercle de 2 cm de diamètre été tracé sur la peau de la région dorsale de chaque animal. Puis sur le lieu de l'excision marqué, un lambeau de peau a été excisé. Il s'agit d'une excision dermique profonde. Juste après l'intervention chirurgicale, les plaies d'excision ont été immédiatement traitées et ont reçu une application topique du produit destiné au lot respectif :

Lot 1 : Témoin (non traité).

Lot 2 : Traité avec un médicament de référence (Cicatryl bio).

Lot 3 : Traité par l'extrait éthanolique.

Lot 4 : Traité par la nanoemulsion à base de l'extrait éthanolique.

Les animaux ont été maintenus dans des conditions normales de 20±1°C et d'humidité relative 55±10% avec un cycle de 12 heures de luminosité et d'obscurité et une alimentation normale dans des cages individuelles.

Les préparations ont été appliquées localement (par voie topique) une fois par jour par rat jusqu'à la cicatrisation complète de la plaie. La diminution progressive de la zone de la plaie de chaque animal a été surveillée pendant 18 jours (les 0, 4^e, 8^e, 12^e, 15^e, et 18^e jours) après la blessure dans tous les groupes et les surfaces de la plaie ont été mesurées. [24]

La zone de la plaie a été mesurée par le logiciel *imageJ* sur la plaie et le pourcentage de fermeture de la plaie a été calculé selon la formule suivante [56, 57].

$$Pfp \% = \frac{\text{zone de la plaie au jour zéro} - \text{zone de la plaie au jour } X}{\text{zone de la plaie au jour zéro}} * 100$$

Pfp : pourcentage de fermeture de la plaie

X : nombre de jours

IV. 13. L'étude histologique

A la fin de l'expérience, au jour 18, les animaux ont été sacrifiés. Les tissus des tranches (la zone de peau cicatrisée et 0,5 cm de peau intacte à partir de la limite extérieure) ont été sélectionnés pour une évaluation histologique. Des échantillons de peau ont été fixés dans du formol à 10 % pendant 3 jours. Les tissus traités selon les procédures normales ont été déshydratés en les faisant passer dans plusieurs bains d'éthanol. Ensuite, ils ont été décantés dans deux bains de xylène et inclus en paraffine dans deux bains successifs à 60°C. Les blocs de paraffine obtenus ont ensuite été découpés au microtome, réhydratés et colorés à l'hématoxyline-éosine et enfin montés sur une lame microscopique, pour évaluer les paramètres de ce tissu au microscope.

IV.14. Elaboration du patch transdermique

Le patch transdermique optimal contenant de NEs était préparé par la technique

d'évaporation de solvant [147]. Le support a été préparé en dissolvant 2% (m/V) solution d'alcool polyvinylique (PVA) dans de l'eau distillée. Après la dissolution totale du PVA, un volume de 5mL de la solution obtenue est coulé dans des boîte de pétri et suivi d'un séchage à 60°C pendant 6 h. Le réservoir de médicaments est préparé en dissolvant une quantité de 2.5g d'Ethyle cellulose (EC) dans 25mL d'éthanol et a été mélangé avec 15% (p /p) du glycérol comme plastifiant. 7mL de la solution obtenue a été coulée dans des boîtes de Pétri et elle a été laissée sécher à l'air libre à température ambiante, des films de surfaces homogènes ont été formés. Après la préparation du réservoir de médicaments, 3mL des NS ont été incorporée sur le film préparé [148]. Et enfin laissé sécher à l'air libre pendant 48 h.

IV.15. Caractérisations des patchs

IV. 15.1.Caractérisations physico-chimiques des patchs

- **Épaisseur**

L'épaisseur des patchs a été mesurée à trois différents endroits à l'aide d'un micromètre et les valeurs moyennes ont été calculées [149].

- **Variation de poids**

Les patchs ont été soumis à une variation de masse en appuyant individuellement sur les patchs sélectionnés au hasard [148].

- **Endurance au pliage**

L'endurance au pliage a été déterminée en pliant plusieurs fois et au même endroit le patch jusqu'à la fracture, c'est une condition permettant d'indiquer que le film possède une bonne endurance au pliage. [150].

IV.16. Etude de la diffusion du PA par la cellule de FRANZ

- **Le principe**

La cellule de Franz, est un dispositif utilisé généralement pour étudier le passage de PA à travers une membrane biologique. Elle est constituée de deux compartiments séparés par une membrane, qui peut être soit artificielle, soit composée de peau humaine ou animale. Le principe actif passe du compartiment supérieur à travers la membrane vers le compartiment inférieur. Il renferme une solution tampon, qui favorise l'hydratation et préserve l'intégrité physiologique de la peau. La stimulation électrique est effectuée en déposant l'électrode positive sur la membrane biologique et la masse du générateur est connectée à l'électrode négative qui est immergée dans le compartiment récepteur par la même ouverture que celle utilisée pour prélever les échantillons. Lors de l'application du courant, un champ électrique se forme entre les deux électrodes, ce qui entraîne le principe actif du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur en traversant la membrane biologique.

Le prélèvement régulier des échantillons permet de déterminer la quantité exacte du PA qui traverse et pénètre la peau à tout instant. Il est à noter que la cellule de Franz est réglée à une température de 37°C et est équipée d'un système d'agitation magnétique afin de garantir et assurer l'homogénéité de la solution [75].

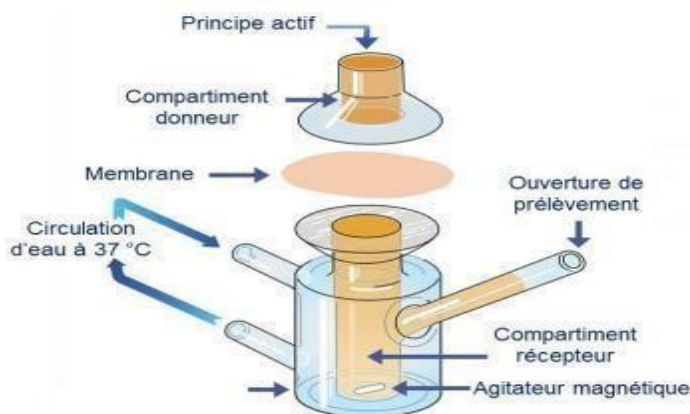


Figure IV.3 : Illustration de la cellule de FRANZ.

- **Mode opératoire**

On a effectué l'expérimentation en utilisant la cellule de Franz, elle a été placée dans un bain-marie sur une plaque magnétique qui fait tourner un barreau aimanté à une faible vitesse

(100 tr/min). Le système de circulation d'eau à 37°C relie à la cellule double parois, ce qui rapproche aux conditions réelles (température du corps humain). Le volume du compartiment receveur est de 10mL d'une solution tampon (pH=4,7). Entre le compartiment receveur et donneur se situe la peau du rat, le compartiment donneur contient 2mL de la nanoémulsion ou 1cm² du patch transdermique. Des échantillons de 2mL ont été prélevés à des intervalles de temps définis pendant 6 heures pour les deux préparations.

Par la suite, ces échantillons ont été analysés par spectroscopie UV-visible à 335 nm afin de déterminer la quantité totale de la nanoémulsion libérée après 6 heures dans le compartiment receveur, ce qui correspond à la quantité qui a diffusée à travers la membrane. Cette quantité retirée (2mL) est immédiatement remplacée par de la solution tampon neuf. Le volume retiré est pris en considération lors du calcul. La peau déjà étalée de la nanoémulsion ou en contact avec le patch est appliquée sur l'électrode positive de 8 mm de diamètre, puis l'électrode négative est introduite dans le compartiment receveur. On connecte ces électrodes à une source de courant. Ainsi, il est essentiel d'optimiser la durée d'application, la surface des électrodes et la densité de courant afin d'assurer l'efficacité de l'administration et la sécurité de l'utilisateur.

IV.17. Extraction des huiles essentielles

- **Le principe de la méthode**

Le procédé d'hydrodistillation est largement utilisé pour l'extraction des huiles essentielles. Cette méthode présente l'avantage de réduire la température de distillation, ce qui entraîne la température des composés volatils à des valeurs plus basses par rapport à la température d'ébullition, ce qui permet d'éviter leur décomposition [12].

- **Mode opératoire**

Les huiles essentielles ont été extraites par le procédé d'hydrodistillation selon le protocole de Chabane et al.2020 [152] avec quelques modifications ; 200 g de la partie aérienne de la plante *Teucrium polium L* ont été introduits dans un ballon de 2 L contenant 2/3 du volume de l'eau distillée, en utilisant l'appareil de type Clevenger. On laisse macérer pendant trois heures afin de récupérer les huiles essentielles. Ces dernières seront ensuite recueillies et stockées à une température comprise entre 4-6 °C pour une analyse ultérieure.

IV.17.1. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est calculé par le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante séchée utilisée. Exprimé en pourcentage, le rendement est calculé

par la formule suivante [153]:

$$R \% = \frac{PES}{PE} * 100$$

PES : Poids de l'huile essentielle en g.

PE : Poids de l'échantillon séché en g.

IV.17.2. Analyse physico-chimique de l'huile essentielle

Les indices physico- chimiques ont été déterminés selon les méthodes indiquées par le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

a. Indice de réfraction

- **Mode opératoire**

L'indice de réfraction a été mesuré à l'aide d'un réfractomètre selon les normes de AFNOR, 2000, à une température ambiante, puis corrigé à 20°C en utilisant la formule suivante [154] :

$$n_{20} = n_t + 0,00045 (T - 20^{\circ}C)$$

Où n_{20} : représente l'indice à 20°C,

n_t : est l'indice à la température ambiante ou de mesure,

T : est la température ambiante ou de mesure.

b. Indice d'acide

- **Le principe**

L'indice d'acide évalue la qualité d'une huile ou d'une graisse en mesurant la quantité d'acides gras libres. Un indice élevé indique une plus grande teneur en acides gras libres, ce qui rend l'huile ou la graisse plus susceptible de rancir [155]. Ce paramètre est défini comme étant le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour neutraliser des acides libres contenus dans un gramme de l'huile essentielle. La mesure d'indice d'acide a été réalisée par titrage où les acides libres ont été neutralisés par une solution d'Ethanol titrée avec KOH.

- **Mode opératoire**

1g d'huile essentielle ont été introduits dans un ballon auquel 5mL d'éthanol et 5 gouttes de solution de phénolphthaléine comme indicateur coloré ont été ajoutés. La neutralisation a été réalisée par la solution avec l'hydroxyde de potassium contenue dans la burette de concentration de 0.1 mol/L. La couleur jaune clair de l'huile essentielle vire à la neutralisation vers une couleur rose. Le volume de KOH consommé pour atteindre le point d'équivalence est lu directement sur la burette. L'indice d'acide est exprimé par la formule :

$$IA = \frac{5.16}{m}$$

V : Volume en mL de la solution éthanolique de KOH utilisée pour le titrage.

m : Masse en grammes de l'huiles essentielle.

c. Indice d'ester

- **Le principe**

Il est déterminé par hydrolyse des esters suite au chauffage dans des conditions définies, en présence d'une solution éthanolique titrée d'hydroxyde de potassium et dosage de l'excès d'alcalin par une solution titrée d'acide chlorhydrique. Ce paramètre est défini comme étant le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des esters contenue dans un gramme d'huile essentielle.

- **Mode opératoire**

Dans un ballon, on introduit 1g d'huile essentielle, on ajoute 25 mL de la solution d'hydroxyde de potassium à l'aide d'une burette, on adapte un réfrigérant et on place le ballon sur le bain d'eau bouillante et on l'y laisse pendant une heure. On laisse refroidir et on ajoute 20 mL puis 5 gouttes de solution de phénolphthaléine comme indicateur coloré, on titre l'excès d'hydroxyde de potassium avec une solution d'acide chlorhydrique. L'indice d'ester est exprimé par la formule :

$$IE = \frac{28.05}{m(V0 - V) - IA}$$

V0 : le volume en millimètre de la solution d'acide chlorhydrique dans le test blanc.

V : Volume en millimètre de la solution KOH utilisée.

m : Masse en grammes de l'huile essentielle.

IA : la valeur d'indice d'acide

IV.17.3. Analyse par chromatographie GC/MS

L'huile essentielle récupérée a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/MS), réalisée en mode rapide, avec la même colonne et les mêmes conditions opératoires utilisées pour l'analyse GC, logiciel d'exploitation GC-MS, solution version 1.02 de marque Shimadzu modèle 17-A. Les conditions chromatographiques pour réaliser l'analyse sont citées ci-dessous :

Colonne capillaire RTX-5Ms (15 mm x 0,25 mm x 0,25µm, hélium comme gaz porteur (1 mL/min). Injection en mode fractionné (1:200), **volume injecté** 1µL (4 % d'huile essentielle/ Acétate v/v), **température de l'injecteur** 250°C. **Vitesse linéaire** dans la colonne 19cm/sec. **La température du four** a été maintenue à 70°C pendant 5 minutes puis à 250 °C pendant 10 minutes.

- **Identification des composés dans l'huile essentielle**

L'identification des différents constituants a été réalisée à partir de leurs spectres de masse en comparaison avec ceux des références (composés standards de la banque de données informatisées) [156]. Aussi, elle a été confirmée par la comparaison entre l'indice de rétention expérimenté et l'indice de la littérature [157].

IV.18. Formulation des nanoémulsions

La nano-émulsion à base de l'huile essentielle a été produite avec la méthode d'homogénéisation à l'aide d'un ultra-turrax selon le protocole d'Al-Otaibi et al 2023 [159] avec quelques modifications, en utilisant le Tween 80 comme tensioactif et du Glycérol comme co-tensioactif. Dans un bécher, nous mélangeons une quantité de 90.31g d'eau distillée avec 0.99g de l'huile essentielle et 7.5g de Tween 80 et à l'aide d'un mélangeur Vortex à une vitesse de 3000 tr/min pendant 10 min et chauffées à 60 °C, Par la suite, on ajoute au mélange final une quantité de 1.24g du glycérol, ensuite il a été homogénéisé avec un ultra-turrax à 7000tr/min pendant 30 min.

IV.19. Caractérisation des nanoémulsions

- **Mesure de la distribution de taille des nanoémulsions par Dls**

La distribution de taille, a été déterminée à l'aide d'un appareil de mesure de taille de particules à diffusion dynamique de la lumière (HORIBA SZ-100 USA). Les NE de *T polium*. *L* ont été dilués avec de l'eau distillée (0.5 :125) (v/v) avant d'être placés dans la cellule en verre et les tailles mesurées à 25 °C.

- **Potentiel zêta**

Le potentiel zêta et l'indice de polydispersité (PI) ont été mesurés avec un Zêta-mètre HORIBA (SZ-100, USA) et ont été calculés à partir de la valeur de la mobilité électrophorétique.

Tous les échantillons ont été dilués puis placés dans une cellule de type GOLD PLATING de 6 mm, toutes les mesures ont été effectuées à 25°C.

- **Etude de la stabilité thermodynamique des NEs**

Le test de stabilité thermodynamique de la NEa été réalisé en observant d'éventuelles séparations de phases ou des précipitations. Les NE ont été diluées avec de l'eau distillée (0.5:125) (v/v). Les formulations ont été observées visuellement après 24h de repos ensuite chaque semaine pendant un mois.

- **Etude du comportement rhéologique**

L'étude rhéologique de NEs a été réalisée à l'aide d'un rhéomètre compacte modulaire (MCR302). La rhéologie permet donc une mesure macroscopique de la force nécessaire pour vaincre les résistances à l'écoulement, ainsi d'évaluer la stabilité et la facilité de prise au moment de l'emploi. La détermination de la courbe d'écoulement permet de faire ressortir des paramètres caractéristiques qui sont susceptibles de refléter l'état mécanique des NEs.

IV.20. Elaboration du patch à libération transdermique

Des films ont été élaborés par la technique d'évaporation du solvant. Différentes solutions de biopolymères de volumes 20mL ont été préparées. Pour ce faire, au départ, une quantité de 5% (m/V) de la Carboxyméthylecellulose (CMC), une quantité de 2.5% (m/V) de la gélatine (Gel) et une quantité de 5% (m/V) du PVA ont été solubilisés séparément sous faible

agitation dans de l'eau distillée à 80, 35 et 90°C respectivement. Ensuite, les solutions ont été laissées au repos pendant toute une nuit, afin d'éliminer les bulles d'air formées lors des différentes solubilisations.

Puis, dans un ballon de 100mL, les ingrédients ont été additionnés simultanément sous agitation rigoureuse, pendant 30 minutes et à une température ambiante. 7mL de la solution ainsi obtenue a été coulée dans des boîtes de Pétri et elles sont été laissées sécher à l'étuve à 40°C pendant 24 heures. Des films de surfaces homogènes ont été formés.

Un volume de 3mL des NEs préparées ont été incorporées dans les films séchés et en fin laissés sécher à l'air libre pendant 48 h.

IV. 21. Caractérisations des patchs

IV.21.1. Caractérisations physico-chimiques des patchs

- **Épaisseur**

L'épaisseur des patchs a été mesurée à trois différents endroits à l'aide d'un micromètre et les valeurs moyennes ont été calculées [149].

- **Variation du poids**

Les patchs ont été soumis à une variation de masse en pesant individuellement des patchs choisis au hasard [148].

- **Endurance au pliage**

L'endurance au pliage a été déterminée en pliant plusieurs fois et au même endroit le patch jusqu'à la fracture ou bien jusqu'à ce que le nombre de plis atteigne 500 fois, c'est une condition permettant d'indiquer que le film possède une bonne endurance au pliage. Le nombre de fois où le film a pu être plié au même endroit sans se casser/se fissurer donne la valeur de l'endurance au pliage [150].

IV.22. Etude de la diffusion du PA par la cellule de FRANZ

Les études de diffusion du PA par la cellule de Franz ont été réalisées en utilisant le même protocole pour les nanoémulsions et les patchs à base d'extrait éthanolique, cette étude de diffusion a été réalisée à des intervalles de temps définis (4 et 6 heures) pour la nanoémulsion et pour le patch respectivement. Ensuite les échantillons prélevés sont analysés par spectroscopie UV-visible à 225 nm pour savoir la quantité qui a été diffusée à travers la membrane biologique (la peau du rat).

IV.23. Activité cicatrisante

Afin évaluer l'effet cicatrisant de l'huile essentielle de la plante *Teucrium polium* L, un modèle de plaie d'excision a été réalisé sur 12 rats Wistar sains, issus de l'institut Pasteur d'Alger d'un poids approximatif de 200 ± 5 g. Le même protocole suivi pour l'évaluation de l'activité cicatrisante de l'extrait éthanolique et la nanoémulsion élaborée à base de l'extrait de *T. polium* est réalisé pour l'HE.

IV.24. Etude histologique

A la fin de l'expérience, au jour 18, les animaux ont été sacrifiés et le protocole réalisé est identique à cel utilisé pour la naoémulsion et le patch transdermique à base d'extrait éthanolique.

Chapitre V :

Résultats et Discussions

V.1. Rendement de l'extrait

L'extrait éthanolique a été obtenu par méthode soxhlet, l'opération a abouti à un résidu sec d'une couleur verte foncée, d'odeur caractéristique prononcée et d'un aspect visqueux.

Le rendement a été déterminé à partir du poids de l'extrait brut obtenu par rapport au poids de la plante sèche. En termes de rendements d'extraction, l'extrait éthanolique de la plante *Teucrium polium L* a présenté une valeur importante de l'ordre de **20.6 %**. En comparant ce résultat avec ceux obtenus par d'autres méthodes différentes et avec d'autres solvants de polarités différentes, il a été noté que la macération avec l'acétate d'éthyle a donné un rendement compris entre **3.7-3.74%** dans l'étude de Hammoudi [30] et de Fettah [141] respectivement, le rendement de l'extrait aqueux obtenu par Fertout-Mouri est de **5.3%** [17], L'étude effectuée par Malki a donné un rendement de **14%** et **15.8%** [42] pour l'extrait éthanolique de la plante récoltée à Sétif et à Biskra respectivement, un rendement de **15.6%** obtenu par Ansari pour un extrait méthanolique de la plante *Teucrium polium L* récolté en Iran en utilisant la méthode de percolation [43].

D'une manière globale, le rendement varie en fonction de plusieurs paramètres d'extraction : la température, le temps, la nature du solvant et la technique d'extraction, de la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant [17] d'une part, et d'une autre part il est également lié à la saison de récolte, la distribution géographique, et le temps de séchage de la plante [160, 161].

V.2. Criblage phytochimique

La détection des composés chimiques a été basée sur les réactions de coloration (changements de couleur) et les réactions de précipitation par des réactifs spécifiques de chaque groupe de composés.

Le criblage phytochimique réalisé, nous a permis de mettre en évidence la présence des grandes familles des composés chimiques au niveau des tissus végétaux de la plante *Teucrium polium L* et les résultats ont été consignés dans le **tableau V.1**.

Ce test phytochimique a montré la présence des saponosides, alcaloïdes, polyphénols, flavonoïdes, tanins, composés réducteurs, terpénoïdes, quinones, coumarines et les huiles essentielles, ces résultats sont similaires à ceux de Hammoudi [30] et Abdollahi [38] et sont aussi en concordance avec ceux de Ansari [56], Asghari [50], Malki [162] et Venditti [163].

Ce test a révélé aussi l'absence de certaines substances bioactives tel que les anthocyanes et anthraquinones libres.

D'après les résultats obtenus, nous avons déduit que la plante étudiée, est riche en métabolites secondaires, dans laquelle la présence des composants particuliers dans l'extrait de cette plante joue un rôle majeur et très important dans les propriétés thérapeutiques et biologiques [135, 164], telles que l'activité antioxydante et cicatrisante. Pour cette raison, plusieurs chercheurs ont donné un intérêt et une attention particulière à cette plante. Le tableau suivant illustre ces résultats

(+) Résultat positif : abondant ; (-) Résultat négatif : absent

Tableau V.1. Résultats de screening phytochimique de la partie aérienne de *Teucrium polium L*

Les composants phytochimiques		Résultats
Saponosides		+
Alcaloïdes		+
Polyphénols		+
Flavonoïdes	Flavonoïdes	+
	Flavonoïdes libres	+
Anthocyanes		-
Tanins	Tanins galliques	+
	Tanins catéchiques	+
Composés réducteurs		+
Anthraquinones Libre		-
Terpénoïdes		+
Quinones		+
Coumarines		+
Huiles Essentielles		+

V.3. Dosage des polyphénols totaux

La concentration en polyphénols a été déduite à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage établie avec un polyphénol standard ; acide gallique et les valeurs obtenus ont été exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait du matériel végétal.

Les résultats de la courbe d'étalonnage d'acide gallique sont présentés sur **la figure V.1**.

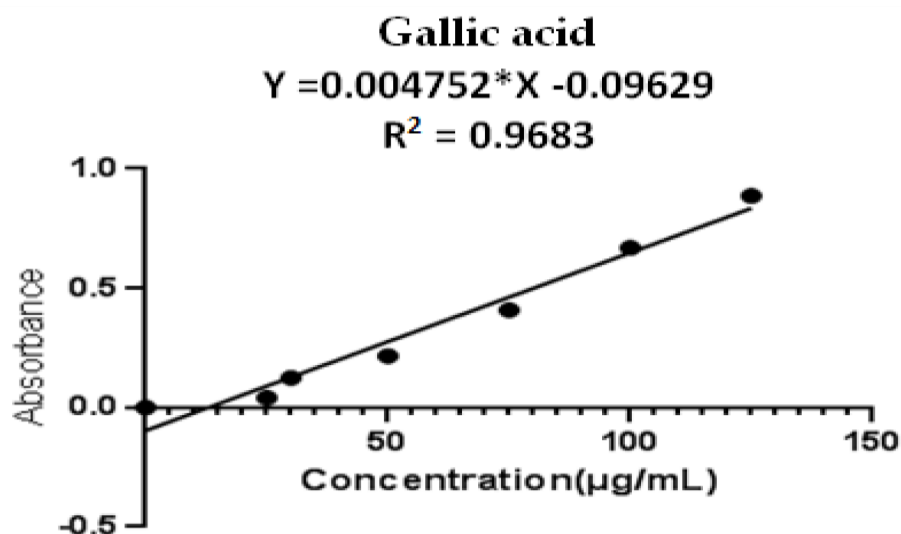


Figure V. 1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les résultats du dosage ont montré que l'extrait éthanolique des parties aériennes de la plante *Teucrium polium* L est riche en polyphénols avec une teneur de l'ordre de 227.43mg eq.a.gallique/g d'extrait.

La concentration des phénols totaux dans notre extrait s'est avérée supérieure à celles trouvées par Goulas, 164 mg eq.a.gallique/g d'extrait et 144 mg eq.a.gallique/g d'extrait dans l'extrait aqueux et méthanolique respectivement [167]. De même les valeurs du dosage des polyphénols de l'extrait éthanolique mesurées par El Atki et par Ardestani ont été estimées à 112.27 ± 4.75 mg eq AG/g d'extrait et 180.2 ± 7.5 mg eq.a.gallique/g d'extrait [49, 137] respectivement, valeurs inférieures à celles obtenues lors de cette présente étude qui est beaucoup plus élevée que les teneurs notées aussi par Hammoudi et El Atki, 89.05 ± 0.5 mg eq.a.gallique/g d'extrait et 4.38 ± 0.12 mg eq.a.gallique/g d'extrait respectivement dans les extraits d'acétate d'éthyle [30, 137].

D'après cette recherche, on a déduit que le contenu polyphénolique varie qualitativement et quantitativement d'une plante à l'autre [136] et cela dépend de la méthode d'extraction et la nature de solvant [122, 133], entre autres

la polarité de ce dernier utilisé dans l'extraction [168]. La période de récolte et le stade de développement de la plante peuvent influencer sur la composition en polyphénols totaux [136].

V.4. Dosage des flavonoïdes totaux

L'évaluation du taux des flavonoïdes totaux de l'extrait éthanolique de la partie aérienne a été réalisée par la méthode de Trichloride d'aluminium (AlCl_3) [122].

Les concentrations en flavonoïdes ont été déduites à partir de la gamme de la courbe d'étalonnage établie avec le standard quercétine (0 ; 20 $\mu\text{g/ml}$) et les résultats ont été exprimés en milligramme équivalent quercétine par gramme d'extrait.

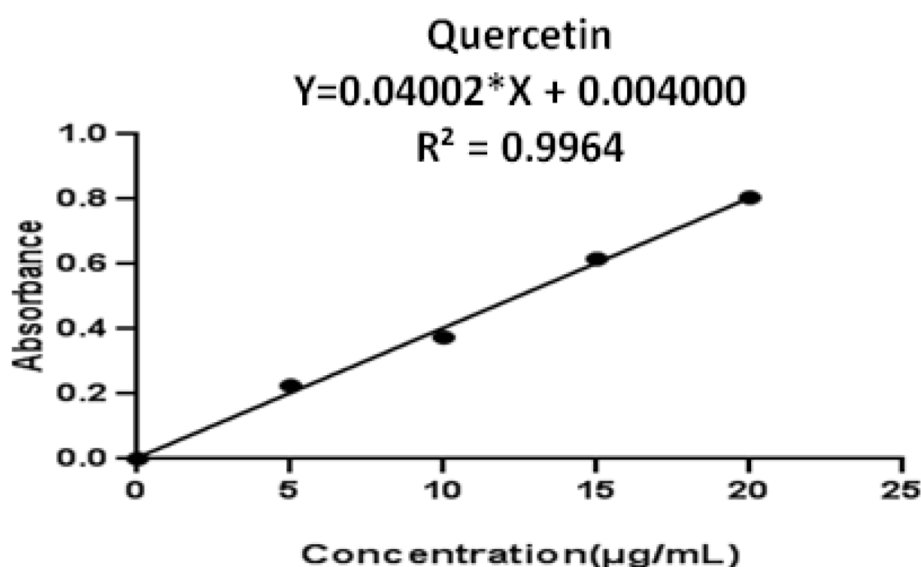


Figure V.2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine

Les teneurs en flavonoïdes totaux ont révélé que l'extrait éthanolique des parties aériennes de la plante *Teucrium polium L* renferme une teneur de 20.78 mg eq Quercétine/g extrait.

La valeur du dosage des flavonoïdes enregistrée dans notre étude s'est avérée inférieure à celle mesurée par El Atki est de 174.54mg eq Rutine/g d'extrait pour l'extrait éthanolique d'une espèce marocaine [137], de même la teneur trouvée par Chabane a été estimée à 24.43 ± 0.01 mg eq quercétrine /g extrait pour un extrait méthanolique d'une espèce Algérienne [169], valeur élevée par rapport à notre résultat, et pour un extrait similaire mais avec une espèce Tunisienne, Aouadhi [170] a trouvé une très faible valeur égale à 2.67 mg eq catéchine /mL.

Selon les données de la littérature, la concentration en flavonoïdes dans l'extrait de la plante dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation d'extrait [171], la région de

provenance [172] et le type de standard utilisé qui peut avoir une influence majeure sur l'exactitude des résultats (quercétine, catéchine, rutine) [168, 173].

V.5. Evaluation de l'activité antioxydante

V. 5.1. La méthode de DPPH

L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique du *Teucrium polium L* et de l'antioxydant standard ; l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH.

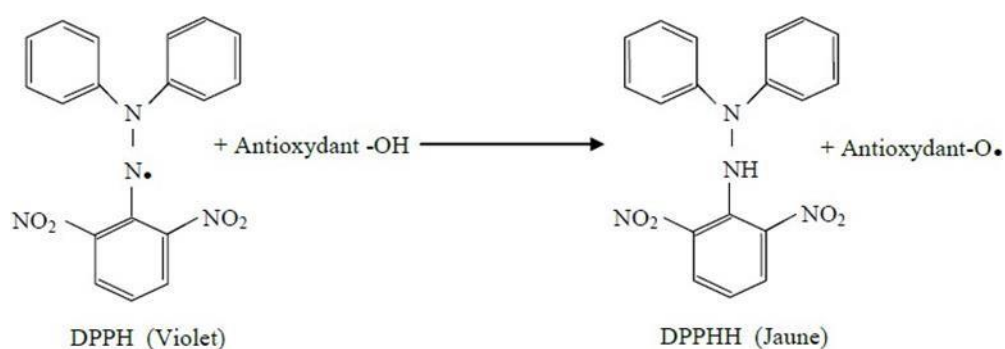


Figure V. 3 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH [130].

La capacité de réduction a été déterminée par une diminution de la concentration du radical libre et également l'absorbance au cours du temps de réactions jusqu'à l'épuisement de l'antioxydant donneur d'hydrogène [130, 166].

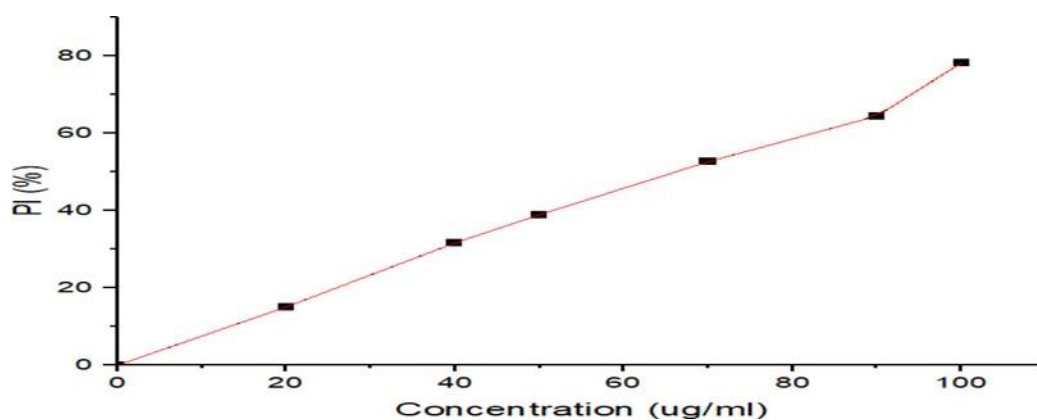


Figure V. 4 : Pourcentage d'inhibition de l'extrait éthanolique.

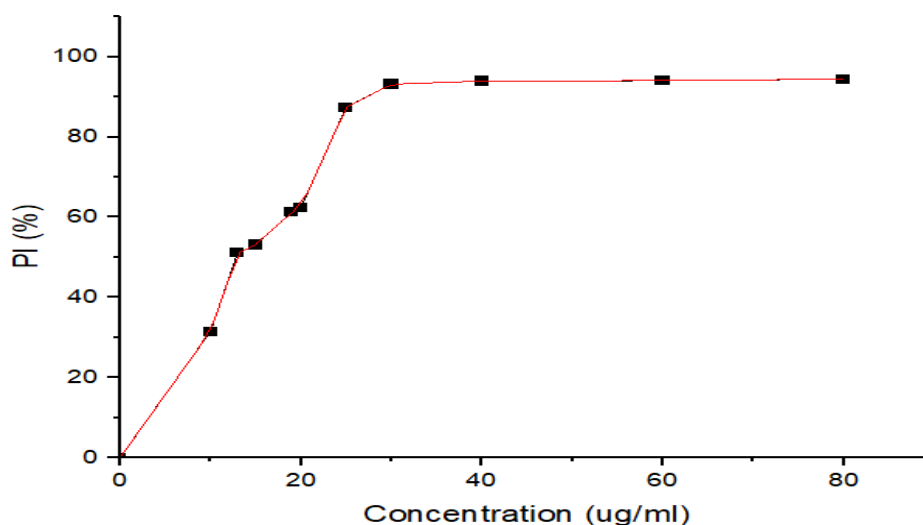


Figure V. 5 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.

Tableau V. 2 : Activité antioxydante exprimée par l'IC₅₀ (μg/ml)

Échantillons	IC ₅₀ (μg/ml)
Extrait éthanolique	65
Acide ascorbique	12.5

Le pourcentage d'inhibition (IC₅₀) calculé à partir des courbes **des figures V.4 et V.5** et les valeurs présentées dans **le tableau V.2** était de l'ordre de 65 μg/mL pour l'extrait éthanolique de l'espèce *Teucrium polium L* et 12.5 μg/mL pour l'acide ascorbique.

D'après ces résultats, on a observé que le pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique était supérieur à celui de l'extrait éthanolique pour toutes les concentrations. Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique, tocophérol, flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène [130, 138].

L'activité antioxydante vis-à-vis du radical DPPH de l'extrait obtenu à partir de l'espèce *Teucrium polium L* ayant différentes origines géographiques s'est avéré inférieure à celle de notre espèce. Des études ont trouvé que l'activité antioxydante la plus élevée a été enregistrée pour les extraits obtenus avec des solvants polaires. [137]

Des travaux de Sharififar et de Aouadhi sur l'espèce *Teucrium polium L* cultivée en Iran et en Tunisie ont révélé un IC₅₀ de l'ordre de 20.1±1.7 μg/mL et 21±0.5 μg/mL respectivement pour l'extrait méthanolique [26, 170].

Panovska et Ardestani ont trouvé des valeurs d'IC₅₀ de l'ordre de 10.0mg/mL et

9.8µg/mL en étudiant l'effet antioxydant de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'espèce *Teucrium polium L* provenant de Macédoine et d'Iran [49, 176] respectivement.

En effet, Ardestani et El Atki, ont trouvé que l'extrait éthanolique de *Teucrium polium L* d'Iran et de Maroc, présente une valeur d'IC50 de 48.9 µg/mL et 0.397 ± 0.042 mg/mL [49, 137] respectivement.

Ces études ont montré que les extraits de l'espèce *Teucrium polium L*, sont riches en composés phénoliques, ces métabolites secondaires contenus dans les extraits sont probablement responsables de l'activité antioxydante [130, 138]. Selon d'autres recherches, cette activité est proportionnelle aux résultats des dosages des polyphénols et flavonoïdes totaux, c'est-à-dire l'extrait avec un contenu polyphénolique plus élevé a montré une activité antiradicalaire plus élevée. Elle est aussi liée à la polarité des solvants d'extraction [10, 170, 172]. Les études de El Atki et de Popovici ont confirmé également la corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire [137, 177].

V. 5.2. La méthode de FRAP

La méthode du pouvoir réducteur est utilisée pour déterminer la capacité antioxydante par la mesure de la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}).

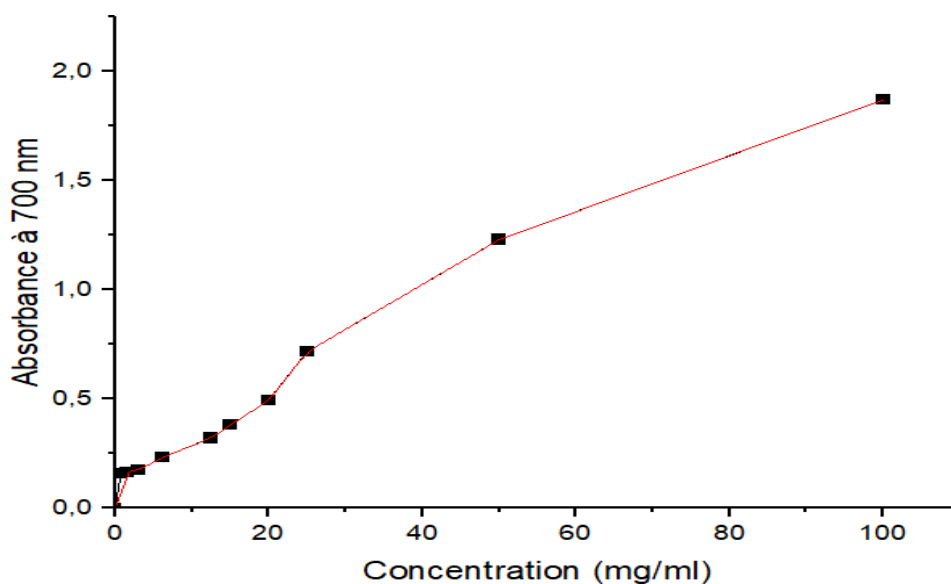


Figure V.6 : Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique.

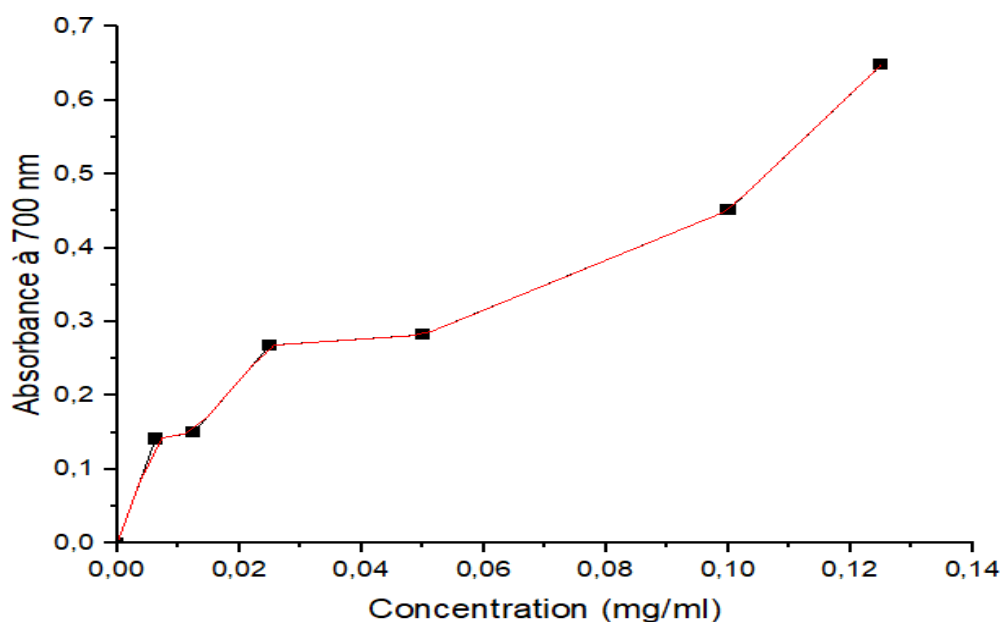


Figure V. 7 : Pouvoir réducteur du BHT.

Tableau V. 3 : Pouvoir réducteur exprimée par l'IC₅₀ (mg/ml)

Échantillons	IC ₅₀ (mg/ml)
Extrait éthanolique	21
BHT	0.108

D'après les figures V.6 et V.7, l'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à l'augmentation de la concentration.

Les résultats obtenus et enregistrés dans le tableau V.3 ont montré que l'extrait éthanolique de la plante *Teucrium polium* possède une capacité pour réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}), avec une valeur d'IC₅₀ égale à 21 mg/mL, mais ce pouvoir réducteur a été inférieur à celui de l'antioxydant synthétique BHT qui a enregistré une valeur d'IC₅₀ égale à 0.108 mg/mL.

Des études antérieures évaluées *Teucrium polium* plusieurs fois et elles ont montré que cette espèce a un pouvoir réducteur très puissant [137, 178].

L'IC₅₀ enregistré par EL Atki [137] est de 0.193 ± 0.006 mg/mL pour l'extrait méthanolique et 0.381 ± 0.009 mg/ml pour l'extrait éthanolique de *T. polium subsp. aurum*, ces valeurs possèdent des pouvoirs réducteurs supérieurs à celle trouvée au cours de cette étude.

Khaled-Khouja [178] a trouvé un IC_{50} de 414.65 mg AAE/g extrait pour l'extrait méthanolique de *T. polium*, cette valeur a montré un pouvoir réducteur inférieur que le pouvoir réducteur enregistré à notre étude. L'évaluation de l'activité antiradicalaire par Dridi [179] dans l'extrait méthanolique donné une IC_{50} égale à 32µg/ml, cette valeur a été révélée un pouvoir réducteur largement supérieure aux résultats obtenus à notre recherche.

Les extraits à fort pouvoir réducteur doivent avoir une valeur IC_{50} faible. Cela est interprété par la richesse de cet extrait en composés phénoliques [168]. C'est-à-dire le pouvoir réducteur de l'espèce *Teucrium polium L* est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron [138]. On peut déduire alors de ce test que les polyphénols notamment les flavonoïdes jouent un rôle très important dans la chélation des métaux de transition impliqués dans la réaction de Fenton (formation de radicaux hydroxyles résultant de la réaction du fer avec le peroxyde d'hydrogène) [168].

V.6. Evaluation de l'activité antibactérienne

La détermination de la zone d'inhibition permet une estimation du caractère de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne vis-à-vis de l'extrait testé. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés par une règle, après 24 h d'incubation.

Tableau V.4 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition induite par l'extrait

Souches bactériennes	Extrait (mg/ml)									Référence	
	Extrait brut	400	300	200	150	100	75	50	25	Tétracycline	Gentamicine
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15	14	13	10	09	07	07	06	06	14	25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	20	11	11	10	09	09	09	07	07	19	29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	16	11	10	09	09	09	06	06	06	25	24
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	10	10	10	09	08	08	06	06	06	21	27

Les résultats consignés dans le **tableau V.4** ont montré que l'extrait brut exprime une efficacité importante sur *S aureus* et *P. aeruginosa* avec des diamètres élevés des zones d'inhibition (20 mm et 16mm) respectivement. Il possède un large spectre d'inhibition car son activité inhibitrice

couvre aussi bien les bactéries Gram négatif que les Gram positif. La zone d'inhibition mesurée par la référence tétracycline contre *S. aureus* (19 mm) est inférieure à celle mesurée pour l'extrait brut (20 mm), mais cette référence possède toujours une zone d'inhibition plus élevée comparativement aux zones d'inhibition trouvées pour les différentes concentrations contre toutes les souches bactériennes comme l'indique le **tableau V.4**, en revanche pour le diamètre trouvé par la référence Gentamicine contre *S. aureus* est plus élevé (29 mm) par rapport aux zones d'inhibition trouvées pour toutes les concentrations de l'extrait et l'extrait brut.

Les différentes concentrations par contre ont agi différemment sur les souches testées. Leur action est variable, intéressante sur *S. aureus* (13 mm) à 300 mg/ml et intermédiaire sur *S. aureus*, *P. aruginosa* et *E. coli* (11mm, 11mm et 10 mm) respectivement à 400 mg/ml. Cette variabilité d'efficacité de l'extrait peut dépendre de sa composition chimique. Elle peut être également liée à la polarité des substances bioactives, l'effet de ces substances serait lié aux conditions de séchage et de broyage de la plante et dépend également de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs [17, 180, 181].

L'étude antibactérienne de la plante *Teucrium polium* L a fait apparaître une efficacité remarquable sur les différentes souches bactériennes utilisées (Gram positif ou négatif). Cet effet est dû aux métabolites secondaires tels que les composés phénoliques qui sont présent dans l'extrait et il a été attribué également à la présence des flavonoïdes qui sont réputés pour leurs effets antibactériens [30].

Pour ce qui est de CMI, une concentration de **50 mg/mL** a été enregistrée avec *B. subtilis* et *S. aureus* et **75 mg/ml** pour *P. aruginosa* et *E. coli*.

V. 7. Analyse par LC-MS/MS de l'extrait éthanolique

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a été utilisée pour analyser l'extrait brut de *T. polium* afin de détecter ses composants phytochimiques (**Figure V.8 et TableauV.5**). Cette technique avancée permet d'analyser en détail les composés phénoliques présents dans l'extrait végétal, offrant ainsi une vue d'ensemble détaillée des métabolites présents dans cette ressource végétale.

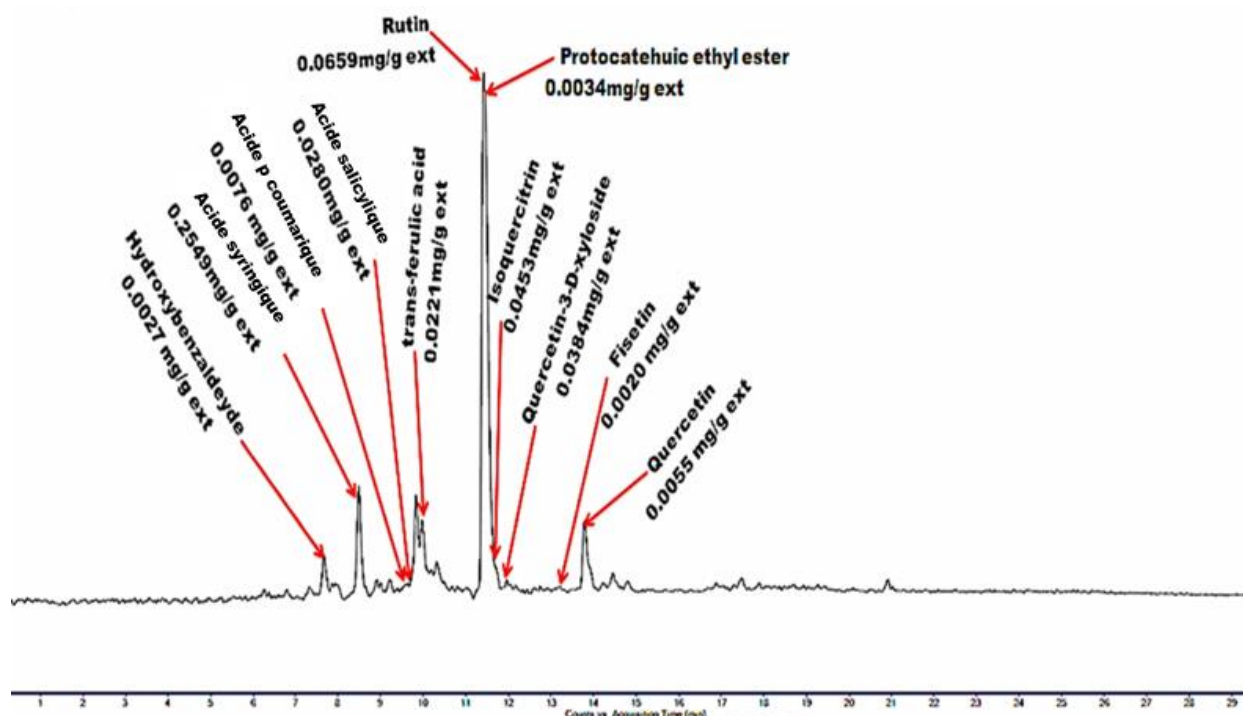


Figure V.8 : Chromatogramme d'extrait éthanolique de *T. polium* L.

Tableau V.5 : Analyse LC-MS/MS de l'extrait éthanolique de *T. polium* L.

Composant	TR (s)	quantité mg/g d'extrait
Hydroxybenzaldehyde	7.8004	0.0028 mg/g extrait
Acide Synergique	8.5063	0.255 mg/g extrait
Acide p-coumarique	9.70736667	0.0076 mg/g extrait
Acide Salicylique	9.82075	0.028 mg/g extrait
Acide férulique	10.2212167	0.022 mg/g extrait
Protocatehuicethyl ester	11.5255667	0.003 mg/g extrait
Rutin	11.5043	0.066 mg/g extrait
Isoquercitrin	11.5532833	0.045 mg/g extrait
Quercetin-3-D-xyloside	12.0633333	0.038 mg/g extrait
Fisetin	13.2768	0.002 mg/g extrait
Quercetin	14.1836667	0.005 mg/g extrait

Parmi les polyphénols présents dans l'extrait et mentionnés dans le **tableau V.5**, l'hydroxybenzaldéhyde qui se démarque des autres avec une concentration significative de 0,0028 mg/g d'extrait végétal et un temps de rétention (RT) de 7,8004 s, suggérant un rôle potentiel dans la protection contre le stress oxydatif et une éventuelle implication dans les mécanismes de défense cellulaire. L'acide syringique (RT : 8,5063) se distingue par une concentration importante de 0,2549 mg/g, suscitant un intérêt particulier en raison de ses potentielles propriétés anti-inflammatoires. De même, l'acide p-coumarique (RT : 9,7073) et l'acide salicylique (RT : 9,8207) présentent des concentrations détectables, impliquant leur implication dans des voies métaboliques spécifiques de la plante. L'analyse détaillée met également en évidence l'acide trans-férulique (RT : 10,2212) et Protocatechuic acide éthyle ester (RT : 11,5255) en tant que composés phénoliques distincts, chacun contribuant de manière unique à la palette métabolique. L'acide transférulique, reconnu pour ses propriétés protectrices contre les rayons UV, et l'ester éthylique de Protocatehuic, à la structure particulière, pourraient potentiellement offrir une biodisponibilité améliorée, ouvrant la voie à des applications en pharmacologie.

La catégorie des flavonoïdes ajoute une dimension remarquable à la composition, révélant des concentrations variables allant de 0,0020 mg/g à 0,0659 mg/g pour des composés tels que la rutine (RT : 11.5043), l'isoquercitrine (RT : 11.5532), la quercétine-3-D- xyloside (RT : 12,0633), fisétine (RT : 13.2768), et quercétine (RT : 14.18366667). Cette variabilité souligne la diversité fonctionnelle de ces composés au sein de la plante.

Cette analyse LC-MS/MS fait la distinction entre les polyphénols et les flavonoïdes dans l'extrait végétal étudié, offrant une perspective complète sur sa complexité chimique. Les polyphénols identifiés, dont l'hydroxybenzaldéhyde, l'acide syringique, l'acide p-coumarique, l'acide salicylique, l'acide trans-férulique et l'ester éthylique de protocatheuic, contribuent à enrichir la complexité biochimique de la plante. D'autre part, les flavonoïdes, notamment la rutine, l'isoquercitrine, la quercétine-3-D-xyloside, la fisétine et la quercétine, ajoutent une dimension supplémentaire en offrant des bienfaits potentiels pour la santé. Ces résultats mettent en lumière la diversité des composés phénoliques présents dans la plante étudiée, fournissant une base solide pour des recherches plus approfondies sur leurs propriétés bioactives et leurs applications potentielles dans des domaines tels que la médecine, la nutrition et la pharmacologie.

L'approche analytique utilisée fournit une méthodologie robuste pour la caractérisation précise et détaillée de la composition phénolique des extraits de plantes, ouvrant de nouvelles perspectives pour comprendre les composés bioactifs et leurs implications pour la santé humaine.

Dans cette partie, on discutera les principales caractérisations des nanoémulsions ensuite l'évaluation de l'activité cicatrisante.

V.8. Caractérisation des nanoémulsions

- **Mesure de la distribution de taille, potentiel zêta et l'indice de polydispersité des nanoémulsions par Dls**

La connaissance de la taille moyenne des gouttelettes peut aider à prévoir les tendances et les caractéristiques d'arrangement, et savoir si ces gouttelettes vont se disperser ou flocculer donc on peut dire que la dimension des gouttelettes de la phase dispersée conditionne la stabilité de la dispersion.

La taille moyenne des gouttelettes, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta des nanoémulsions déterminés par DLS, sont présentés dans le **tableau V.6**.

Tableau V.6 : Les données de l'analyse de la taille des particules, de l'indice de polydispersité (PI) et du potentiel zêta de nanoémulsion.

	Taille des gouttelettes (nm)	Indice de polydispersité (IP)	Potentiel zêta (mV)
Nanoémulsion d'extrait éthanolique	42.0	0.339	53.2

Les résultats obtenus ont montré que la nanoémulsion formulée avec l'extrait de l'espèce étudiée présente une taille de particule <100 nm (taille très faible et uniforme), ce qui rend ce nanosystème plus soluble par rapport aux émulsions, on peut dire que plus la taille des particules est petite, plus la surface de contact de la structure augmente, de sorte qu'elle accélère sa solubilité [146]. L'indice de polydispersité révèle une valeur inférieure à 0,5. Cette dernière, nous a permis de déterminer le degré de stabilité et d'homogénéité dans les différents milieux, dans notre cas le $PI < 1$, ce qui indique que notre distribution est monodispersée, il est donc relativement stable.

Dans notre étude, une valeur de potentiel zêta beaucoup plus élevée a été obtenue (+53.2 mV) implique qu'une stabilité plus élevée a été atteinte pour la nanoémulsion d'extrait éthanolique car il a été rapporté que la nanoémulsion ayant des valeurs de potentielles zêta supérieures à +30 mV ou inférieures à -30 mV présentent un système colloïdal stable de sorte que de grandes

charges de particules peuvent empêcher l'agréation des particules en fonction des forces de répulsion électrostatique [182].

- **Etudes de stabilité thermodynamique des NE**

Les nanoémulsions formulées à base de l'extrait éthanolique du *Teucrium polium L* ne contiennent aucun conservateur; L'étude de leur stabilité a été effectuée à température ambiante en observant visuellement leurs apparences et aspects. Après 24h, ce test de stabilité a montré que les NEs de l'extrait de *T polium L* étaient stables. Après 14 jours, les nanoémulsions laissées à l'air libre n'ont montré aucun changement dans leurs structures et sont restées toujours bien homogènes, ce qui confirme de plus que la formation de nanoémulsions plus stables est liée à la taille des gouttelettes obtenues.

Au cours de la 3^{ème} semaine, les diamètres des gouttelettes ont commencé à augmenter sensiblement pour finir par l'apparition de deux phases à la fin de la 4^{ème} semaine. Cette instabilité est influencée par la teneur en acides gras insaturés. Ces derniers sont plus facilement oxydés à température ambiante que les acides gras saturés. La turbidité ou la sédimentation a endommagé la nanoémulsion dans laquelle l'huile n'est plus enveloppée de tensioactifs, c'est pour cette raison qu'on suggère l'amélioration de la formulation par des excipients qui contribuent à avoir une meilleure stabilité [182].

- **Etude rhéologique**

Afin de mesurer la viscosité des nanoémulsions, on a eu recours à des mesures de paramètres rhéologiques. Le suivi de la viscosité et de son évolution dans le temps et l'examen de son comportement rhéologique, permet de mettre en évidence si l'émulsion est suffisamment visqueuse «collable» ou facile à s'étaler, selon l'usage envisagé [183].

- **a. Test de viscoélasticité**

Pour déterminer les modules G' (compartiment solide) et G'' (compartiment liquide) à basse fréquence, caractéristique des nanoémulsions, l'étude de la dépendance de ces modules du taux de cisaillement (exprimée en s^{-1}) a été réalisée. Les résultats en régime harmonique pour les nanoémulsions sont représentés sur **la figure V.9**

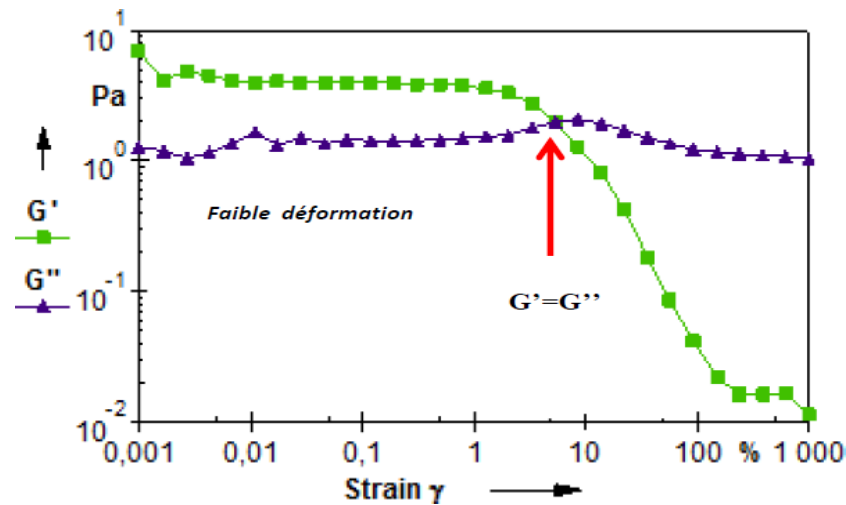


Figure V.9 : Comportement viscoélastique de la nanoémulsion pour une fréquence $f=1\text{Hz}$.

La zone LVE donne la valeur du module G' qui décrit un plateau pour les faibles déformations. Lorsque le module élastique G' est supérieur au module visqueux G'' dans la zone LVE de 0,001 à 3,29 % et $G' \geq 1 \text{ Pa}$ (6,92 Pa), justifie bien que notre dispersion est viscoélastique, au point de croisement $G'=G''$, la valeur de déformation ou contrainte seuil représente une valeur de déformation suffisante pour désorganiser les particules et modifier le réseau de particules connectées et obtenir un comportement liquide. La valeur de la contrainte seuil γ est alors égale à 5,3% à 2 Pa. Au-delà de cette valeur, pour des déformations élevées, le comportement liquide domine, le module visqueux G'' est plus élevé que le module élastique G' . Une décroissance en fonction du taux de cisaillement caractéristique des fluides non Newtoniens a été observée.

- **b. Test de fréquence**

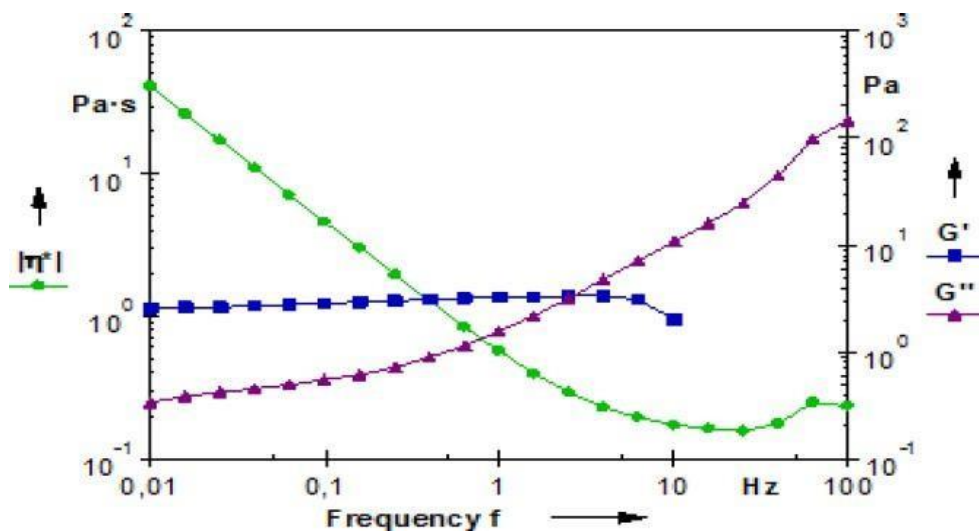


Figure V.10 : Test de fréquence (stabilité) de la nanoémulsion pour une fréquence $f=0,01-100 \text{ Hz}$.

Les résultats de la stabilité des nanoémulsions sont représentés sur la figure V.10. Ils montrent qu'entre 100 - 2,51 Hz, $G'' > G'$ donc la formulation est visqueuse dans cette partie. À partir de 2,51 Hz jusqu'à 0.01 Hz (à basse fréquence) : $G' > G''$ dans la zone LVE donc le produit devient élastique dans cet intervalle. On remarque que le module visqueux élastique reste constant et ne dépend pas à la variation de la fréquence, et delà, on peut conclure que même avec changement de la fréquence, le produit reste stable.

- c. Test d'écoulement

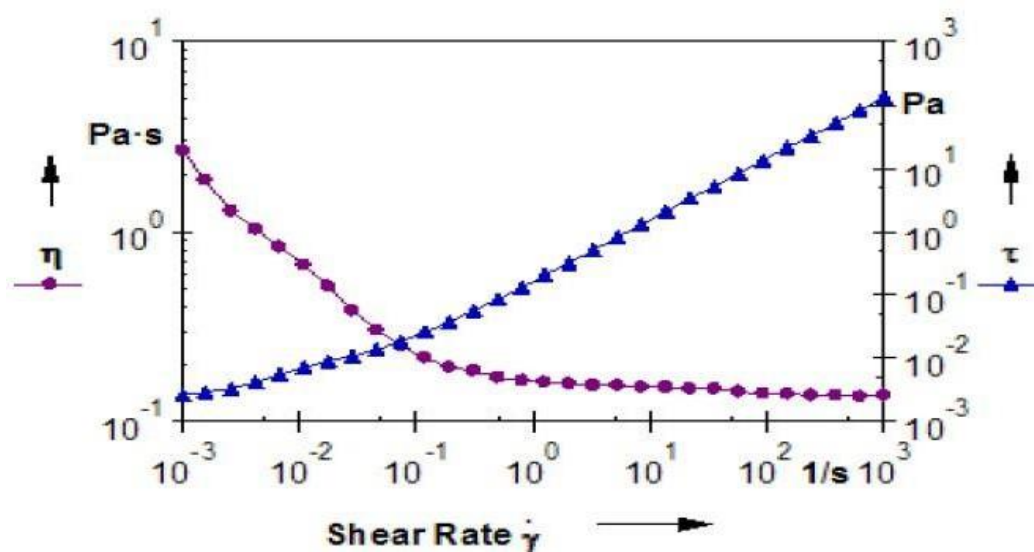


Figure V.11 : Test d'écoulement de nanoémulsion sur pour un cisaillement $0.001-1000^{-1}$.

La courbe montre l'évolution de la viscosité (Pa .S) et la contrainte de cisaillement (Pa) en fonction du taux de cisaillement en s^{-1} . On constate que plus le taux de cisaillement est élevé de 0.001 à 1000^{-1} , plus la contrainte de cisaillement augmente jusqu'à atteindre 100 Pa, elle est compensée par une réduction de la viscosité de 3 à 0,2 Pa.

A partir de ces résultats, on peut dire que plus la viscosité est faible, plus la vitesse de pénétration des substances actives est plus rapide et facile, ce qui augmente la mobilité des principes actifs. On conclue que la viscosité des nanoémulsions affecte de manière significative la libération des ingrédients actifs.

V.9. Evaluation de l'activité cicatrisante

L'effet cicatrisant a été évalué sur des plaies traitées avec l'extrait du *T. polium L* (ETPL), la nanoemulsion à base de l'extrait (NEs) et comparé avec la crème de référence Cicatryl bio et sur les plaies non traitées (Témoin). La progression de la régression des plaies est suivie chaque

quatre jour par détermination de leur pourcentage de rétraction. Les résultats sont rapportés sur le **tableau V.7**.

Les observations des plaies durant la première semaine (**de J4 à J8**), indiquent que les groupes traitées par l'extrait du *Teucrium polium L* n'ont pas montré une diminution significative de taille par rapport au lot traité par la crème Cicatryl bio et au lot Témoin, par contre le lot traité par la nonaémulsion à base d'extrait a donné une réduction de taille de la plaie plus élevée par rapport à la crème de référence mais reste toujours inférieure à celle du témoin, de **J12** la première réduction de surface significative a été enregistrée pour les plaies du 3^{ème} et 4^{ème} groupes qui ont atteint un pourcentage de rétraction de **90,73 % et 92.13 %** respectivement comparés au pourcentage de rétraction des plaies traitées par la crème Cicatryl bio qui donne un pourcentage de **68,98 %** et des plaies laissées sans traitement qui enregistre **78.5 %**. Au bout de la deuxième semaine (**J15**), la réduction des surfaces des plaies des lots traités avec **ETPL et NEs** reste toujours significative par rapport au lot Témoin et au lot traité par la crème de référence, pour les mensurations suivantes et à **18^{ème}** jour, les plaies sont totalement cicatrisées pour le lot traité par **ETPL et NEs** avec un pourcentage de rétraction de **98,04 % et 98.75 %** contre **94.9 %** pour le lot Témoin et **93,7 %** pour le lot traité par la crème Cicatryl bio.

Les observations visuelles au premier jour après l'excision de la peau et durant la première semaine ont indiqué la présence d'un tissu enflammé et granuleux pour le lot traité avec **ETPL et NEs**. Aussi pour les lots traités avec la crème Cicatryl bio, la présence d'un Œdème et d'une hémorragie pour le lot témoin a été remarquée. A partir du **12^{ème}** jour, ces signes ont disparu dans tous les groupes traités et non traités avec la présence des exsudats clairs et le début de découlement de la croûte et à partir de **J15**, le découlement total de la croûte avec la poussée des poils et le début d'épidémisation ont été observé pour les quatre lots, à **J18**, des observations identiques ont été enregistrées pour le groupe traité avec **ETPL, NEs** et pour le groupe traité avec la crème de référence Cicatryl bio qui a montré une bonne poussée des poils et la cicatrisation totale, avec une différence légère pour le groupe Témoin qui indique aussi la poussée des poils mais une cicatrisation presque totale.

Tableau V. 7 : Pourcentage de rétraction % des plaies de différents groupes

Jours	Témoin	Crème Cicatryl bio	Extrait de <i>T. polium L</i>	Nanoemulsion
J4	36.88	28.95	19.25	31
J8	73.75	54.73	43.74	60
J12	78.5	68.98	90.73	92.13
J15	86.9	81.52	97.64	95.54
J18	89.6	91	98.04	98.75

V.10. Etude histologique

Du point de vue histologique, la peau comporte deux couches principales, l'épiderme et le derme, avec un fascia sous-cutané appelé hypoderme, qui se trouve profondément dans le derme.

Au terme morphologique, aucun changement n'a été noté pour les différents groupes étudiés avec la présence de la structure histologique normale de l'épiderme, du derme, du tissu sous-cutané et du tissu adipeux ainsi que de la musculature. On note aussi l'absence d'une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme, et donc on peut dire que le revêtement cutané a été conservé.

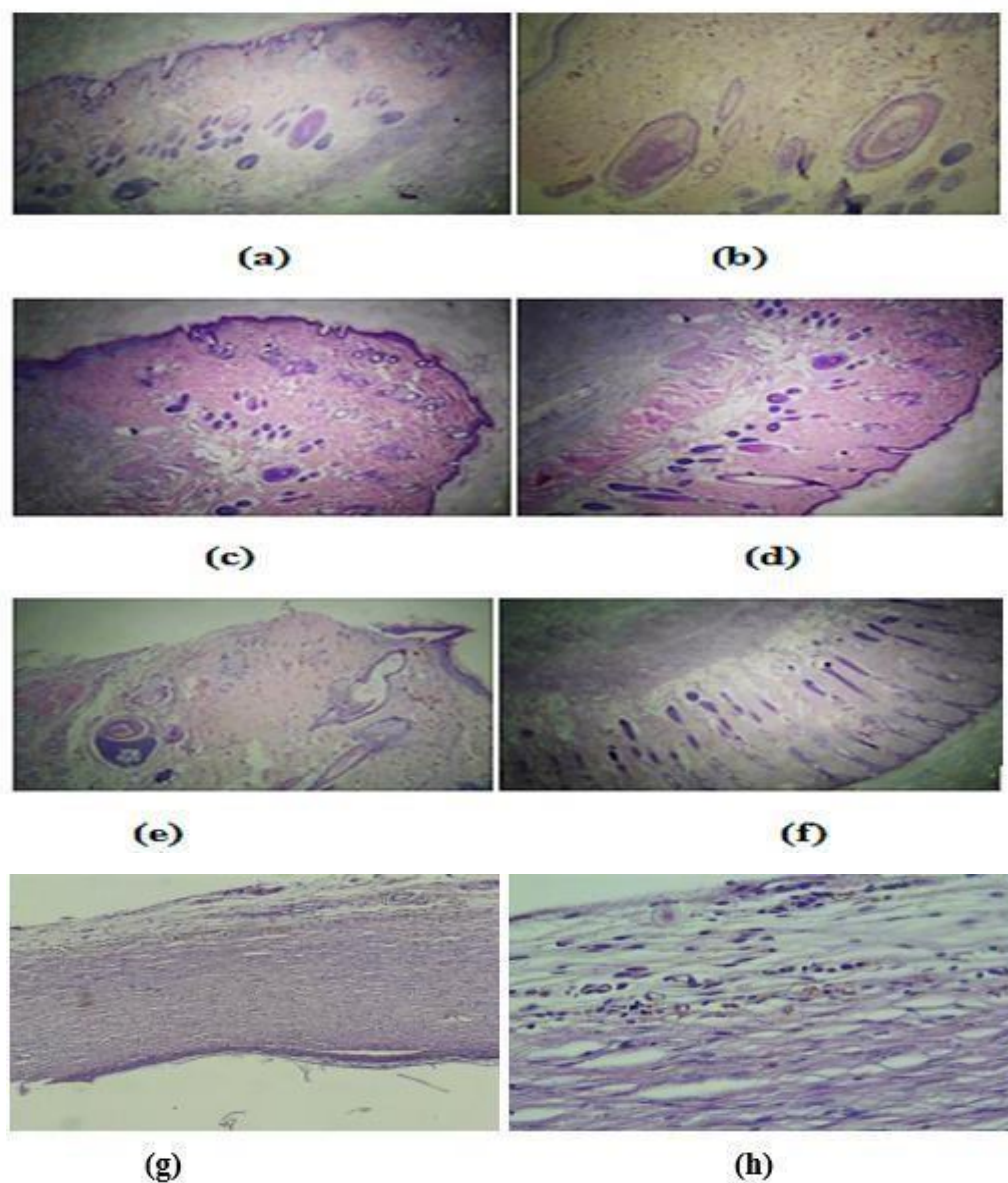


Figure V.12 : Illustrations des coupes histologiques issues des différents groupes expérimentaux, **(a), (b)** le contrôle négatif, **(c), (d)** la référence, **(e), (f)** traité avec l'extrait éthanoïque brut et **(g), (h)** traités avec la nanoémulsion.

La figure V. 12 montre les coupes histologiques des différents groupes expérimentaux (traités par l'extrait éthanolique brut, la nanoémulsion, la référence et le témoin). Pour le groupe non traité (Témoin), les coupes histologiques ont montré la présence de vaisseaux congestifs, ce qui révèle la présence d'une inflammation modérée, ces coupes histologiques ont mis en évidence aussi la présence de follicules pileux, ces résultats indiquent une cicatrisation en cours, ce qui confirme les résultats trouvés dans **le tableau V.7**. Les résultats des coupes histologiques du groupe traité par la crème Cicatryl bio comme groupe de référence présentent une inflammation

modérée, des mélanophages et la formation de tissus fibreux sont présents, ce qui suggère une bonne cicatrisation. Pour le groupe traité par l'extrait éthanolique brut, les coupes histologiques présentent une épithélialisation, avec un épiderme mature, ce qui confirme la conservation du revêtement cutané, ces coupes révèlent aussi la présence de follicules pileux, ces résultats indiquent une cicatrisation totale et pour le groupe traité par la nanoémulsion, les coupes histologiques montrent la présence de remaniement fibreux avec quelques éléments infoplasmodiaires, la présence des mélanophages et des follicules pileux indiquant une phase terminale de cicatrisation. A partir de ces résultats on peut dire que les groupes traités par l'extrait éthanolique brut, la nanoémulsion et Cicatryl bio ont montré un dépôt de collagène plus élevé et une réépithélialisation complète.

D'après les résultats trouvés, Le processus cicatriciel a été amélioré significativement après le traitement des plaies chez les rats avec l'extrait brut et la nanoémulsion. Cela peut être dû aux effets combinés des constituants polyphénoliques, principalement des flavonoïdes et des dérivés de l'acide caféique [28]. Des études antérieures ont démontré que les fractions flavonoïdes améliorent la prolifération des fibroblastes cutanés humains normaux *in vitro* [184], ce qui confirme que ces derniers jouent un rôle essentiel dans la production de fibres de collagène et sont responsables de l'activité cicatrisante.

V.11. Caractérisation des patches

IV. 11.1. Caractérisations physico-chimiques des patches

Tableau V.8 : Épaisseur, variation de poids et pliage d'endurance du patch transdermique

	Épaisseur (μm)	Variation poids (mg)	Pliage d'endurance
Patch	206	20.74	50

Tous les patches préparés étaient conformes aux normes de la pharmacopée en matière d'uniformité du contenu. Les résultats de caractérisation du patch sont présentés dans le **tableau V.8**. La membrane préparée avait une forme géométrique ronde (**Figure V.13**), avec un diamètre de 120 mm et une épaisseur de 206 μm et pesait 20,74 mg par patch (0,02074 g/patch). Lors du test d'endurance au pliage, les patches ont montré une capacité de 50 plis. Après optimisation, les patches présentaient une surface lisse et plane qui restait intacte après application sur la peau. Les tests d'endurance à la flexion ont confirmé que les patches conservaient leur intégrité sans se briser

lors des mouvements cutanés habituels (**Figure V.14**). Ces résultats soulignent la robustesse du film, démontrant une résistance et une élasticité suffisantes pour résister à l'usure quotidienne. Ces gammes sont adaptées à une application sur la peau.

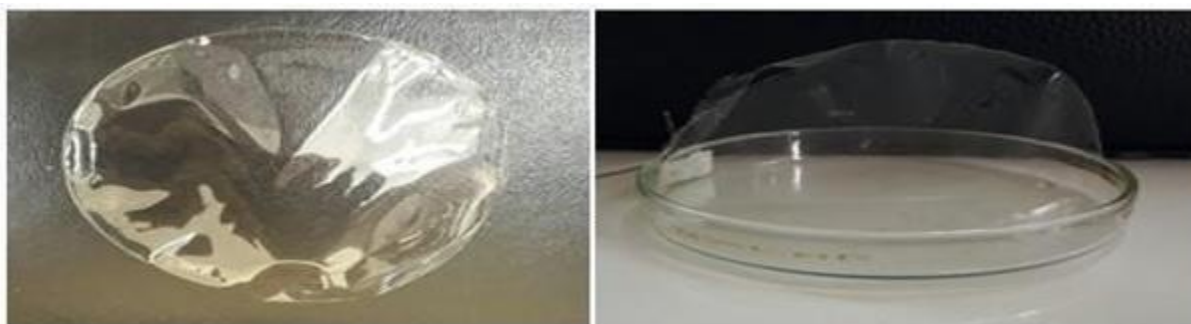


Figure V. 13 : Une photo originale du film à base de PVA/EC.



(a)

(b)

Figure V. 14 : Adhésion des patches sur le derme ; (a) : patch collé et (b) : décollement du patch.

V. 12. Etude de la diffusion du PA par la cellule de FRANZ

Le profil de libération ou de perméation *in-vitro* est un outil important, qui prédit à l'avance la pharmacocinétique du médicament *in-vivo* [185] et il détermine la concentration précise du PA qui atteint le site d'action. Les résultats de la diffusion de l'extrait à travers les NEs et des NEs contenues dans les patches en utilisant une membrane biologique moyennant la cellule de FRANZ sont présentés dans la **figure V.15**.

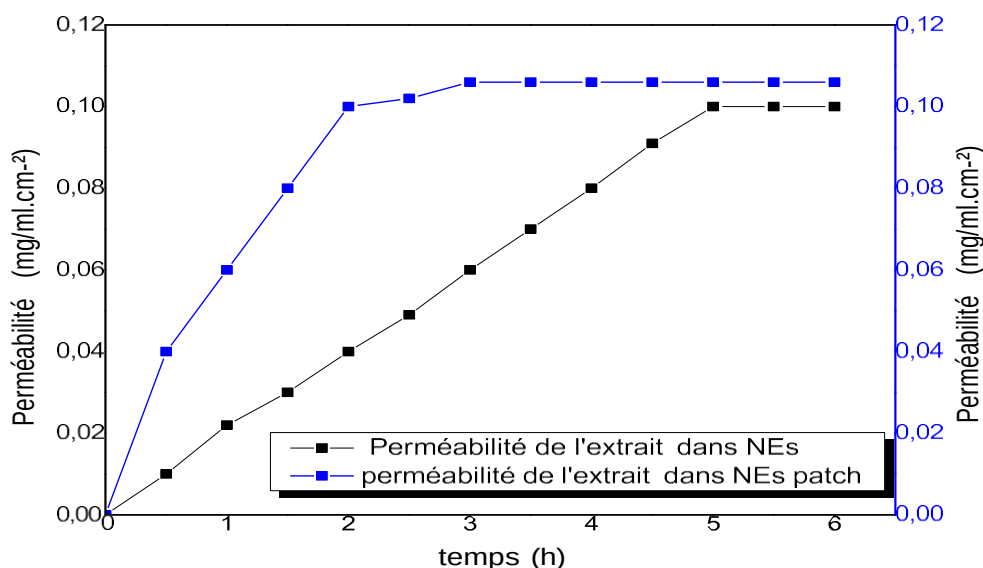


Figure V.15 : La perméation de l'extrait éthanolique à partir des NEs et de NEs dans patchs transdermiques par la cellule de FRANZ

Comme présenté sur la figure V.15, la perméabilité de l'extrait de *T. polium* de NEs dans le patch transdermique était significativement plus élevée que la perméation de l'extrait de *T. polium* de NEs au cours de la période d'étude de 6h. Cette figure révèle que les deux courbes comprennent principalement deux phases, la première phase indique une augmentation de la perméabilité en fonction du temps. Les quantités diffusées de l'extrait de *T. polium* imprégnés de la nanoémulsion dans le patch et la nanoémulsion étaient de 0.04 mg/mL.cm⁻²/h et 0.01 après 30 min respectivement et ces valeurs augmentent progressivement atteignant une perméabilité de 0.102 mg/mL.cm⁻²/h pour l'extrait de *T. polium* imprégnés de la nanoémulsion dans le patch et une perméabilité de 0.049 mg/mL.cm⁻²/h pour l'extrait de *T. polium* de la nanoémulsion au bout de 2h.

Les augmentations ont été toujours enregistrées dans la perméation de l'extrait de *T. polium* de la nanoémulsion jusqu'à 0.091 mg/mL.cm⁻²/h au bout de 4.5 heures, puis une deuxième phase qui indique une stabilité de la perméation. Pour les deux formulations, la perméation se stabilise et reste constante avec une teneur de 0.106 mg/mL.cm⁻²/h à partir de 3 heures jusqu'à 6 heures pour l'extrait de *T. polium* de NEs dans le patch, et de 0.1 mg/mL.cm⁻²/h à partir de 5 heures jusqu'à 6 heures pour l'extrait de *T. polium* de la nanoémulsion. Les résultats de cette étude révèlent que l'extrait de *T. polium* de NEs dans le patch a démontré une amélioration de la perméation par rapport au l'extrait de *T. polium* de la nanoémulsion, cette amélioration a été attribuée probablement à la petite taille des gouttelettes qui ont été conservées dans le patch, ce qui entraîne une plus grande surface. De plus, une pénétration accrue peut résulter de l'influence de l'effet combiné de la composition de la formulation, comme les tensioactifs, les co-tensioactifs et les

huiles, qui rendent les médicaments plus solubles et perméables [186]. Ces résultats reflètent aussi un profil de libération prolongée qui est probablement due à la fois à l'érosion de la couche externe de la nanoémulsion et au piégeage des extraits dans le noyau, où la phase huileuse agit comme une barrière au transport hydrophile des médicaments. [187]

V. 13. Rendement d'extraction

L'extraction de l'huile essentielle (HE) de la partie aérienne de *Teucrium polium*. L par la méthode d'hydrodistillation a donné une huile d'une couleur jaunâtre avec une odeur très forte et persistante dont le rendement est de 0,66%. Ce rendement a été comparé avec des valeurs rapportées dans la littérature. Notre résultat obtenu paraît plus important que celui enregistré par Boukhebt et al.,[188] avec une valeur de **0.11%** et Chabane et al [152]., avec une valeur de **0,53%** pour la plante récoltée à Sétif et M'sila en Algérie respectivement. l'étude effectuée par Al-Otaibiet al.,[189] a donné un rendement de **0.26 %** pour le *T. polium* de la région de EL Riyadh en Arabie saoudite. Ce résultat montre que le rendement diffère d'une région à une autre, on s'aperçoit que des valeurs supérieures à celles de notre étude ont été obtenues par Sabz et al.,[190] et par Moghtader.,[191] en Iran, cette teneur est égale à **1,3 % et 0.75%** respectivement, dans la recherche menée par Maizi et al.,[192], les rendements enregistrés sont **0.82%** et **0.56%** pour la même espèce collectée à Mascara en Algérie, et par la même méthode d'extraction mais durant différentes périodes de récolte. Ces variations peuvent être dues à plusieurs facteurs, notamment le degré de maturité des fleurs, l'interaction avec l'environnement (type de sol et température), le moment de la récolte et la méthode d'extraction.

V. 14. Analyse physico-chimique de l'huile essentielle

L'indice de réfraction, l'indice d'acide et l'indice d'ester sont des paramètres qui caractérisent la pureté d'une huile essentielle, ils sont considérés comme des moyens de vérification et de contrôle de la qualité d'une huile essentielle étudiée. Ces caractéristiques physico-chimiques ont été déterminées selon des protocoles précis et selon les normes AFNOR.

a. Indice de réfraction

Cet indice est utilisé pour identifier la pureté de l'huile essentielle de la plante *Teucrium polium* L. Le résultat enregistré dans notre étude est de 1.4710, cette valeur est située dans

l'intervalle de « 1.4670 et 1.4740 » et donc elle est conforme aux normes, ce résultat est similaire à la valeur attendue. A partir de cette valeur nous pouvons dire que notre huile essentielle est pure et de qualité satisfaisante.

b. Indice d'acide

Dans notre étude, l'huile essentielle obtenue a révélé une valeur d'indice d'acide égale à 1.8, conforme aux normes NFT-60 -2000 ; Sachant qu'une faible valeur d'acidité (un indice d'acidité inférieur à 2) caractérise la pureté et la stabilité d'une huile à la température ambiante. Notre valeur obtenue confirme que cette huile essentielle a été bien conservée comme l'indique Belkhodja [193].

c. Indice d'ester

La valeur de l'indice d'ester de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L est de 839,7. Plus l'indice ester est élevé, plus la qualité de l'HE sera meilleure [193].

V. 15. Analyse par chromatographie GC/MS

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *T. polium* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) et le profil chromatographique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L est illustré sur la figure V.16.

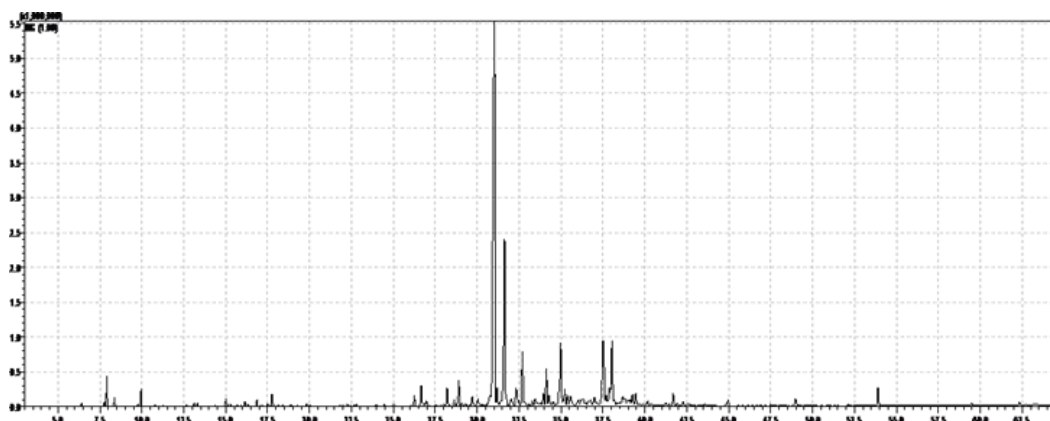


Figure V.16 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L.

La composition de l'huile essentielle des parties aériennes de *T. polium* cultivées dans la wilaya de Bouira, déterminée par GC/MS est mentionnée sur le **tableau V.9**.

Tableau V.9 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L

N	TR	IR Cal	IR Lit	Composés	Aire %
1	6.411	935	939	α -Pinène	0.14
2	7.762	974	976	Sabinène	0.17
3	7.913	979	980	β -Pinène	1.21
4	8.361	992	991	β -Myrcène	0.36
5	9.764	1025	1026	p-Cymène	0.08
6	9.956	1030	1030	Limonène	0.78
7	10.767	1048	1050	(E)- β -Ocimène	0.07
8	13.129	1101	1098	Linalool	0.13
9	15.010	1140	1136	Isopinocarveol	0.34
10	15.297	1146	1145	Trans-Verbenol	0.09
11	16.138	1164	1164	Pinocarvone	0.24
12	16.854	1179	1177	Terpinen-4-ol	0.33
13	17.492	1192	1189	α -Terpineol	0.10
14	17.761	1198	1196	Myrtenal	0.73
15	19.818	1241	1242	Cuminaldéhyde	0.12
16	22.246	1292	1287	Cumin alcohol	0.06
17	22.803	1304	1298	Carvacrol	0.09
18	26.664	1388	1385	Bourbonène	1.17
19	26.880	1393	1390	β -Cubébène	0.19
20	26.967	1395	1394	β -élemène	0.25
21	28.208	1423	1428	Caryophyllène	1.09
22	28.632	1433	1430	β -Copaène	0.32
23	28.895	1439	1432	Trans- α -Bergamotène	1.52
24	29.069	1443	1445	trans- β -Farnesene	0.17

25	29.710	1458	1455	α – Humulène	0.52
26	30.777	1482	1477	γ -Muuroène	0.79
27	31.032	1488	1485	Germacrène D	37.68
28	31.183	1492	1489	β – Selinène	0.85
29	31.390	1497	1498	α -Selinène	0.18
30	31.622	1502	1499	Bicyclogermacrene	11.87
31	31.725	1505	1500	α -Muuroène	0.05
32	32.034	1512	1509	β – Himachalène	0.61
33	32.310	1519	1514	γ -Cadinène	1.45
34	32.476	1523	1519	α -Panasinsèn	0.25
35	32.688	1528	1524	δ-Cadinène	3.22
36	33.288	1543	1542	Selina-3,7(11)-diene	0.21
37	33.449	1546	1540	α – Bisabolène	0.36
38	33.938	1558	1553	β -Vetivenene	0.67
39	34.121	1563	1561	Germacrène B	2.03
40	34.970	1583	1582	Spathulenol	4.75
41	35.213	1589	1590	Globulol	1.08
42	35.399	1594		7-epi-cis-sesquisabinene Hydrate	0.51
43	35.553	1598	1594	Viridiflorol	0.65
44	36.033	1610	1608	Cédrol	0.39
45	36.317	1617	1618	Widdrol	0.67
46	36.635	1625	1627	Junenol	0.29
47	36.983	1634	1629	epi-cubenol	0.35
48	37.495	1647	1641	epi-α- Muurolol	3.78
49	37.525	1648	1648	T-Cadinol	2.79
50	37.689	1652	1652	α – Cadinol	0.64
51	37.888	1657	1652	α - Eudesmol	1.20
52	38.038	1661	1664	14-hydroxy-9-epi-trans-Caryophyllène	4.36
53	38.678	1677	1674	5-Isocedranol	0.20
54	38.950	1684	1676	Mustakone	0.23
55	39.102	1688	1686	α - Bisabolol	0.18
56	39.253	1692	1694	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 β -Ol	0.55
57	39.450	1697	1701	Schyobunol	0.68
58	41.684	1757	1752	α -Cyperone	0.73
59	42.277	1773	1778	β -Costol	0.17
60	40.163	1716	1715	Pentadecanal	0.19
61	44.946	1848	1847	Hexahydrofarnesyl Acetone	0.25
62	48.985	1965	1968	n-Hexadecanoic acid	0.40
63	53.895	2107	2106	Phytol	1.03

Monoterpènes	2.94
Monoterpènes oxygénés	2.1
Sesquiterpènes	65.13
Sesquiterpènes oxygénés	24.52
composants mineurs	2.91
total	97.61

L'analyse chromatographique de l'HE de *T. polium* a mis en évidence l'existence de soixante-six composés qui représentent environs une teneur totale de **97.61%**. Cette composition chimique est dominée par les composés sesquiterpéniques (Sesquiterpènes **65.13%** et Sesquiterpènes oxygénés **24.52%**) avec un pourcentage égal à **90.21%**, dont les principaux composés sont **Germacrène D (37.68%)**, **Bicyclogermacrene (11.87%)** suivis du **Spathulenol (4.75%)**, **14-hydroxy-9-epi-trans-caryophyllène (4.36%)**, **epi- α - Muurolol (3.78%)** et **δ -Cadinène (3.22%)**. Le reste de l'huile correspond soit à des composants mineurs, soit à d'autres composés non identifiés en quantités de traces.

Nos résultats sont en accord avec l'étude effectuée par Belmekki et al.,[194] sur l'huile essentielle de la même espèce de la région de Tlemcen, cette étude a montré une huile essentielle riche en germacrène D (**25.82%**), le bicyclogermacrene (**13%**), Spathulenol (**6.53%**). Les résultats d'autres recherches réalisées dans différentes régions en Algérie ou dans différents pays du monde, semblent différents à ceux trouvés dans cette présente étude. En Algérie, dans la région de M'sila, Chabane et al., [152] décrivent une huile essentielle riche en β -pinène (**33%**), germacrène D (**17%**), Myrcene (**8%**) et limonène (**7%**), en Arabie Saoudite, selon les travaux réalisés par Al-Otaibi et al.,[189], les principaux composés identifiés sont τ -cadinol (**25.58%**), α -fenchene (**20.09%**), β -eudesmol (**11.76%**), β -myrcene (**8.02%**), γ -cadinene (**5.22%**) et dans l'étude de sabz et al.,[190] portant sur l'huile essentielle de *Teucrium polium* provenant d'Iran, on note la prédominance du β -Thujone (**37.57%**), 1,8 cineole (**8.13%**), terpinene-4-ol (**4.98%**), Borneol (**4.61%**), cis-9-Octadecenal (**3.92%**), et transpinocarveol (**3.20%**).

Ces résultats mettent en évidence la grande variabilité chimique de l'HE de *T. polium* d'une région à une autre. Cette variabilité pourrait être due à plusieurs facteurs : caractéristiques géologiques et physicochimiques de l'environnement de la population végétale, généralement, les HES des espèces *Teucrium* sont principalement constituées d'hydrocarbures sesquiterpéniques et / ou de sesquiterpènes oxygénés. Dans ce sens, Sadeghi et al., [195] ont étudié la variabilité dans la composition chimique de l'huile essentielle de *Teucrium polium*.L de différentes populations et a rapporté que le rapport sesquiterpènes / monoterpènes des plantes récoltées à la haute altitude étaient plus élevés que celui recueilli à la basse altitude. Il semble que l'augmentation de l'altitude a tendance à produire plus de sesquiterpènes et moins de monoterpènes. La partie de la plante

utilisée, la période de récolte, la nature du sol et la méthode d'extraction des huiles essentielles [15].

V.16. Activité antioxydante

V. 16.1.La méthode de DPPH

L'activité antioxydante mesurée par la capacité de réduire les radicaux libres. Les résultats obtenus du test de mesure de l'absorbance du radical libre DPPH, nous a permis de tracer les graphes de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration (**Figure V.17 et Figure V.18**).

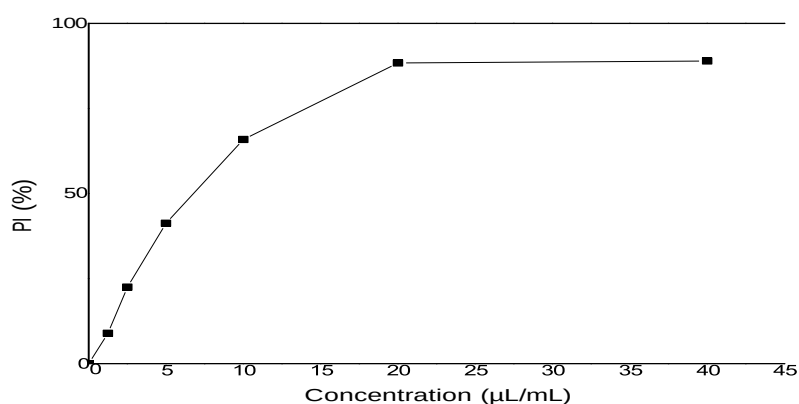


Figure V.17 : Pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle.

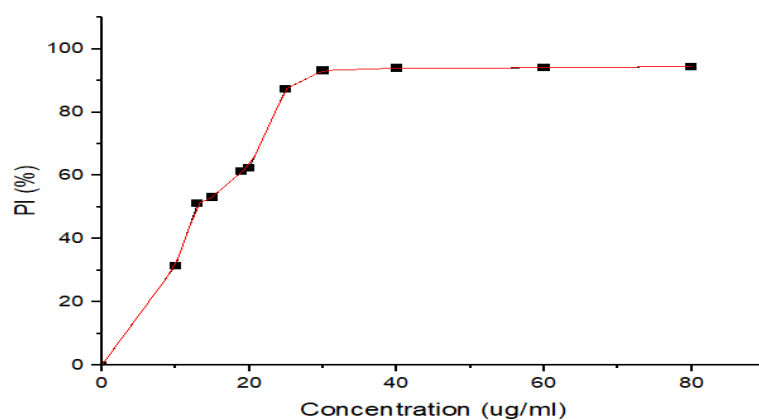


Figure V. 18 : Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique.

Tableau V. 10 : Activité antioxydante exprimée par l'IC₅₀

Échantillons	IC ₅₀
Huile essentielle de <i>Teucrium polium</i> .L	06µL/mL
Acide ascorbique	12.5µg/mL

Le pourcentage d'inhibition (IC₅₀) calculé à partir des courbes **des figures V.17 et V.18** et les valeurs présentées dans **le tableau V.10** ont été estimés à l'ordre de 06 µL/mL pour l'huile essentielle de l'espèce *Teucrium polium* L et 12.5 µg/mL pour l'acide ascorbique. À partir de ces résultats, il apparaît que la valeur obtenue d'IC₅₀ de l'huile essentielle de *T. polium* est très importante comparativement à celle de l'acide ascorbique prise comme un standard naturel. Nous pouvons dire que ces résultats suggèrent que l'huile extraite présente une activité antioxydante prometteuse.

Dans une enquête réalisée par Mahmoudi et al.,[196] sur l'activité antioxydante de l'HE de *Teucrium polium* L par la méthode du DPPH, il a montré que cette HE avait une activité antioxydante avec une valeur d'IC₅₀ égale à 9200 µg/mL, les études antérieures de Maizi et al.,[192] ont donné pour les HE de *Teucrium polium*.L, récoltées dans la période hivernale une valeur d'IC₅₀ égale à 3,90 mg/mL et pour l'activité antioxydante de HE de la même plante récoltée dans la période de floraison une valeur d'IC₅₀ égale à 16,14 mg/mL, en utilisant la méthode DPPH. les résultats trouvés par Al-Otaibi et al.,[189] sur l'activité antioxydante de l'HE de la même espèce et réalisé par la même méthode a révélé une concentration d'inhibition (IC₅₀) égale à 61,38 µg/mL. D'autres recherches sur l'activité antioxydante de l'HE d'une autre espèce de plante *Teucrium polium* (*subsp. capitatum* (L.) Briq) en utilisant toujours la méthode DPPH, a enregistré une activité de piégeage de l'huile essentielle avec une valeur IC₅₀ de 5550,33 µg/mL [152]. A la lumière de ces résultats, l'activité antioxydante des HES de *T. polium* pourra être attribuée aux variations des conditions climatiques et des facteurs environnementaux, les emplacements géographiques et les différences génétiques. Les écarts pourraient également être dus à des différences dans les méthodes utilisées pour l'extraction de l'huile [197]. Ces facteurs influencent grandement les propriétés antioxydantes du l'huile de *Teucrium polium*. En outre, la capacité de piégeage des radicaux libres de l'huile de *Teucrium polium* peut probablement être liée à la concentration élevée des composants majeurs, à la variation de la composition chimique, à la présence/absence de monoterpènes oxygénés, d'hydrocarbures monoterpéniques et de

sesquiterpènes (variations qualitatives et quantitatives des sesquiterpènes et des monoterpènes). Par ailleurs, définir la ou les composantes responsables de cette activité est très difficile [192].

V.17. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été évaluée *in vitro*, en testant quatre souches de bactéries contre différentes concentrations de l'huile essentielle de la plante *Teucrium polium L.*, en mesurant les zones d'inhibition (mm) et en déterminant les valeurs de CMI ($\mu\text{g/mL}$).

Les résultats ont montré que les valeurs mesurées sont très variables en fonction de la souche testée et de la concentration utilisée. Les résultats sont rapportés dans le **tableau V.11**.

Tableau V.11 : Diamètre des zones d'inhibition (mm).

Souches bactériennes	Huile essentielle ($\mu\text{g/ml}$)						Référence	
	80	40	20	10	5	2.5	Tétracycline	Gentamicine
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	20	10	09	09	08	08	14	25
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	19	11	10	09	09	09	19	29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	09	09	08	08	08	08	25	24
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	11	09	08	08	08	08	21	27

Les résultats obtenus et illustrés sur le **tableau V.11** ont montré que l'huile essentielle à une concentration de $80\mu\text{g/ml}$ exprime une forte efficacité sur les souches bactériennes *Bacillus subtilis* et *S. aureus* avec des diamètres élevés des zones d'inhibition (20mm et 19mm). Cette efficacité peut être considérée comme extrêmement sensible et très sensible respectivement. La présence d'une zone d'inhibition bien appréciable autour de l'huile testée permet de constater une activité relativement importante vis-à-vis des bactéries Gram +. On note que les différentes concentrations ont agi différemment sur toutes les souches testées, leurs actions sont variables. Elle était sensible sur *S. aureus* et *E. coli* (11mm) à $40\mu\text{g/ml}$ et $80\mu\text{g/ml}$ respectivement, et une faible réactivité (non sensible) est présentée sur *P. aeruginosa* et *E. coli* (inférieure à 09 mm) pour toutes les concentrations, ces souches bactériennes de Gram- se sont avérées les plus résistantes.

A partir du **tableau V.11**, la zone d'inhibition de la concentration ($80\mu\text{g/ml}$) contre la souche bactérienne *Bacillus subtilis* a donné une valeur de (20 mm) qui est supérieure à la zone d'inhibition mesurée par la tétracycline (14 mm) contre la même souche bactérienne, on constate

que les diamètres mesurés pour la référence tétracycline et la concentration (80µg/ml) contre la souche *S. aureus* sont égaux (19 mm), par contre la zone d'inhibition mesurée par cette référence est supérieure à celle mesurée pour les autres concentrations contre les différentes souches bactériennes, pour les zones d'inhibitions enregistré par la référence Gentamicine restent plus élevées comparativement aux zones d'inhibitions trouvées par les différentes concentrations contre toutes les souches bactériennes testées .

D'après les résultats obtenus, l'activité antibactérienne des huiles essentielles ou son mode d'action vis-à-vis des souches utilisées peut être attribuée principalement aux constituants majoritaires de cette huile, du type de microorganismes et de sa concentration. En général, les bactéries Gram négative sont plus résistante que les bactéries Gram positives à cause de la structure de leur membrane externe [198], elle peut être également liée aux conditions de séchage et de broyage de la plante et dépend également de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction.

La CMI de l'huile essentielle de *Teucrium polium L.*, est de 5µg/mL avec *B. subtilis* et 10µg/mL pour *S. aureus* et 20µg/ml pour *P. aruginosa* et *E. coli*, ces CMI extrêmement faibles montrent un effet bactériostatique de cette huile essentielle.

V.18. Caractérisation des nanoémulsions formulées avec l'huile

- **Mesure de la distribution de taille, potentiel zêta et l'indice de polydispersité des nanoémulsions par Dls**

Les mêmes caractéristiques pour les nanoémulsions précédemment formulées avec l'extrait ont été déterminées à savoir la taille des gouttelettes, l'indice de polydispersité et le potentiel zêta déterminés par DLS, les résultats trouvés sont présentés sur **le tableau V.12**.

TableauV.12 : Taille des particules, de l'indice de polydispersité (PI) et du potentiel zêta de nanoémulsion

	Taille des gouttelettes (nm)	Indice de polydispersité (PI)	Potentiel zêta (mV)
Nanoémulsion de l'huile essentielle	65.0	0.35	+30

La formulation obtenue dans notre étude a présenté un aspect liquide homogène, avec une couleur transparente et une odeur puissante. La taille des gouttelettes de la formulation

élaborée était uniforme de l'ordre du nanomètre (65nm), inférieure relativement à celle trouvée précédemment. Cette réduction de la taille des gouttelettes peut être attribuée à l'augmentation de la concentration en tensioactif [199], à une interface huile-eau plus grande, à la condensation et à l'expansion du film interfacial du tensioactif et le co-tensioactif [186]. Cette surface interfaciale produite par les petites gouttelettes peut augmenter la perméabilité des composés actifs à travers les membranes des vaisseaux sanguins et des tissus [200]. Dans notre étude, on a mesuré l'indice de polydispersité (PI) qui est utilisé pour mesurer l'homogénéité ou l'hétérogénéité des tailles de particules au sein des formulations, il est rapporté dans la littérature que des valeurs normales du PI s'échelonnent de 0 à 1 [186], la valeur de l'indice de polydispersité (PI) enregistré dans notre recherche est égale à 0,35, cette valeur est inférieure à 1, ce qu'indique que notre formulation présente une distribution monodispersée et une bonne stabilité, on peut conclure que cette valeur est souhaitable pour des nanoémulsions homogènes. Le potentiel zêta obtenu est égal à +30 mV, d'après les recherches réalisées, une valeur de potentiel zêta plus élevée, positive ou négative (supérieures à +30 mV ou inférieures à -30 mV), a été recommandée pour la formulation des nanoémulsions stables sans agrégations. Ces valeurs élevées (de potentiel zêta) ont confirmé les forces de répulsion électrostatiques entre les gouttelettes de l'huile essentielle, empêchant leur coalescence et aboutissant à une dispersion uniforme ayant une stabilité suffisante [201].

- **Etudes de stabilité thermodynamique des NEs**

Les analyses ont été réalisées chaque semaine par DLS afin de déterminer la taille des gouttelettes, le degré de stabilité et d'homogénéité de NEs révèlent que la taille n'a pas été modifiée significativement durant la période de stockage et le PI reste toujours inférieure à 1 comme indique **le tableau V.13**, ce qui signifie que cette nanoémulsion reste homogène et donc la formulation reste stable ($-30 \text{ mV} \leq \text{potentiel zêta} \leq +30 \text{ mV}$). D'après ces résultats on peut dire que la transparence dans la formulation de nanoémulsions est un paramètre critique qui indique que la taille de leurs gouttelettes est très faible (20 à 200 nm) et que cette nanoémulsion possède une stabilité contre la coalescence et la sédimentation [186].

Tableau V.13 : La stabilité de nanoémulsion stocké.

	Taille des gouttelettes (nm)	Indice de polydispersité (PI)
1 ^{er} semaine	66.6	0.40
2 ^{ème} semaine	66.7	0.42
3 ^{ème} semaine	65.5	0.38
4 ^{ème} semaine	60.3	0.29

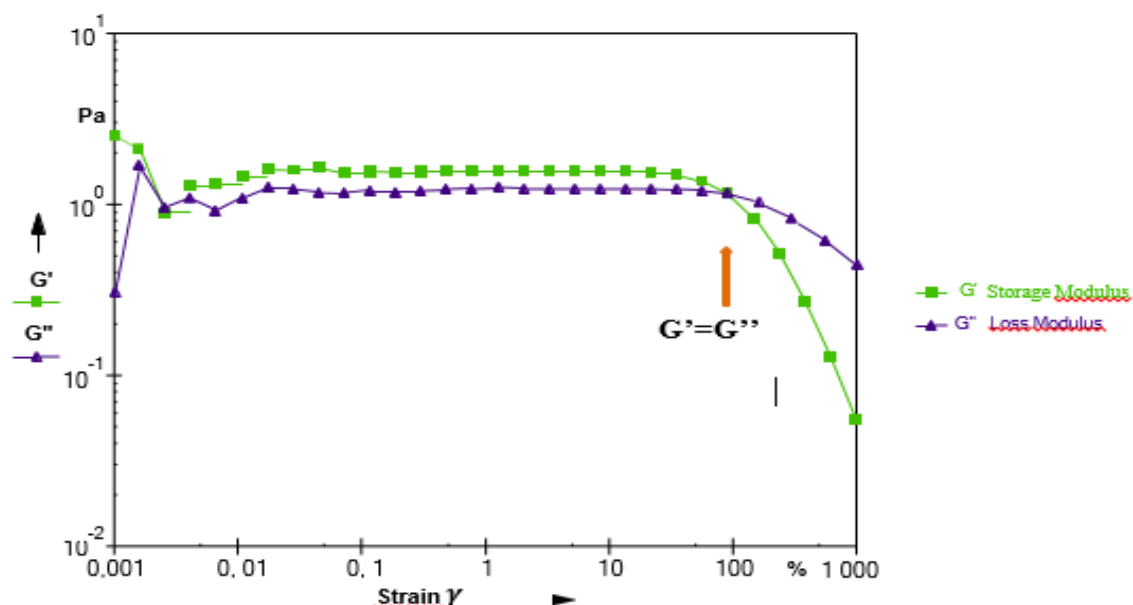
À la lumière de ces résultats, on peut déduire que les nanoémulsions transparentes, monophasées et sans turbidité, peuvent présenter une durée de conservation plus longue.

- **Etude rhéologique**

Afin d'estimer les comportements rhéologiques et déterminer la viscosité des NEs, on a eu recours à des analyses rhéologiques.

- **a. Test de viscoélasticité**

La courbe de viscoélasticité est donnée en termes de G' en fonction de la vitesse de cisaillement γ (%). Avec G' considéré comme le module de conservation et il caractérise la réponse en phase avec la déformation. Il est associé à la réponse du comportement élastique (Pa).

Figure V.19 : Comportement viscoélastique de la nanoémulsion pour une fréquence $f=1\text{Hz}$.

La zone LVE est définie comme étant la valeur pour laquelle le module G' décrit un plateau pour les faibles déformations. On observe que l'écart entre G' et G'' est petit ce que signifie que le comportement de NEs est proche d'un solide. Lorsque le module élastique G' est supérieur au module visqueux G'' dans la zone LVE, donc notre dispersion est viscoélastique. Et au point de croisement lorsque $G'=G''$, la valeur de déformation ou contrainte seuil représente une valeur de déformation suffisante pour désorganiser les particules et modifier le réseau de particules connectées et obtenir un comportement liquide (inversement de comportement).

Au-delà de cette valeur, pour des déformations élevées, le comportement liquide domine, le module visqueux G'' est plus élevé que le module élastique G' . On observe bien une décroissance en fonction du taux de cisaillement caractéristique des fluides non Newtoniens.

b. Test d'écoulement

Dans cette partie de l'étude, des propriétés rhéologiques de NEs sont présentées. L'évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement est donnée dans la figure ci-dessous.

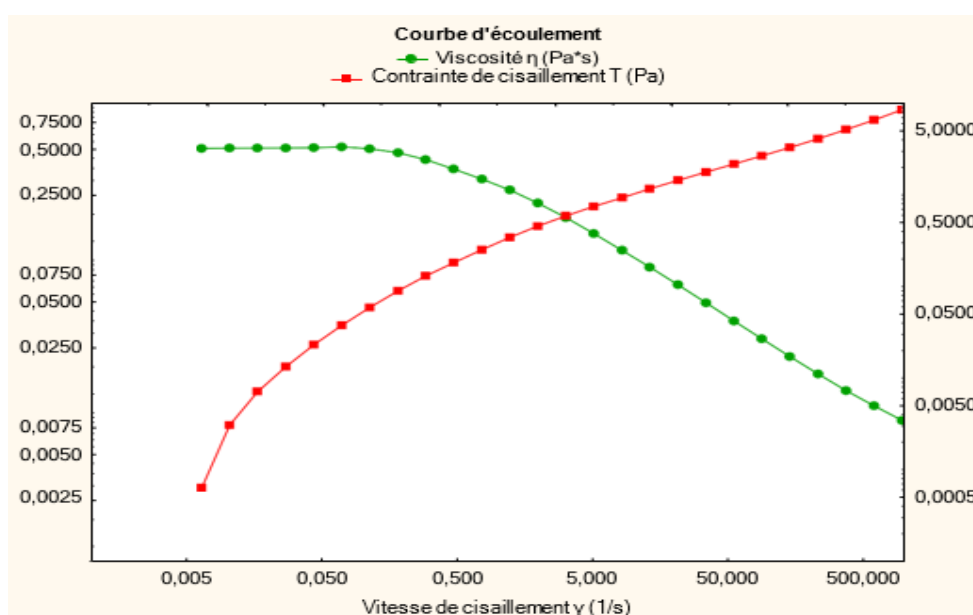


Figure V.20 : Evolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement $0.005-500^{-1}$.

On observe deux parties dans l'évolution de la viscosité, dont le premier domaine caractéristique d'un comportement Newtonien (viscosité constante en fonction de la vitesse de cisaillement) et une deuxième typique d'un système rhéo-fluidifiant (la diminution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement).

V.19. Caractérisation des patchs à base d'huile essentielle

V.19.1. Caractérisations physico-chimiques des patchs

Tableau V.14 : Épaisseur, variation de poids et pliage d'endurance du patch transdermique.

	Épaisseur (μm)	Variation poids (mg)	de pliage d'endurance
Patch	250	21.02	>80

Tous les patchs préparés étaient conformes aux exigences de la pharmacopée, En effet, le patch préparé était lisse, transparent, non collant et homogène. Il présentait une forme géométrique arrondie (**Figure.V.21**), avec un diamètre de 120 mm et une épaisseur de 250 μm et un poids de 21,02 mg. Le patch a montré une capacité d'endurance au pliage supérieure à 80 plis, cette valeur présente une excellente endurance au pliage c'est-à-dire une bonne flexibilité

Ce patch transdermique est resté intact après application sur la peau et se détache facilement après épuisement du PA (**Figure.V.22**). Ces résultats démontrent une résistance et une élasticité suffisantes, ce qui facilite leur utilisation quotidienne pour les patients.



FigureV.21 : Une photo prise sur un film à base de CMC/Gel/PVA.



Figure.V.22 : Adhésion des patches sur le derme ; (a) : patch collé et (b) : décollement du patch.

V. 20. Etude de la diffusion du PA par la cellule de FRANZ

Afin d'étudier la diffusion de l'huile encapsulée dans des NEs et dans les nanoémulsions dans le patch, on a utilisé la cellule de Franz.

Les résultats obtenus sont présentés sur **la figure V.26**, la perméabilité de l'HE de ***T.polium*** encapsulée dans NEs incorporée dans le patch transdermique était significativement plus élevée que la perméation de l'HE de ***T.polium*** dans NEs au cours de la période d'étude de 6h.

La figure révèle que les deux courbes comportent deux types de libération de l'HE, on a observé au début des courbes, une libération immédiate de HE dès le premier contact avec la peau et reste environs une demi-heure pour le patch mais qui dure presque 2 heures pour la nanoémulsion, suivi d'une libération prolongée pendant le reste du temps de l'expérience (4h et demi pour le patch et 2h pour la nanoémulsion), ces profils de libération ont pu donner des informations sur la perméation de l'HE (comme principe actif) dans le stratum corneum (couche cornée) de l'épiderme. La perméation de cette huile essentielle de ***T.polium*** imprégnés de la nanoémulsion dans le patch et la nanoémulsion étaient de $0.964 \text{ mL/mL.cm}^{-2}/\text{h}$ et $0.682 \text{ mL/mL.cm}^{-2}/\text{h}$ après 15 min respectivement, ces valeurs augmentent pour atteindre une perméabilité très remarquable de $2.734 \text{ mL/mL.cm}^{-2}/\text{h}$ pour l'huile de ***T.polium*** encapsulée dans la nanoémulsion imprégnée dans le patch et une légère perméabilité de $0.964 \text{ mL/mL.cm}^{-2}/\text{h}$ pour l'HE de ***T.polium*** dans la nanoémulsion au bout de 30 min, la perméation de l'HE de ***T.polium*** dans la nanoémulsion est toujours en croissance jusqu'à une valeur de $2.125 \text{ mL/mL.cm}^{-2}/\text{h}$ en 1 heures et demi. Au cours de cette expérience, on a enregistré une stabilité de la perméation, pour les deux formulations, elle se stabilise et reste constante avec une teneur de $2.79 \text{ mL/mL.cm}^{-2}/\text{h}$ à partir de

30min jusqu'à 6 heures pour l'HE de *T.polium* encapsulée dans NEs incorporée dans le patch, et de 2.13 mL/mL.cm⁻²/h à partir de 2 heures jusqu'à 4 heures pour l'HE de *T.polium* encapsulée dans la nanoémulsion. Les résultats de cette étude révèlent que l'HE de *T.polium* de NEs dans le patch permettent une amélioration de la perméation par rapport à l'HE de *T.polium* de la nanoémulsion, cette amélioration a été attribuée probablement à la petite taille des gouttelettes qui ont été conservées dans le patch, ce qui entraîne une plus grande perméabilité. En outre l'influence de l'effet combiné de la composition de la formulation (les tensioactifs, les co- tensioactifs et les huiles), provoque une pénétration accrue, ce qui rend les médicaments plus solubles et perméables [186].

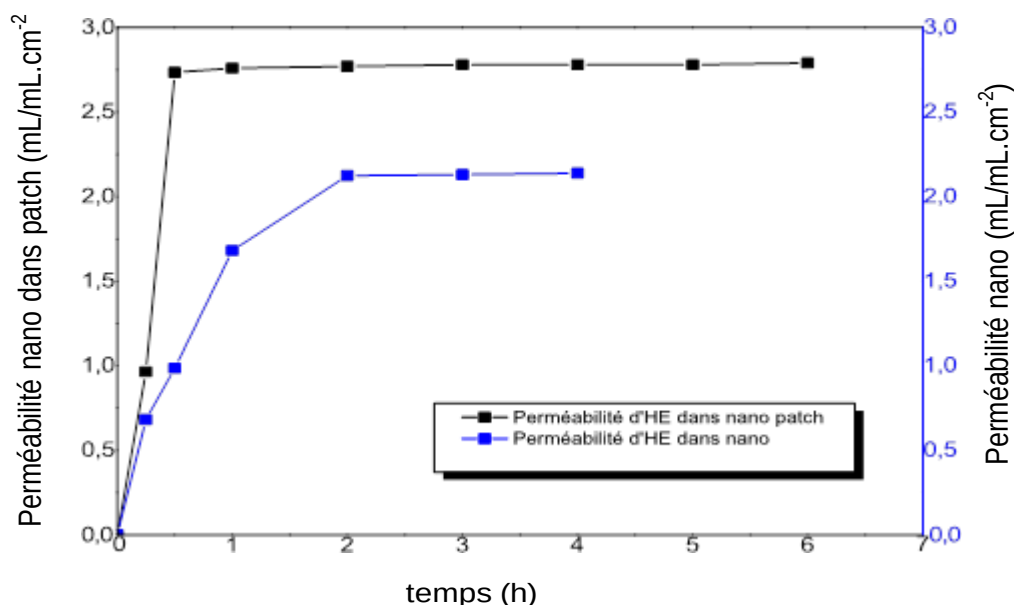


Figure V.23 : La perméation de l'HE à partir des NEs et de NEs dans patchs transdermiques par la cellule de FRANZ.

V. 21. Activité cicatrisante

Durant la période de la cicatrisation, l'évolution de la surface de chaque excision de plaie a été évaluée tous les 4 jours chez les animaux traités par la nanoémulsion, le patch, la crème cicatryl bio comme référence et sur les plaies non traitées (témoin). Les résultats sont rapportés dans le **tableau V.15**.

Tableau V.15 : Pourcentage de rétraction % des plaies de différents groupes

Jours	Témoin	Crème Cicatryl bio	Nanoémulsion	patch
J4	36.88	28.95	29.19	32.33
J8	73.75	54.73	63.33	75.55
J12	78.5	68.98	80.08	94.23
J15	86.9	81.52	92	97.46
J18	89.6	91	98.09	99.87

Les observations des plaies aux premiers jours (**J4**), indiquent que les groupes traitées par la nanoémulsion enregistrent un pourcentage de diminution de la surface de la plaie identique à celle de la crème Cicatryl bio, par contre le lot traité avec le patch, a donné une diminution significative de la surface de la plaie par rapport au même groupe, cette observation montre que ces valeurs sont inférieures à la valeur enregistrée pour le groupe témoin, à partir du **J8**, les pourcentages de rétraction des groupes traités par NEs et patch ont augmenté significativement et ont donné des pourcentages atteignant les **63.33% et 75.55%** respectivement par rapport au groupes traités par le médicament de référence et le groupe non traité, **les** pourcentages de rétraction pour les quatre groupes traités continuent à augmenter jusqu'à la fin du traitement (du **J12 à J18**), ces valeurs montrent que les plaies traités par NEs et le patch ont totalement cicatrisées avec un pourcentage de rétraction de **98,09% et 99.87%** respectivement, contre **89.6%** pour le lot non traité (Témoin) et **91%** pour le lot traité par la crème de référence Cicatryl bio. Dans notre étude et à la lumière des résultats trouvés, le traitement améliore significativement le processus de cicatrisation après l'excision chez les rats. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le patch, le traitement a eu un fort impact sur l'épithélialisation des plaies, a accéléré la réparation des tissus et a réduit la durée de ce processus. Donc on peut déduire que la plante ***Teucrium polium*** accélère la cicatrisation grâce à son activité antioxydante en détruisant les radicaux libres au sein de la plaie [202].

Les observations visuelles au premier jour après l'excision de la peau et durant la première semaine, des deux lots traités avec la NEs et le patch ne démontrent aucun signe d'infection ou d'inflammation, ces observations sont comparables à celles rapportées par l'étude réalisée par Ansari et al., [55] sur des brûlures et qui suggèrent que la plante est capable de moduler la réponse inflammatoire à des degrés variables de sévérité tels que la formation d'œdème, la perméabilité vasculaire, contrairement au groupe traités avec la crème Cicatryl bio, les observations visuelles indiquent la présence d'un tissu enflammé et granuleux aussi pour le lot témoin, on a marqué la présence d'un Œdème et d'une hémorragie, , à partir de **12^{ème}** jour ces signes disparaissaient dans

le groupe traité avec cicatryl bio et dans le groupe non traité, avec la présence des exsudats clairs, on a observé aussi pour les différents lots , le début de découlement de la croute, à partir de **J15**, le découlement totale de la croute avec la poussé des poils et le début d'épidémisation ont été observé pour les quatre lots, à **J18** des observations identiques ont été enregistré pour le groupe traité avec NEs , patch et pour le groupe traité avec la crème de référence Cicatryl bio qui montre le poussé des poils et la cicatrisation totale, avec un différence légère pour le groupe Témoin qui indique aussi le poussé des poils mais une cicatrisation presque totale.

V. 22. Etude histologique

Les résultats de l'examen histologique sont présentés sur **la figure 24**, qui permet de comparer des zones cicatricielles des différents groupes expérimentaux (traités ou non).

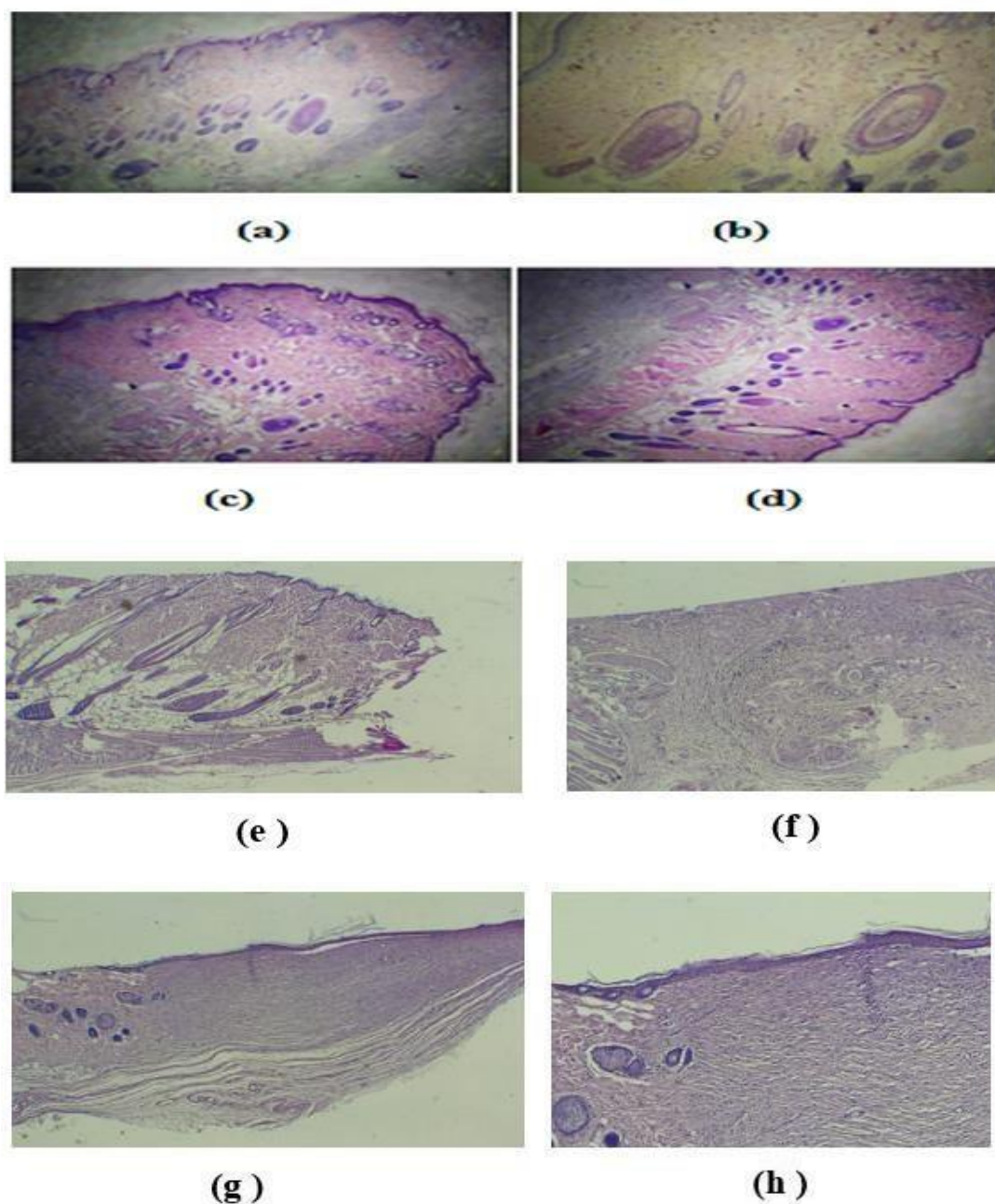


Figure V.24 : Illustrations des coupes histologiques issues des différents groupes expérimentaux, (a), (b) le témoin, (c), (d) la référence, (e), (f) traité avec la nanoémulsion et (g), (h) traité avec le patch.

L'étude présente dans **la figure V.24** montre les coupes histologiques des différents groupes expérimentales (traités avec la nanoémulsion, le patch, référence, et témoin). Pour le groupe non traité (Témoin), les coupes histologiques montrent la présence des vaisseaux congestifs ce qui révèle la présence d'une inflammation modérée, ces coupes histologiques montrent aussi la présence des follicules pileux, ces résultats indiquent une cicatrisation en cours.

Les résultats des coupes histologiques de groupe traité par Cicatryl bio comme groupe de référence présentent une inflammation modérée, des mélanophages et la formation de tissus fibreux présentent, ce qui suggère une bonne cicatrisation.

Les coupes histologique du groupe traité avec la nano-émulsion, présentent une conservation du revêtement cutanée, ces coupes révèlent la présence des vaisseaux congestive avec quelques éléments inflammatoire, elles montrent la présence des melanophages et des follicules pileux, ce qui indique une phase terminale de cicatrisation. Pour les coupes histologiques du lot traité avec le patch, elles montrent une conservation du revêtement cutanée avec la présence des follicules pileux, ces observations donnent l'information que la peau traité avec le patch a été bien cicatrisé ce qui confirme les résultats obtenus dans **le tableau V.14**

D'après l'étude réalisée, le traitement avec la nanoémulsion et avec le patch à base de l'huile essentielle de la plante ***Teucrium polium*** donne un fort impact sur la granulation et l'épithélialisation des plaies, il a accéléré la réparation des tissus et a diminué la durée de cicatrisation. Cela peut être dû aux effets combinés des constituants bioactifs de cette huile.

Conclusion générale

L'Algérie est un pays doté d'une biodiversité végétale immense qui reste toujours à découvrir. Une grande partie de cette flore est constituée d'espèces médicinales et c'est dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules à activités biologiques d'origine végétale et des formes d'administration innovantes que s'inscrit notre problématique.

Ce travail de recherche a été réalisé sur l'extrait éthanolique et l'huile essentielle de l'espèce végétale *T. polium*, il a permis d'identifier les substances actives de cette plante et d'évaluer les activités biologiques telles que l'activité antioxydante, antibactérienne et cicatrisante. Cette étude a permis de développer des nanosystèmes (nanoémulsions) et d'élaborer une forme galénique d'administration sous forme de patch pour la délivrance transdermique de principes actifs.

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence de divers métabolites secondaires tels que les polyphénols, flavonoïdes, tanins, saponosides, et alcaloïdes, ce qui confirme le fort potentiel thérapeutique de cet espèce.

L'analyse par LC/MS de l'extrait éthanolique, a permis une caractérisation détaillée du profil phénolique avec l'identification des principales molécules présentes dans cet extrait.

Par GC/MS, 66 composés ont été identifiés dans l'HE et subdivisés en sesquiterpènes, sesquiterpènes oxygénés, mono terpènes hydrocarbonés, mono terpènes oxygénés et d'autres composants.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique et de l'huile essentielle de cette plante a été effectuée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH et a donné des résultats significatifs avec un IC_{50} de 65 $\mu\text{g/mL}$ pour l'extrait et 06 $\mu\text{L/mL}$ pour l'HE, et la méthode de FRAP qui a donnée des résultats acceptables pour l'extrait éthanolique, avec une valeur de 21 mg/mL g/ml donc l'extrait et l'HE de notre plante présente une activité antioxydante non négligeable.

L'activité antibactérienne a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits et l'huile, cette activité antibactérienne a été confirmée contre plusieurs souches bactériennes, avec des zones d'inhibition significatives allant jusqu'à 20 mm pour l'extrait et pour l'HE.

Les nanoémulsions ont été formulées à base de l'extrait éthanolique et de l'HE avec succès, et présentant des tailles de particules de 40 et 65 nm et un potentiel zêta de 53.2 mV et 30mV, respectivement, indiquant ainsi une bonne stabilité au cours du stockage.

Les tests de stabilité thermodynamique et rhéologique ont confirmé la robustesse des nanoémulsions en termes de propriétés mécaniques

Les patchs transdermiques contenant les nanoémulsions ont montré une bonne endurance au pliage, une épaisseur uniforme, et une libération prolongée du principe actif.

Les études de diffusion pour les deux préparations ont révélé une perméation efficace et contrôlée du principe actif à travers la peau.

Les tests *in vivo* sur des rats Wistar ont démontré une amélioration significative de la cicatrisation des plaies avec les patchs et les nanoémulsions, comparée aux contrôles.

Ce travail est très loin d'être achevé, il ouvre de nouvelles perspectives vers d'autres recherches afin d'isoler et d'encapsuler le composé responsable de l'activité cicatrisante et de comprendre son mécanisme physiologique responsables de cette activité.

Enfin, l'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Des essais complémentaires seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

En perspective, il serait fort intéressant de :

- Des tests toxicologiques semblent plus que nécessaires afin de déterminer les effets à long terme et ainsi prouver l'application de cette espèce végétale en tant que principe actif non seulement pour la cicatrisation des plaies mais aussi pour le traitement des ulcères gastriques.
- Incorporer ces composés dans un aliment modèle et d'explorer l'effet isolé et synergique des différents constituants.
- Utiliser des méthodes plus modernes pour l'extraction des principes actifs telles que l'extraction assistée par microondes, par ultrason ou par fluide supercritique.
- Elargir l'éventail des tests antioxydants et antimicrobiens à d'autres tests plus avancés.
- Appliquer les techniques biotechnologiques dans le domaine des métabolites secondaires afin de tirer le maximum de ces molécules, et les utiliser pour l'intérêt de la santé humaine.

Références

Références

- [1] C. Liolios, O. Gortzi, S. Lalas, J. Tsaknis, I. Chinou, Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity, *Food chemistry*, 112 (2009) 77-83.
- [2] A. Chedia, H. Ghazghazi, H. Brahim, M. Abderrazak, Secondary metabolite, antioxidant and antibacterial activities of *Teucrium polium* L. methanolic extract, (2013).
- [3] Z. Mohammedi, F. Atik, Antioxidant activity of four Algerian plants: *Cistus ladaniferus*, *Crataegus oxyacantha*, *Lavandula stoechas* and *Smyrniololus*, (2011).
- [4] T. Lograda, M. Ramdani, P. Chalard, G. Figueredo, A. Deghar, Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from eastern Algeria, *Am J Adv Drug Deliv*, 2 (2014) 697-710.
- [5] L. Salvia-Trujillo, A. Rojas-Graü, R. Soliva-Fortuny, O. Martín-Belloso, Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils, *Food hydrocolloids*, 43 (2015) 547-556.
- [6] M. Benjemaa, M.A. Neves, H. Falleh, H. Isoda, R. Ksouri, M. Nakajima, Nanoencapsulation of *Thymus capitatus* essential oil: Formulation process, physical stability characterization and antibacterial efficiency monitoring, *Industrial crops and products*, 113 (2018) 414-421.
- [7] J. Pandit, M. Aqil, Y. Sultana, Nanoencapsulation technology to control release and enhance bioactivity of essential oils, in: *Encapsulations*, Elsevier, 2016, pp. 597-640.
- [8] M. Mergeay-Fabre, Développement des formes transdermiques, in, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2014.
- [9] P. Zade, P. Kawtikwar, D. Sakarkar, Formulation, evaluation and optimization of fast dissolving tablet containing tizanidine hydrochloride, *Int J Pharm Tech Res*, 1 (2009) 34-42.
- [10] S. Bahramikia, R. Yazdanparast, Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae), *Phytotherapy Research*, 26 (2012) 1581-1593.
- [11] Z. MOHAMMEDI, Etude phytochimique et activités biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie, in, 2013.
- [12] A. Fettah, Étude phytochimique et évaluation de l'activité biologique (antioxydante-antibactérienne) des extraits de la plante *Teucrium polium* L. sous espèce *Thymoides* de la région Beni Souik, Biskra, in, UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA, 2019.
- [13] N. LEMAILBI, Evaluation de l'effet répulsif d'*Artemisia herba alba* Asso. et *Teucrium polium* L. vis-à-vis des insectes des denrées stockées (*Tribolium confusum* et *Rhyzopertha dominica*), in, Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila, 2019.
- [14] C. Sarra, CARACTERISATION, TOXICITE ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DE *TEUCRIUM POLIUM*, in, Université de M'sila, 2021.
- [15] M.D. Amina, Etude phytochimique et activité biologique des deux espèces: *Teucrium polium* L. et *Pituranthus chloranthus* Coss et Dur, in, Université Badji Mokhtar-Annaba, 2018.
- [16] N.A. Jaradat, Review of the taxonomy, ethnobotany, phytochemistry, phytotherapy and phytotoxicity of germander plant (*Teucrium polium* L.), *medicine*, 3 (2015) 4.
- [17] N. Fertout-Mouri, A. Latreche, Z. Mehdadi, Z. Bengherraz, Activité antibactérienne de quatre extraits de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale). Antibacterial activity of four extracts of *Teucrium polium* L. of Tessala mount (western Algeria), *Bulletin de la Société royale des Sciences de Liège*, (2016).
- [18] N. Fertout-Mouri, A. Latrèche, Z. Mehdadi, F. Toumi-Bénali, M.B. Khaled, Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Teucrium polium* L. du mont de Tessala (Algérie occidentale), *Phytothérapie*, 15 (2016) 346-353.
- [19] Z. Kabouche, N. Boutaghane, S. Laggoune, A. Kabouche, Z. Aitkaki, K. Benlabed, Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria, *International Journal of Aromatherapy*, 15 (2005) 129-133.
- [20] S.E. Bencheikh, S. Ladjel, M.B. Goudjil, M. Mehani, S. Zighmi, Chemical analysis, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium polium*ssp. *pauciflorum* Labiatae.

- [21] R. Mahmoudi, S.J.I.f.r.J. Nosratpour, *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties, 20 (2013) 1697.
- [22] P.J.C.N.d.I.R.S. Ozenda, Paris, Flore et végétation du Sahara (3ème édition mise à jour et augmentée), (1991) 250-278.
- [23] P. Quézel, S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, (1962).
- [24] H. Meguellati, S. Ouafi, S. Saad, N. Djemouai, Evaluation of acute, subacute oral toxicity and wound healing activity of mother plant and callus of *Teucrium polium* L. subsp. *geyrii* Maire from Algeria, *South African Journal of Botany*, 127 (2019) 25-34.
- [25] F. Menichini, F. Conforti, D. Rigano, C. Formisano, F. Piozzi, F.J.F.C. Senatore, Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece, 115 (2009) 679-686.
- [26] F. Sharififar, G. Dehghn-Nudeh, M. Mirtajaldini, Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L, *Food chemistry*, 112 (2009) 885-888.
- [27] B. Hamdi, aractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae: *Ajuga iva* (L.) Schreb., *Teucrium polium* L., *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet et *Rosmarinus ericalyx* Jord & Fourr., (2017/05/10).
- [28] S. Chabane, A. Boudjelal, M. Keller, S. Doubakh, O. Potterat, *Teucrium polium* - wound healing potential, toxicity and polyphenolic profile, *South African Journal of Botany*, 137 (2021) 228-235.
- [29] S.E. BENCHEIKH, S. Ladjel, Etude de l'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium polium* ssp *Aurasianum* Labiatae, in, 2017.
- [30] R. HAMMOUDI, M.H. MAHAMMED, F. RAMDANE, A.A. KHODIR, ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS PHENOLIQUES DE LA PLANTE *Teucrium polium geyrii*, *Algerian Journal of Arid Environment "AJAE"*, 2 (2012) 7-7.
- [31] A. Boulila, A. Béjaoui, C. Messaoud, M. Boussaid, Genetic Diversity and Population Structure of *Teucrium polium* (Lamiaceae) in Tunisia, *Biochemical Genetics*, 48 (2009) 57-70.
- [32] Y. El Atki, I. Aouam, F. El Kamari, A. Taroq, B. Lyoussi, B. Oumokhtar, A. Abdellaoui, Phytochemistry, antioxidant and antibacterial activities of two Moroccan *Teucrium polium* L. subspecies: Preventive approach against nosocomial infections, *Arabian Journal of Chemistry*, 13 (2020) 3866-3874.
- [33] F. Raei, N. Ashoori, F. Eftekhari, M. Yousefzadi, Chemical composition and antibacterial activity of *Teucrium polium* essential oil against urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Essential Oil Research*, 26 (2013) 65-69.
- [34] E. Darabpour, H. Motamedi, S.M.S. Nejad, Antimicrobial properties of *Teucrium polium* against some clinical pathogens, *Asian pacific journal of tropical medicine*, 3 (2010) 124-127.
- [35] A. Guetata, F.A. Al-ghamdia, Analysis of the essential oil of the germander (*Teucrium polium* L.) aerial parts from the northern region of Saudi Arabia, (2014).
- [36] W.A. Elmasri, M.-E.F. Hegazy, M. Aziz, E. Koksai, W. Amor, Y. Mechref, A.N. Hamood, D.B. Cordes, P.W. Paré, Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*, *Phytochemistry*, 103 (2014) 107-113.
- [37] M. Moghtader, Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran, *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 5 (2009) 843-846.
- [38] M. Abdollahi, Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test, *Pharmacological Research*, (2003).
- [39] F. Naghibi, M. Mosadegh, M.S. Mohammadi, A. Ghorbani, Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology, (2005).
- [40] K. BOUZOUITA, Phytovigilance: enquête auprès des pharmaciens officinaux d'Oujda, in, 2016.
- [41] I. Krache, Effets anti-inflammatoire antioxydants et toxiques de l'extrait de *teucrium polium* L, in, 2018.

- [42] S. Malki, A. Yahia, Etude Morphologique, Biochimique, Physiologique et Biologique de quelques populations de *Teucrium polium* L. Capitatum dans l'Est algérien, in, جامعة الإخوة منتوري قسنطينة, 2017.
- [43] M. Ansari, F. Sharififar, M. Kazemipour, Z. Sarhadinejad, H. Mahdavi, *Teucrium polium* L. extract adsorbed on zinc oxide nanoparticles as a fortified sunscreen, *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 3 (2013) 188.
- [44] N. Zouaoui, H. Chenchouni, A. Bouguerra, T. Massouras, M. Barkat, Characterization of volatile organic compounds from six aromatic and medicinal plant species growing wild in North African drylands, *NFS journal*, 18 (2020) 19-28.
- [45] A. Venditti, C. Frezza, E. Trancanella, S.M.M. Zadeh, S. Foddai, F. Sciubba, M. Delfini, M. Serafini, A. Bianco, A new natural neo-clerodane from *Teucrium polium* L. collected in Northern Iran, *Industrial Crops and Products*, 97 (2017) 632-638.
- [46] M. Amraei, A. Ghorbani, Y. Seifinejad, S.F. Mousavi, M. Mohamadpour, E. Shirzadpour, The effect of hydroalcoholic extract of *Teucrium polium* L. on the inflammatory markers and lipid profile in hypercholesterolemic rats, *Journal of Inflammation Research*, Volume 11 (2018) 265-272.
- [47] M.A. Esmaeili, R. Yazdanparast, Hypoglycaemic effect of *Teucrium polium*: studies with rat pancreatic islets, *Journal of Ethnopharmacology*, 95 (2004) 27-30.
- [48] M. Mashreghi, S. Niknia, The effect of *Peganum harmala* and *Teucrium polium* alcoholic extracts on growth of *Escherichia coli* O157, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5 (2012) 511-515.
- [49] A. Ardestani, R. Yazdanparast, Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycoxidation, *Food and chemical toxicology*, 45 (2007) 2402-2411.
- [50] A.A. Asghari, A. Mokhtari-Zaer, S. Niazmand, K. Mc Entee, M. Mahmoudabady, Anti-diabetic properties and bioactive compounds of *Teucrium polium* L, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 10 (2020) 433-441.
- [51] F. Menichini, F. Conforti, D. Rigano, C. Formisano, F. Piozzi, F. Senatore, Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece, *Food Chemistry*, 115 (2009) 679-686.
- [52] M. Khazaei, S.N. Nematollahi-Mahani, T. Mokhtari, F. Sheikhabaei, Review on *Teucrium polium* biological activities and medical characteristics against different pathologic situations, *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 4 (2018).
- [53] N. Jaradat, S. Al-lahham, M.N. Abualhasan, A. Bakri, H. Zaide, J. Hammad, F. Hussein, L. Issa, A. Mousa, R. Speih, Chemical Constituents, Antioxidant, Cyclooxygenase Inhibitor, and Cytotoxic Activities of *Teucrium pruinosum* Boiss. Essential Oil, *BioMed Research International*, 2018 (2018) 1-9.
- [54] M. Alahtavakoli, R. Vazirinejad, A. AnsariJaberi, T. Negahban, H. Mashayekhi, M. Nazari, S. Ghoreschi, F. Nematollahi, Effect of *Teucrium polium* extract on skin wound healing in rat, *Hormozgan Medical Journal*, 16 (2012) 17-24.
- [55] M. Ansari, A. Alizadeh, M. Paknejad, M. Khaniki, S. Naeimi, Effects of *teucrium polium* honey on burn wound healing process, *Journal of Babol University of Medical Sciences*, 11 (2009) 7-12.
- [56] R. Ansari Samani, N. Sahinfard, A. Namjoo, M. Rafieian, M. Rafieian-Kopaei, Ameliorative property of *Teucrium polium* on second degree burn, *Journal of HerbMed Pharmacology*, 2 (2013).
- [57] M.N. zadeh Gharaboghaz, M.R. Farahpour, S. Saghaie, Topical co-administration of *Teucrium polium* hydroethanolic extract and *Aloe vera* gel triggered wound healing by accelerating cell proliferation in diabetic mouse model, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127 (2020) 110189.
- [58] Z. Parna, A. Mirzaei, Hepatoprotective activity of hydro-alcoholic extracts of Iranian *Teucrium polium*, *World J. Pharm. Res*, 3 (2014) 1331-1339.
- [59] H. Henchiri, B. Bodo, A. Deville, L. Dubost, L. Zourgui, A. Raies, P. Grellier, L. Mambu, Sesquiterpenoids from *Teucrium ramosissimum*, *Phytochemistry*, 70 (2009) 1435-1441.

- [60] N. Belmekki, N. Bendimerad, C. Bekhechi, Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria, *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 (2013) 897-902.
- [61] F. Capasso, R. De Fusco, M. Fasulo, M. Lembo, N. Mascolo, A. Menghini, Antipyretic and antibacterial actions of *Teucrium polium* (L.), *Pharmacological research communications*, 16 (1984) 21-29.
- [62] T. Panovska, I. Gjorgoski, M. Bogdanova, G. Petrushevska, Hepatoprotective effect of the ethyl acetate extract of *Teucrium polium* L. against carbontetrachloride-induced hepatic injury in rats, *Acta pharmaceutica*, 57 (2007) 241.
- [63] S. Suboh, Y. Bilito, T. Aburjai, Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18 (2004) 280-284.
- [64] S. Nematollahi-Mahani, M. Rezazadeh-Kermani, M. Mehrabani, N. Nakhaee, Cytotoxic effects of *teucrium polium*. On some established cell lines, *Pharmaceutical biology*, 45 (2007) 295-298.
- [65] M. Khader, P. Eckl, N. Bresgen, Effects of aqueous extracts of medicinal plants on MNNG-treated rat hepatocytes in primary cultures, *Journal of Ethnopharmacology*, 112 (2007) 199-202.
- [66] J. Mossa, M. Al-Yahya, I. Al-Meshal, Medicinal plants of Saudi Arabia. Riyadh, in, King Saud University Press, 2000.
- [67] M.A. Rahman, J.S. Mossa, M.S. Al-Said, M.A. Al-Yahya, Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia 1: a report on seven plant families, *Fitoterapia*, 75 (2004) 149-161.
- [68] F. Jamila, E. Mostafa, Ethnobotanical survey of medicinal plants used by people in Oriental Morocco to manage various ailments, *Journal of Ethnopharmacology*, 154 (2014) 76-87.
- [69] M.R. Shahraki, M.R. Arab, E. MIRIMOKADAM, M.J. Palan, The effect of *Teucrium polium* (Calpoureh) on liver function, serum lipids and glucose in diabetic male rats, (2007).
- [70] M.N. Gharaibeh, H.H. Elayan, A.S. Salhab, Hypoglycemic effects of *Teucrium polium*, *Journal of Ethnopharmacology*, 24 (1988) 93-99.
- [71] J.-T. Simonnet, P. Richart, O. Aubrun, F. L'allore, Nanoformulation des corps gras. Nanocapsules, nanoémulsions, Oléagineux, Corps gras, Lipides, 11 (2004) 448-453.
- [72] M. Brodeau, Topiques réparateurs cutanés et molécules cicatrisantes: évaluation des connaissances de l'équipe officinale, in, 2015.
- [73] X. Zhou, Y. Hao, L. Yuan, S. Pradhan, K. Shrestha, O. Pradhan, H. Liu, W. Li, Nano-formulations for transdermal drug delivery: A review, *Chinese Chemical Letters*, 29 (2018) 1713-1724.
- [74] J. Kanitakis, Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin, *European journal of dermatology*, 12 (2002) 390-401.
- [75] Y. Talbi, Conception d'un patch transdermique intelligent pour le monitoring et l'aide à la prise de médicament, in, INSA de Toulouse, 2018.
- [76] J.-F. Guillet, Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électro-stimulée de substances biologiquement actives, in, Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2017.
- [77] N. El-kassouani, Les produits cosmétiques pour les soins du visage, in, Thèse de Doctorat en Pharmacie, 2013.
- [78] TLC-Edusoft, Le rôle et la structure de la peau. , , surdoctissimosanté: https://www.doctissimo.fr/html/dossiers/peau_boutons/sa_3884_peau.htm., (2018, aout 03).
- [79] N. ELKASSOUANI, Les produits cosmétiques pour les soins du visage, in, 2013.
- [80] B. Abdellatif, A.M. Cherif, Effets cicatrisants de produits à base d'huile de lentisque (*Pistacia lentiscus* L.) sur les brûlures expérimentales chez le rat, (2017).
- [81] A. Georgel, Pénétration transcutanée des substances actives : application en dermocosmétologie, in, UHP - Université Henri Poincaré, 2008, pp. non renseigné.
- [82] C. Poland, I.O.M. Read, I.O.M. Varet, I.O.M. Carse, F. Christensen, S. Hankin, *Dermal Absorption of Nanomaterials*, 2013.

- [83] D. Hé, Bilan des connaissances actuelles sur la cicatrisation des plaies cutanées chez le chien et le chat, in, 2006.
- [84] L. Gravlo, Reformulation d'un produit historique : la Pommade MERCIER®, in, 2017, pp. 171.
- [85] R. Neupane, S.H. Boddu, J. Renukuntla, R.J. Babu, A.K. Tiwari, Alternatives to biological skin in permeation studies: Current trends and possibilities, *Pharmaceutics*, 12 (2020) 152.
- [86] L. Carmen, Évaluation de l'intérêt de la peau de porc et de la peau de souris comme modèles pour les études in vitro de perméation cutanée dans un contexte de formulation de médicaments à administration transdermique, in, [s.n.], [S.I.], 2012.
- [87] s. chabane, caractérisation, toxicité et activités biologiques de *Teucrium polium*, thèse de doctorat, (2021).
- [88] H. Boutaleb, Evaluation des effets cicatrisants de *Teucrium polium* (Khayata) sur des plaies d'excision chez le rat, in, Thèse de magister, université Constantine 1, Algérie, 2014.
- [89] V. Battu, S. Brischoux, Les plaies: définitions et étiologie, *Actualités pharmaceutiques*, 51 (2012) 14-19.
- [90] J.-F. Pillou., Cicatrisation-définition, in, *Le Journal des femmes-santé*, 2013.
- R. Margaux, Le Gel d'Aloe Vera En Usage Topique Et Ses Vertus Cicatrisantes, in, Thèse De Doctorat: PHARMACIE, Université De Picardie Jules Verne UFR De ..., 2015.
- C. Henry, Connaissances actuelles sur la cicatrisation cutanée chez le cheval et ses troubles menant au tissu de granulation exubérant, (2022).
- A. BOUKELOUA, A. BELKHIRI, Y.H. PACHA, Z. DJERROU, Z. MAAMRI, CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET ETUDE TOXICOLOGIQUE *PISTACIA LENTISCUS L.*
- [91] A. Feurtet, Des formes topiques classiques aux formes transdermiques: formulation et procédés, (2006).
- [92] J. Kreuter, Nanoparticles—a historical perspective, *International journal of pharmaceutics*, 331 (2007) 1-10.
- [93] B. Barry, Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 (2001) 101-114.
- [94] A.D. McNaught, A. Wilkinson, *Compendium of chemical terminology. IUPAC recommendations*, (1997).
- [95] P. Shah, D. Bhalodia, P. Shelat, Nanoemulsion: A pharmaceutical review, *Systematic reviews in pharmacy*, 1 (2010).
- [96] S. Tanuku, D. Velisila, D. Thatraju, A. kumar Vadaga, Nanoemulsion Formulation Strategies for Enhanced Drug Delivery, *Journal of Pharma Insights and Research*, 2 (2024) 125-138.
- [97] M. Safaya, Y.C. Rotliwala, Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique, *Materials Today: Proceedings*, 27 (2020) 454-459.
- [98] K. Ahmed, Y. Li, D.J. McClements, H. Xiao, Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties, *Food chemistry*, 132 (2012) 799-807.
- [99] H. Jasmina, O. Džana, E. Alisa, V. Edina, R. Ognjenka, Preparation of nanoemulsions by high-energy and lowenergy emulsification methods, in: *CMBEBIH 2017: Proceedings of the International Conference on Medical and Biological Engineering 2017*, Springer, 2017, pp. 317-322.
- [100] P.K. Gupta, N. Bhandari, H.N. Shah, V. Khanchandani, R. Keerthana, V. Nagarajan, L. Hiremath, An update on nanoemulsions using nanosized liquid in liquid colloidal systems, *Nanoemulsions-Properties, Fabrications and Applications*, 1 (2019) 1-14.
- [101] V.S. Periasamy, J. Athinarayanan, A.A. Alshatwi, Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa L.* essential oil on human breast cancer cells, *Ultrasonics sonochemistry*, 31 (2016) 449-455.
- [102] S.M. Jafari, Y. He, B. Bhandari, Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques, *Journal of food engineering*, 82 (2007) 478-488.
- [103] A. Laouini, H. Fessi, C. Charcosset, Membrane emulsification: A promising alternative for vitamin E encapsulation within nano-emulsion, *Journal of membrane science*, 423 (2012) 85-96.

- [104] A.H. Saberi, Y. Fang, D.J. McClements, Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification, *Journal of Colloid and Interface Science*, 391 (2013) 95-102.
- [105] M.N. El-Din, S.H. El-Hamouly, H. Mohamed, M.R. Mishrif, A.M. Ragab, Water-in-diesel fuel nanoemulsions: Preparation, stability and physical properties, *Egyptian Journal of Petroleum*, 22 (2013) 517-530.
- [106] N. Anton, T.F. Vandamme, The universality of low-energy nano-emulsification, *International journal of pharmaceutics*, 377 (2009) 142-147.
- [107] D.J. McClements, S.M. Jafari, General aspects of nanoemulsions and their formulation, in: *Nanoemulsions*, Elsevier, 2018, pp. 3-20.
- [108] D.J. McClements, J. Rao, Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity, *Critical reviews in food science and nutrition*, 51 (2011) 285-330.
- [109] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, Formation and stability of nano-emulsions, *Advances in colloid and interface science*, 108 (2004) 303-318.
- [110] A.M. Howe, A.R. Pitt, Rheology and stability of oil-in-water nanoemulsions stabilised by anionic surfactant and gelatin 1) addition of nonionic, cationic and ethoxylated-cationic co-surfactants, *Advances in colloid and interface science*, 144 (2008) 24-29.
- [111] G.M. SHINGADE, Review on: recent trend on transdermal drug delivery system, *Journal of drug delivery and therapeutics*, 2 (2012).
- [112] 6 - Drug delivery systems, in: M.L. Bruschi (Ed.) *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Woodhead Publishing, 2015, pp. 87-194.
- [113] Dipen Patel; Sunita A. Chaudhary; Bhavesh Parmar; Nikunj Bhura, Transdermal Drug Delivery System: A Review, *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol*, 1 (2012) 66–75.
- [114] T. Han, D.B. Das, Potential of combined ultrasound and microneedles for enhanced transdermal drug permeation: a review, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89 (2015) 312-328.
- [115] K.A. Walters, *Dermatological and transdermal formulations*, CRC Press, 2002.
- [116] A. Zaid Alkilani, M.T. McCrudden, R.F. Donnelly, Transdermal drug delivery: innovative pharmaceutical developments based on disruption of the barrier properties of the stratum corneum, *Pharmaceutics*, 7 (2015) 438-470.
- [117] Y. Chen, P. Quan, X. Liu, M. Wang, L. Fang, Novel chemical permeation enhancers for transdermal drug delivery, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9 (2014) 51-64.
- [118] N.p. J. Ashok kumar, S.Lakshmana prabu, V.Gopal., TRANSDERMAL DRUG DELIVERY SYSTEM: AN OVERVIEW *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 3(2010) 49-54.
- [119] M.S. Chirane, O. Benchabane, N. Bousbia, S. Zenia, Antioxydant and antimicrobial activities of essential oil and ethanol extract of *Santolina chamaecyparissus* L, *Rev. Agrobiol*, 9 (2019) 1660-1668.
- [120] O.A. Lella, K. Saloua, B. Bahia, E. Yahyaoui, S.A. Ouafae, O.A.B.M. Lemine, O.H. Habiboullah, M. barek Idoumou, B. Rachid, Phytochimic Screening and characterization of the substances present in the extracts of two marine algae: *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, 1955 and *Cystoseira tamariscifolia* (Hudson); Harvested from the bay of the star in Mauritania, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6 (2017) 1510-1514.
- [121] N.E.-H. Daira, M.C. Maazi, A. Chefrour, Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien, *Bulletin de la Société royale des Sciences de Liège*, 85 (2016) 276-290.
- [122] K. Tuo, S. Béourou, A.O. Touré, K. Ouattara, D. Silué, D.T. Konan, M. Adagba, D. Koffi, S. Yao, J. Djaman, Phytochemical screening and polyphenolic Contents of *Dialium dinklagei* and *Diospyros monbuttensis*, two Ivorian medicinal plants used to treat malaria, *Journal of Advances in medical and Pharmaceutical Sciences*, 2 (2015) 144-153.

- [123] Y.-A. Bekro, J. Mamyrbekova, B.B. Boua, F.T. Bi, E.E. Ehile, Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpiniaceae), *Sciences & nature*, 4 (2007) 217-225.
- [124] L. Mentha Spicata, SCREENING PHYTOCHIMIQUE D'UNE PLANTE MEDICINALE: *Mentha Spicata* L.
- [125] C.M. Aissani Fatine, Etude de l'effet antibactérien de l'extrait méthanolique de l'ail (*Allium sativum* L), (2015).
- [126] H.O. Edeoga, D. Okwu, B. Mbaebie, Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants, *African journal of biotechnology*, 4 (2005) 685-688.
- [127] H. Talbi, A. Boumaza, K. El-Mostafa, J. Talbi, A. Hilali, Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L, *Journal of Materials and Environmental Science*, 6 (2015) 1111-1117.
- [128] J. Hayat, M. Akodad, A. Moumen, M. Baghour, A. Skalli, S. Ezrari, S. Belmalha, Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco, *Heliyon*, 6 (2020).
- [129] H. Mighri, H. Hajlaoui, A. Akrou, H. Najjaa, M. Neffati, Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone, *Comptes Rendus Chimie*, 13 (2010) 380-386.
- [130] A. Ksouri, S. Krmat, C. Tigrine, D. Dahmane, A. Belkebir, Étude de la composition chimique, l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de l'huile essentielle d'*Anethum graveolens* sauvage de parties aériennes (tiges, fleurs, feuilles et graines), *Phytothérapie*, 18 (2020) 369-374.
- [131] N. Liang, D.D. Kitts, Antioxidant property of coffee components: assessment of methods that define mechanisms of action, *Molecules*, 19 (2014) 19180-19208.
- [132] B. Meriga, R. Mopuri, T. MuraliKrishna, Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*, *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 5 (2012) 391-395.
- [133] N. Bentabet, Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie, *Phytothérapie*, 12 (2014) 364-371.
- [134] Y. El Atki, I. Aouam, F. El Kamari, A. Taroq, H. Zejli, M. Taleb, B. Lyoussi, A. Abdellaoui, Antioxidant activities, total phenol and flavonoid contents of two *Teucrium polium* subspecies extracts, *Moroccan Journal of Chemistry*, 8 (2020) 8-2 (2020) 2446-2455.
- [135] N. Bougandoura, N. Bendimerad, Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq, *Nature & Technology*, (2013) 14.
- [136] Y. Farid, S. Etahiri, O. Assobhei, Activité antimicrobienne des algues marines de la lagune d'Oualidia (Maroc): Criblage et optimisation de la période de la récolte, *J. Appl. Biosci*, 24 (2009) 1543-1552.
- [137] L. Gachkar, D. Yadegari, M.B. Rezaei, M. Taghizadeh, S.A. Astaneh, I. Rasooli, Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils, *Food chemistry*, 102 (2007) 898-904.
- [138] A. FETTAH, ÉVALUATION IN-VITRO DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS NATURELS D'UNE SOUS ESPECE DE *TEUCRUM POLIUM* L. CULTIVÉE DANS LA RÉGION DE BENI SOUK, BISKRA.
- [139] I. Saleh, A. Abd-ElGawad, A.E.-N. El Gendy, A. Abd El Aty, T. Mohamed, H. Kassem, F. Aldosri, A. Elshamy, M.-E.F. Hegazy, Phytotoxic and Antimicrobial Activities of *Teucrium polium* and *Thymus decussatus* Essential Oils Extracted Using Hydrodistillation and Microwave-Assisted Techniques, *Plants*, 9 (2020) 716.
- [140] G. Yakhlef, S. Laroui, L. Hambaba, M.-C. Aberkane, A. Ayachi, Évaluation de l'activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris* et de *Laurus nobilis*, plantes utilisées en médecine traditionnelle, *Phytothérapie*, 9 (2011) 209.

- [141] L. Mansouri, Isolement de nouveaux dérivés de la carboxyméthylcellulose sodique: étude chimique, couplage avec des biopolymères azotés et élucidation des comportements biologiques, in, 2020.
- [142] R. Erenler, C. Yaman, I. Demirtas, M. Hakki Alma, Phytochemical investigation of *Hypericum heterophyllum* flowers: LC-ESI-MS/MS analysis, total phenolic and flavonoid contents, antioxidant activity, *The Natural Products Journal*, 13 (2023) 37-45.
- [143] S. Atun, K. Pertiwi, M. Qolbiah, S. Safa, Phytochemical Analysis Both of Water and Ethanol Extract from Some Herbs Combinations, Nanoemulsion Formulation, and Antioxidant Effects. *Open Access Maced J Med Sci*. 2022 Jan 11; 10 (A): 95-100, in, 2022.
- [144] P. Arora, B. Mukherjee, Design, development, physicochemical, and in vitro and in vivo evaluation of transdermal patches containing diclofenac diethylammonium salt, *Journal of pharmaceutical sciences*, 91 (2002) 2076-2089.
- [145] S. Jatin, Transdermal Delivery of Verapamil HCl: Effect of Penetration Agent on In Vitro Penetration through Rat Skin, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, (2013).
- [146] A. Shrivastava, H. Sharma, G.K. Sahu, FORMULATION AND EVALUATION OF TRANSDERMAL PATCHES OF DICLOFENAC SODIUM, *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9 (2020) 1142-1163.
- [147] V. Kusum Devi, S. Saisivam, G. Maria, P. Deepti, Design and evaluation of matrix diffusion controlled transdermal patches of verapamil hydrochloride, *Drug development and industrial pharmacy*, 29 (2003) 495-503.
- [148] M. Kumar, R.S. Bishnoi, A.K. Shukla, C.P. Jain, Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: a review, *Preventive nutrition and food science*, 24 (2019) 225.
- [149] S. Chabane, A. Boudjelal, E. Napoli, A. Benkhalel, G. Ruberto, Phytochemical composition, antioxidant and wound healing activities of *Teucrium polium* subsp. *capitatum* (L.) Briq. essential oil, *Journal of Essential Oil Research*, 33 (2021) 143-151.
- [150] M. Elyemni, B. Louaste, I. Nechad, T. Elkamli, A. Bouia, M. Taleb, M. Chaouch, N. Eloutassi, Extraction of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. by two different methods: Hydrodistillation and microwave assisted hydrodistillation, *The Scientific World Journal*, 2019 (2019) 3659432.
- [151] F.S. AIT CHAOUCHE, Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide des huiles essentielles et des extraits de deux Lamiaceae, in, 2018.
- [152] R. HAMMOUDI, Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien, in, 2015.
- [153] M. Brada, M. Bezzina, M. Marlier, A. Carlier, G. Lognay, Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie, *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 11 (2007).
- [154] F. Raei, N. Ashoori, F. Eftekhari, M. Yousefzadi, Chemical composition and antibacterial activity of *Teucrium polium* essential oil against urinary isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Essential Oil Research*, 26 (2014) 65-69.
- [155] B. Lamia, Etude de la composition chimique et des activités biologiques des huiles essentielles de quelques espèces endémiques, (2020).
- [156] W.A. Al-Otaibi, S.M. AlMotwaa, Preparation, characterization, optimization, and antibacterial evaluation of nano-emulsion incorporating essential oil extracted from *Teucrium polium* L, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 44 (2023) 922-932.
- [157] M.E.N. Abena, N. Nga, V. Soppo, N. Mballa, M.N. Ndongo, L.W. Armelle, C.B. Messanga, J.Z. Minkande, Caractérisations Phytochimique et Pharmacotoxicologique de *Spilanthes Africana* (Asteraceae) Utilisée par les Tradithérapeutes pour les Extractions Dentaires, *HEALTH SCIENCES AND DISEASE*, 21 (2020).
- [158] D. Kpadonou, F. Allanto, B. Kpadonou-Kpoviessi, P. Agbani, F. Gbaguidi, L. Baba-Moussa, J. Gbenou, M. Moudachirou, S. Kpoviessi, Relations entre composition chimique, activité antioxydante et toxicité des huiles essentielles de deux espèces de *Cymbopogon* acclimatées au Bénin, *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13 (2019) 1201-1209.

- [159] S. Malki, A. Yahia, Evaluation of diuretic activity from *Teucrium polium* L. capitatum extracts (Lamiaceae) in rats, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5 (2014) 1259.
- [160] A. Venditti, C. Frezza, E. Trancanella, S.M.M. Zadeh, S. Foddai, F. Sciubba, M. Delfini, M. Serafini, A. Bianco, A new natural neo-clerodane from *Teucrium polium* L. collected in Northern Iran, *Industrial crops and products*, 97 (2017) 632-638.
- [161] D. Beghlal, K. El Bairi, I. Marmouzi, L. Haddar, B. Mohamed, Phytochemical, organoleptic and ferric reducing properties of essential oil and ethanolic extract from *Pistacia lentiscus* (L.), *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6 (2016) 305-310.
- [162] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods in enzymology*, 299 (1999) 152-178.
- [163] S. Khoudali, D. Benmessaoudleft, A. Essaqui, M. Zertoubi, M. Azzi, M. Benaissa, Étude de l'activité antioxydante et de l'action anticorrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc, *Journal of Materials and Environmental Science*, 5 (2014) 887-898.
- [164] V. Goulas, A.M. Gomez-Caravaca, V. Exarchou, I.P. Gerothanassis, A. Segura-Carretero, A.F. Gutiérrez, Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC–SPE–NMR and on-line radical-scavenging activity detection, *LWT - Food Science and Technology*, 46 (2012) 104-109.
- [165] N. Ghedadba, L. Hambaba, A. Ayachi, M.C. Aberkane, H. Bousselsela, S.M. Oued-Mokhtar, Polyphénols totaux, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits des feuilles de *Marrubium deserti* de Noé, *Phytothérapie*, 13 (2015) 118-129.
- [166] S. Chabane, A. Boudjelal, M. Keller, S. Doubakh, O. Potterat, *Teucrium polium*-wound healing potential, toxicity and polyphenolic profile, *South African Journal of Botany*, 137 (2021) 228-235.
- [167] A. Chedia, H. Ghazghazi, H. Brahim, M. Abderrazak, Secondary metabolite, antioxidant and antibacterial activities of *Teucrium polium* L. methanolic extract, *International Journal of Plant Production*, 4 (2013) 1790-1797.
- [168] F. Ali-Rachedi, S. Meraghi, N. Touaibia, S. Mesbah, Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L, *Bulletin de la Société royale des Sciences de Liège*, (2018).
- [169] J. Hayat, M. Akodad, A. Moumen, M. Baghour, A. Skalli, S. Ezrari, S. Belmalha, Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco, *Heliyon*, 6 (2020) e05609.
- [170] A. Bouyahya, J. Abrini, Y. Bakri, N. Dakka, Screening phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Origanum compactum*, *Phytothérapie*, 15 (2017) 379-383.
- [171] C. Sanchez-Moreno, Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems, *Food Science and Technology International*, 8 (2002) 121-137.
- [172] A. Ksouri, S. Krinat, C. Tigrine, D. Dahmane, A. Belkebir, T. Dob, Étude de la composition chimique, l'activité antioxydante et antiinflammatoire de l'huile essentielle d'*Anethum graveolens* sauvage de parties aériennes (tiges, fleurs, feuilles et graines), *Phytothérapie*, 18 (2019) 369-374.
- [173] T.K. Panovska, S. Kulevanova, M. Stefova, In vitro antioxidant activity of some *Teucrium* species (Lamiaceae), *Acta Pharmaceutica*, 55, 207–214 (2005). (2005).
- [174] C. Popovici, I. Saykova, B. Tytkowski, Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, (2010).
- [175] N. Khaled-Khodja, L. Boulekbache-Makhlouf, K. Madani, Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae, *Industrial crops and products*, 61 (2014) 41-48.

- [176] A. Dridi, Y. Hadeif, L. Bouloudani, Determination of total phenol, flavonoid, antioxidant and antimicrobial activity of methanolic extract of *Teucrium polium* L, Algerian East. J. Pharmacogn. Phytochem. Res, 8 (2016) 1566-1570.
- [177] M. Moussaid, A. Elamrani, C. Berhal, Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family: *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.), Int J Nat Prod Res, 1 (2012) 11-13.
- [178] H. Thangaraj, O. Adjei, B. Allen, F. Portaels, M. Evans, D. Banerjee, M. Wansbrough-Jones, In vitro activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 45 (2000) 231-233.
- [179] S. Atun, R. Arianingrum, L. Cahyaningsih, F. Pratiwi, R. Kusumaningrum, M. Khairuddean, Formulation and characterization of quercitrin nanoemulsion isolated from *dendrophoe falcata* and its antioxidant activity test, system, 13 (2020) 1347-1356.
- [180] P. Brochette, Emulsification: Elaboration et étude des émulsions, Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés, 2 (1999) J2150. 2151-J2150. 2122.
- [181] S.-J. Kim, M.-H. Lim, I.-K. Chun, Y.-H. Won, Effects of flavonoids of *Ginkgo biloba* on proliferation of human skin fibroblast, Skin Pharmacology and Physiology, 10 (1997) 200-205.
- [182] S. Katayose, K. Kataoka, Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly (ethylene glycol)- poly (l-lysine) block copolymer, Bioconjugate chemistry, 8 (1997) 702-707.
- [183] A. Akhter, J.H. Shirazi, M.D. Hussain, M. Kazi, Development and evaluation of nanoemulsion gel loaded with bioactive extract of *Cucumis melo* var. *agrestis*: A novel approach for enhanced skin permeability and antifungal activity, Heliyon, 10 (2024).
- [184] S.I. Elsayed, M.S. El-Dahan, G.N.S. Girgis, Pharmacodynamic Studies of Pravastatin Sodium Nanoemulsion Loaded Transdermal Patch for Treatment of Hyperlipidemia, AAPS PharmSciTech, 25 (2024) 34.
- [185] H. Boukhebti, M. Ramdani, I. Lasmi, F. Katfi, A.N. Chaker, T. LOGRADA, Chemical composition, antibacterial activity, and anatomical study of *teucrium Polium* L, Asian J Pharm Clin Res, 12 (2019) 337-341.
- [186] W.A. Al-Otaibi, S.M. AlMotwaa, Chemical composition and antioxidant, antibacterial and cytotoxic properties of essential oil from *Teucrium polium* L. from Riyadh province, Emirates Journal of Food and Agriculture, 34 (2022) 26-35.
- [187] G. Sabz, D. Razmjoue, H. Sadeghi Mansourkhani, M. Salahi, S. Milani, T. Ahmadian, M. Gharaghani, S. Nouripour-Sisakht, Chemical Composition and Antimicrobial Properties of *Teucrium polium* Essential Oil Collected from Dena Mountain in Yasuj, Iran, Journal of Clinical Care and Skills, 3 (2022) 125-132.
- [188] M. Moghtader, Chemical composition of the essential oil of *Teucrium polium* L. from Iran, (2009).
- [189] Y. Maizi, B. Meddah, A. Tir Touil Meddah, J.A. Gabaldon Hernandez, Seasonal variation in essential oil content, chemical composition and antioxidant activity of *Teucrium polium* L. growing in Mascara (North West of Algeria), Journal of Applied Biotechnology Reports, 6 (2019) 151-157.
- [190] H. Belkhodja, B. Meddah, A.T. Touil, N. Şekeroğlu, P. Sonnet, Chemical composition and properties of essential oil of *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba*, World Journal of Pharmacology, 5041 (2016) 108-119.
- [191] N. Belmekki, N. Bendimerad, C. Bekhechi, X. Fernandez, Chemical analysis and antimicrobial activity of *Teucrium polium* L. essential oil from Western Algeria, J Med Plants Res, 7 (2013) 897-902.
- [192] H. Sadeghi, S. Jamalpoor, M.H. Shirzadi, Variability in essential oil of *Teucrium polium* L. of different latitudinal populations, Industrial Crops and Products, 54 (2014) 130-134.
- [193] R. Mahmoudi, S. Nosratpour, *Teucrium polium* L. essential oil: phytochemical component and antioxidant properties, International food research Journal, 20 (2013).
- [194] V. Goulas, A.M. Gomez-Caravaca, V. Exarchou, I.P. Gerothanassis, A. Segura-Carretero, A.F. Gutiérrez, Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and

on-line radical-scavenging activity detection, *LWT-Food Science and Technology*, 46 (2012) 104-109.

[195] S.C. Chao, D.G. Young, C.J. Oberg, Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses, *Journal of Essential Oil Research*, 12 (2000) 639-649.

[196] M.R. Abdulbaqi, N. Rajab, Apixaban ultrafine O/W nano emulsion transdermal drug delivery system: formulation, in vitro and ex vivo characterization, *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11 (2020) 82-94.

[197] M.J. Nirmala, L. Durai, V. Gopakumar, R. Nagarajan, Preparation of celery essential oil-based nanoemulsion by ultrasonication and evaluation of its potential anticancer and antibacterial activity, *International Journal of Nanomedicine*, (2020) 7651-7666.

[198] S.A. Rashid, S. Bashir, H. Ullah, D.H. Khan, P.A. Shah, M.Z. Danish, M.H. Khan, S. Mahmood, M. Sohaib, M.M. Irfan, Development, characterization and optimization of methotrexate-olive oil nano-emulsion for topical application, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34 (2021).

[199] A.M. Rasik, A. Shukla, Antioxidant status in delayed healing type of wounds, *International journal of experimental pathology*, 81 (2000) 257-263.

Annexe

Annexe I : Les réactifs utilisés pour le criblage phytochimique

Réactif de MAYER :

Chlorure mercurique..... 1,35g
 Iodure potassium 5 g
 Eau distillée.....30 ml Agiter jusqu'à dissolution puis ajouter :
 Eau distillée.....q.s.p 100 ml

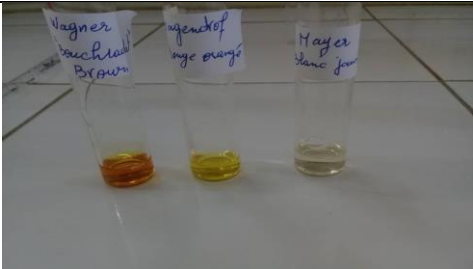
Réactif DE BOUCHARDAT :

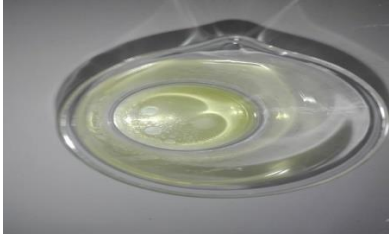
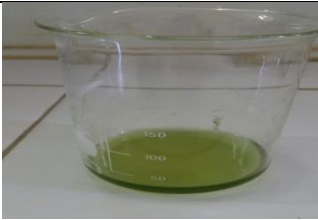
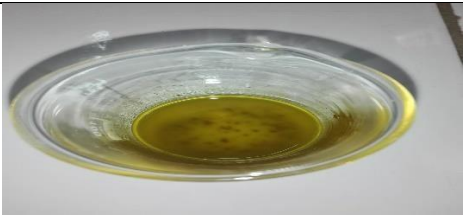
Iode 2 g
 Iode de potassium 2 g
 Eau distillée.....q.s.p 100 ml

Réactif de DRAGENDORFF

Sous nitrate basique de bismuth.....0.85 g
 Iodure potassium.....8 g
 Acide acétique glacial... 10 ml
 Eau distillée.....ml Chauffer et filtrer sur verre fritté, si nécessaire.

Annexe II : Résultats des criblages phytochimiques

Groupes chimiques	Figure
Saponosides	
Alcaloïdes	

Anthraquinones libre	
Terpenoides	
Flavonoïdes	
Tannins	
Composés réducteurs	
Quinones	

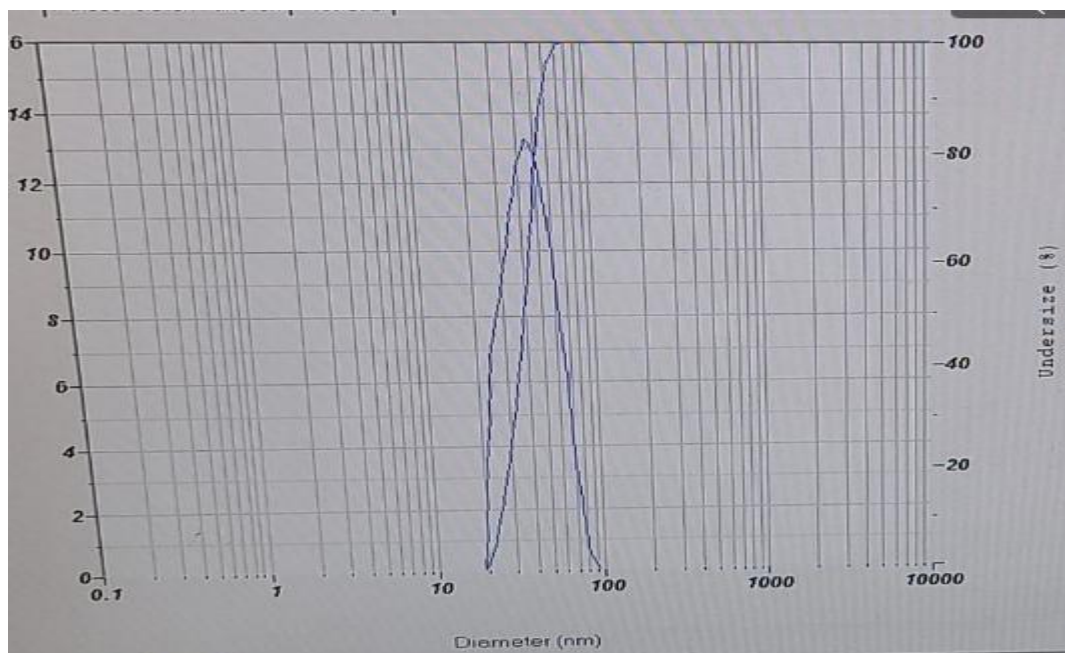
RM : réactif de Mayer RW : réactif de Wagner RD : réactif de Dragendorff



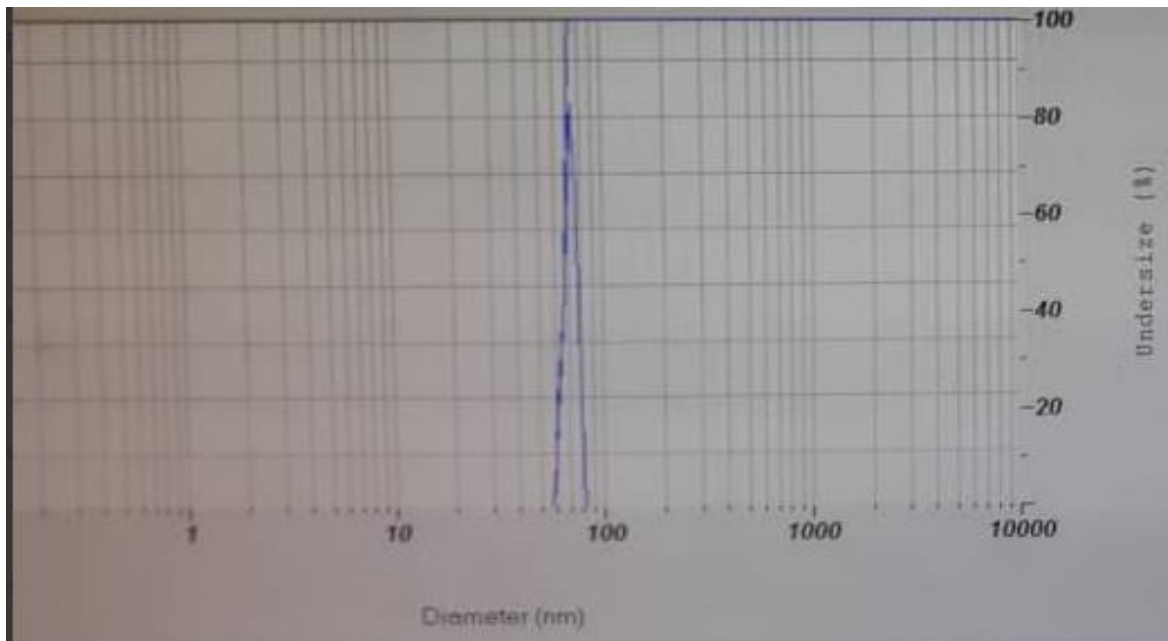
Annexe III : l'appareil de Diffraction dynamique de la lumière Nanoparticules SZ-100 (HORIBA-SCIENTIFIC).



Annexe IV : Mesure de la distribution de taille des nanoémulsions par Dls pour la nanoémulsion E/H.



Annexe IV : Mesure de la distribution de taille des nanoémulsions par Dls pour la nanoémulsion H/E



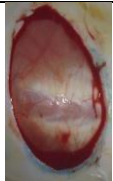
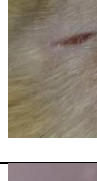
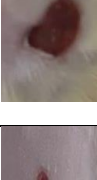
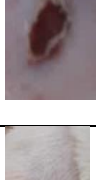
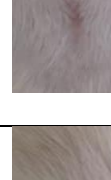
Annexe V : Répartition des lots des rats



Annexe VI : Préparation du site opératoire.



Annexe VII : Photographie de l'évolution chronologique de la cicatrisation des plaies d'excision non traitées et traitées avec la crème Cicatryl bio, l'extrait de *T.polium L*, Nanoémulsion E/H, Nanoémulsion H/E et avec le patch contenant NEs H/E.

	J0	J4	J8	J12	J15	J18
Temoin						
Cicatryl bio						
Extrait <i>T.polium L</i>						
Nanoémulsion E/H						
Nanoémulsion H/E						
Patch		