

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

UNIVERSITÉ BLIDA 1
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de
MASTER EN GÉNIE DES PROCÉDÉS
Spécialité : Pharmacie Industrielle

**Encapsulation des extraits de *Teucrium polium L* « Khyata »
dans une nanoémulsion : *contribution à l'élaboration d'un
patch cicatrisant***

Présenté par :

Mahieddine Ikram

Zerroukhat Ouissam

Dirigé par :

Pr. Amel HADJ-ZIANE

Melle. Timizar Zineb

Année universitaire 2020/2021

المخلص:

هذا العمل هو جزء من الترويج للنباتات الطبية الجزائرية المعروفة بفعاليتها العلاجية ؛ نحن مهتمون بدراسة نبات *Teucrium polium L* المعروف بغناه بالمواد الفعالة التي يستخدمها السكان المحليون في العلاجات المختلفة. هذا العمل مكرس ، من ناحية ، لاستخراج الأجزاء الهوائية من *T. Polium* ، وتحديد التركيب الكيميائي ، والهدف منها دراسة الأنشطة البيولوجية بما في ذلك النشاط المضاد للميكروبات ونشاط مضادات الأكسدة من النباتات الطبية. *Teucrium polium L* ، ومن ناحية أخرى لإبراز هذه الأنشطة. لقد استخلصنا الجزء الجوي من النبات بتقنية تعطين الإيثانول مما أعطى ناتج مادة جافة يساوي 20.6٪ على التوالي. تم تحليل التركيب الكيميائي لـ *Teucrium polium L* بالطرق النوعية بناءً على تفاعلات التلون والترسيب والتي أتاحت التعرف على 8 مركبات مثل التانينات ، الصابونوزيدات ، التربينويدات ، الكينونات ، الفلوبيدات ، المركبات المختزلة ، البوليفينول ، الفلافانويد. تم تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا ضد ثلاث بكتيريا هي الأكثر حساسية للتثبيط بقطر 14 مم مع تقييم MIC أعطى قيمة 0.2 مجم / مل مع ب الرقيقة. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستخدام 2،2-ثنائي فينيل 1-بيكريل هيدرازيل (DPPH) وأعطت النتائج: IC50 من 20 ميكروغرام / مل. الهدف من هذا العمل هو صياغة مستحلبات نانوية مائية / زيت صيدلانية. تم تحضير المستحلبات النانوية بطريقة استحلاب منخفضة الطاقة أعطت حجم نانومتر من DIs يساوي 14.56 نانومتر. تم تحسين تركيبة الصيغة وظروف العملية من أجل الحصول على مستحلبات نانوية مستقرة. أتاحت الصيغة المثلى التي تم تطويرها تكوين رقعة عبر الجلد ، دون أي تعديل لاستقرار النظام. تظهر مثل هذه الصيغة واعدة كنظام لتوصيل الأدوية للتطبيق الموضعي.

الكلمات المفتاحية: نباتات طبية ، *Teucrium polium L* ، phytochimique ، نشاط مضاد للجراثيم ، CMI ، نشاط مضاد للأكسدة ، DPPH ، تركيبة ، مستحلب نانوي ، DIs ، رقعة عبر الجلد

Abstract :

This work is part of the promotion of Algerian medicinal plants known for their therapeutic virtues; we are interested in the study of the plant *Teucrium polium L* known for its richness in active matter used by the local population in various therapies. This work is devoted, on the one hand, to the extraction of aerial parts of *T. polium*, the identification of the chemical composition, the objective of which is to study the biological activities including the antimicrobial activity and the activity antioxidant from the medicinal plant *Teucrium polium L*, and on the other hand to highlight these activities. We extracted the aerial part of the plant by the ethanol maceration technique gave a dry matter yield equal to 20.6% respectively. The chemical composition of *Teucrium polium L* was analyzed by qualitative methods based on coloring and precipitation reactions which made it possible to identify 8 compounds such as tannins, saponosides, terpenoids, quinones, alvaloiides, reducing compounds, polyphenols, flavanoids. Antibacterial activity, was assayed against three bacteria are the most sensitive 14 mm diameter inhibition with MIC evaluation gave a value of 0.2 mg / ml with *b. subtilis*. The antioxidant activity was evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) the results give: IC50 of 20 µg / ml. The objective of this work is to formulate pharmaceutical water / oil nanoemulsions. The nanoemulsions were prepared by a low energy emulsification method gave a nanometric size from DI equal to 14.56 nm. The composition of the formulation and the process conditions have been optimized in order to obtain stable nanoemulsions. The optimal formulation developed made it possible to formulate a transdermal patch, without any modification of the stability of the system. Such a formulation shows promise as a drug delivery system for topical application.

Keywords : medicinal plants, *Teucrium polium L*, phytochimique, Antibacterial activity, CMI, antioxidant activity, DPPH, formulate, nanoemulsion , DIs, transdermal patch

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales Algériennes réputées pour leurs vertus thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à l'étude de la plante *Teucrium polium L*. Le présent travail est consacré d'une part, à l'extraction des parties aériennes de *T. polium*, l'identification de la composition chimique dont l'objectif visé est d'étudier les activités biologiques dont l'activité antimicrobienne et l'activité antioxydante de la plante médicinale *Teucrium polium L*, et de l'autre part de mettre en évidence ces activités. Nous avons procédé à l'extraction de la partie aérienne de la plante par la technique de macération par l'éthanol a donné un rendement en matière sèche égal à 20,6 % respectivement. La composition chimique de *Teucrium polium L* a été analysée par des méthodes qualitatives basées sur, des réactions de coloration et de précipitation et a permis d'identifier 8 composés tel que les tanins, les saponosides, les terpénoides, les quinones, les alvaloiides, les composés réducteurs, les polyphénole et, les flavanoides. L'activité antibactérienne, a été dosée contre trois bactéries sont les plus sensible de 14 mm de diamètre d'inhibition et une évaluation des CMI a donné une valeur de 0,2 mg/ml avec *b. subtilis*. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) les résultats donnent : IC50 de 20 µg/ml.

Des nanoémulsions ont été préparées par une méthode d'émulsification à basse énergie a donné lieu à des gouttelettes de taille nanométriques de l'ordre de 14.6 nm déterminées par DIs. La composition de la formulation et les conditions du procédé ont été optimisées afin d'obtenir des nanoémulsions stables.

La formulation optimale développée a permis de formuler un patch transdermique, sans aucune modification de la stabilité du système. Une telle formulation semble prometteuse en tant que système de délivrance de médicament pour une application topique.

Mots-clés: *Teucrium polium L*, plantes médicinales, phytochimique, activité antibactérienne, CMI, activité antioxydante, DPPH, formulation, nanoémulsion, DIs, patch transdermique.

Remerciements

*Nous remercions notre créateur **Allah**, qui nous a donné la santé, la volonté, la patience et nous a aidé à terminer nos étude et notre mémoire.*

*Nous adressons tout d'abord nos sincères remerciements et sincères gratitude à notre professeure et promotrice, Mme **HADJ ZIANE AMEL**, d'avoir accepté l'encadrement de ce mémoire, qui n'a cessé de nous orienter et nous appuyer a chaque étape ; c'est par sa disponibilité, ses conseils précieux et son aide que ce travail s'est concrétisé.*

*Un merci spécial et sincère à notre Co-promotrice **TIMIZAR ZINEB**, pour son soutien, ses conseils et son suivi de l'avancement de nos travaux avec sincérité, que ce soit de prés ou de loin.*

*Nous tenons à adresser aussi nos vifs remerciements à **Mme LARIBI Hassiba**, pour tout le temps qu'elle nous a consacré, pour sa gentillesse, ses précieux conseils. Et toute l'aide qu'elle nous a rapporté.*

Nous remercions également tous les membres de laboratoire de l'université qui nous Ont beaucoup aidés à réaliser ce travail dans des bonnes conditions.

Nous remercions aussi à tous les professeurs du département génie des procédés qui ont fournis les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Aux membres de jury d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Enfin, que toute personne ayant participé de prés ou de loin dans l'élaboration de ce Travail, trouve ici l'expression de nos très vifs remerciements.

Dédicaces

Dédicaces à l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que Dieu te protège

« Mon cher père ».

*A mon ange et âme sœur, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; « **maman** » que j'adore.*

*A la grâce que je remercie Dieu d'être dans ma vie ; mes chers frères : **wassim, wahid et bilhel.***

*A ma tante et ma sœur **yasmine.***

A toute la famille.

*A ceux que j'aime beaucoup, et qui m'ont soutenue tout au long de ce projet : mon mari **moussa***

*Je le dédie aussi spécialement à mon binôme : **ikram***

*A mes chère amies : **chahrazad, rania, karima, majda, samia,** pour leur aides et encouragement pendant cette période de stage.*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que Ce projet soit possible, je vous dis merci.

Ouissam

Dédicaces

DIEU TOUT PUISSANT MERCI D'ETRE TOUJOURS AU PRES DE MOI.

Je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères :

A MON PERE «ABDELAZIZ»

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils.

J'espère que ce travail sera à la hauteur de tes attentes et qu'il soit l'accomplissement de tous tes efforts.

A MA MERE «SAMIRA»

Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.

Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous MES CHERS PARENTS que je le dois, que Dieu vous garde.

A MON MARI «YACINE»

A mon soutien moral et source de ma joie et de mon bonheur, à la flamme de mon cœur, mon cher mari pour son amour, patience, encouragement et son aide qu'il m'a toujours accordé.

A mes sœurs « KHADIDJA », « AYA » pour l'amour qu'elles me réservent,

A ma nièce « RETEDJ », mon neveu « ILYES »

A mon beau père « AHMED », ma belle mère « NADIA », mon beau frère « NAZIM »

A mon cher binôme « WISSEM » pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long ce projet.

Ikram

SOMMAIRE

RESUME

REMERCIEMENTS

DEDICACES

SOMMAIRE

LISTE D'ABREVIATIONS

UNITES ET SYMBOLES

LISTE DES FIGURE

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| Chapitre I : Présentation d'espèce de teurcium polium | 2 |
| I.1. Généralité..... | 4 |
| I.2. Plantes médicinales | 4 |
| I.3. Description botanique | 5 |
| I.4. Position systématique..... | 6 |
| I.5. Distribution géographique..... | 7 |
| I.6. Composition chimique | 8 |
| I.7. Effets biologiques et pharmacologiques et thérapeutiques | 8 |
| Chapitre II : les nanoemulsions..... | 10 |
| II.1. Généralités | 10 |
| II.2. Définition..... | 10 |
| II.3. Méthodes de formulation des nanoemulsions..... | 10 |
| II.3.1. Méthodes d'émulsification à basse énergie | 10 |
| II.3.1.1 Emulsification spontanée..... | 10 |
| II. 3.1.2. Par inversion de phase | 11 |

| | |
|---|----|
| II. 3.1.3 Composition d'inversion de phase | 12 |
| II.3.1.4. Méthode de point d'inversion d'émulsion..... | 12 |
| II.3.2. Méthodes d'émulsification à haute énergie | 13 |
| II.3.2.1. Homogénéisation à haute pression | 13 |
| II. 3.2.2. Microfluidisation à haute pression..... | 15 |
| II.3.2.3. Emulsification assistée par ultrasons | 16 |
| II.3.2.4. Emulsification par membrane..... | 16 |
| II.4. Différents types de nanoémulsions | 17 |
| II.4.1. Nanoémulsion simple | 17 |
| II.4.2. Nanoémulsions multiples..... | 18 |
| II.5. Avantages et inconvénients des nanoémulsions | 19 |
| II.5.1 .Avantages | 19 |
| II.5.2. inconvénients | 20 |
| Chapitre III : les patchs transdermiques | |
| III.1. Introduction | 22 |
| III.2. Le Patch Transdermique..... | 22 |
| III.3. La composition d'un patch transdermique..... | 23 |
| III.4. Les différents types de systèmes transdermiques..... | 23 |
| III.4.1. Adhésif médicamenteux monocouche..... | 24 |
| III.4.2. Adhésif médicamenteux multicouche | 24 |
| III.4.3. Système de réservoir | 24 |
| III.4.4. Système de micro-réservoir..... | 25 |
| III.4.5. Patch de vapeur | 25 |
| III.4.6 .Système matriciel | 25 |
| III.5. Les Facteurs influençant les patchs transdermiques | 26 |
| III.6. Les avantages de l'administration transdermique..... | 27 |
| III.7. Mise en garde du système d'administration transdermique..... | 28 |

Chapitre IV : Matériels et méthodes

| | |
|--|----|
| Introduction | 29 |
| IV .1. Matériel végétal..... | 31 |
| IV .1.1. La récolte de la plante | 31 |
| IV .1.2. Préparation des échantillons..... | 31 |
| IV .2. Extraction par macération | 32 |
| IV .3. Calcul du rendement | 33 |
| IV.4. Caractérisation..... | 33 |
| IV.4.1. Criblage phytochimique | 33 |
| IV.4.1.1. L'épuisement du matériel végétal avec l'eau..... | 33 |
| IV.4.1.2. L'épuisement du matériel végétal avec l'EtOH | 33 |
| IV.4.1.3. Tests chimiques d'identification | 34 |
| IV .5. Evaluation des activités biologiques | 36 |
| IV .5.1. Activité antibactérienne..... | 36 |
| IV .5.1.1. Technique de diffusion sur milieu gélosé (Antibiogramme) | 36 |
| IV .5.1.2. Stérilisation du matériel | 36 |
| IV .5.1.3. Préparation de l'inoculum | 38 |
| IV .5.1.4. Préparation des dilutions des extraits..... | 38 |
| IV .5.1.5. Test de sensibilité à l'extrait éthanolique : test d'inhibition | 38 |
| IV .5.1.6. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme | 39 |
| IV .5.1.7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices : (CMI)..... | 40 |
| IV .5.1.8. Lectures des résultats | 41 |
| IV .5.2 Activité antioxydante | 41 |
| IV .5.2.1. Evaluation de l'activité antioxyante..... | 40 |
| IV .5.2.2. Estimation du pouvoir antiradicalaire (DPPH•)..... | 40 |
| IV .5.2.3. Protocole expérimental | 42 |
| IV .6. Formulation des nanoémulsions..... | 43 |

| | |
|--|----|
| IV .7. Caractérisation des nanoémulsions | 44 |
| IV .7.1. Observations macroscopiques..... | 44 |
| IV .7.2. Mesure de la distribution de taille des nanoémulsion par DLS..... | 44 |
| IV .7.3. Mesure du potentiel Zêta..... | 45 |
| IV .7.4. Observations microscopiques..... | 46 |
| IV .7.5. Etude de la rhéologie..... | 47 |
| IV .7.5.1. Viscosité d'une dispersion | 47 |
| IV .7.5.2. Dispositif de mesure..... | 47 |
| IV .7.5.3. Viscoélasticité du milieu | 48 |
| IV .7.5.4. Mesure en écoulement dynamique..... | 48 |
| IV .7.6. Mesure du pH..... | 49 |
| IV .8. Elaboration de patch dermique | 49 |
| IV .8.1. Les polymères utilisés | 50 |
| IV .8. 2. Préparation des patchs transdermiques | 50 |
| IV .9. Caractérisations du Patch | 50 |
| IV.9. 1. Caractérisation physico-chimique..... | 50 |
| IV .9.1.1. Épaisseur | 51 |
| IV .9.1.2. Variation de poids | 51 |
| IV .9.1.3. Pliage d'endurance..... | 51 |
| IV.9.2. Caractérisation spectroscopique..... | 51 |
| IV.10. Cinétique de libération du principe actif. | 51 |
| Chapitre V : résultats et discussion | |
| V.1. Rendement d'extraits de <i>teucrium pollium L</i> | 52 |
| V.2. Etude phytochimique..... | 52 |
| V.3. Activités Biologiques | 53 |
| V.3.1. Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait..... | 53 |
| V.3.2. Détermination de la CMI d'extraits de <i>T.pollium</i> | 58 |

| | |
|---|----|
| V.3.3. Évaluation de l'activité anti oxydant de l'extrait par la méthode DPPH | 59 |
| V. 4. Formulation de nanoémulsion | 63 |
| V. 5. Caractérisation des nanoémulsions | 64 |
| V .5.1 Observation des nanoémulsions à l'œil nu..... | 64 |
| V. 5.2. Mesure de la distribution de taille des nanoémulsions par Dls. ... | 65 |
| V. 5.3. Mesure du potentiel Zéta | 66 |
| V. 5.4. Observations microscopiques..... | 66 |
| V. 5.5. Analyse rhéologique..... | 67 |
| V.5.5.1. Test de viscoélasticité..... | 67 |
| V.5.5.2. Test de fréquence..... | 69 |
| V.5.5.3. Test d'écoulement | 70 |
| V. 5.6. Mesure du pH | 70 |
| V.6. Formulation du Patch | 71 |
| V.6.1. préparation des films | 71 |
| V.6.2. Préparation des patchs | 71 |
| V.7. Caractérisation des patchs | 72 |
| V.7.1. Structure et aspect du film..... | 72 |
| V.7.2. Evaluation de la qualité des patchs..... | 74 |
| V.7.2.1. Observation à l'œil nu | 74 |
| V.7.2.2. Perméation cutanée in vitro. ... | 74 |
| V.7.2.3. Analyse réalisé sur le film et le patch par IR..... | 76 |

CONCLUSION GENERALE

REFFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

LES ANNEX

LISTES D'ABREVIATIONS

- ATCC : American Type Culture Collection.
- ANSM : l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament.
- CMI : Concentration minimale inhibitrice.
- CIP : Composition d'inversion de phase.
- DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil.
- DMSO : Dimethyl sulfoxide.
- E/H/E : Eau dans huile dans la phase aqueuse.
- ES : Emulsification spontanée.
- E/H : Eau dans huile .
- FRAP : Ferrique reducing antioxydant power.
- IC50 : Concentration inhibitrice à 50%.
- MHP :Microfluidisation à haute pression.
- NEs : Nanoémulsions
- PIE : Méthode de point d'inversion d'émulsion.
- TIP : Température d'inversion de phase.
- HE : Huile essentielle.
- HP : haute pression.
- HHP : Homogénéisation à haute pression.
- UV : La spectroscopie Ultraviolet.
- ETOH : Ethanol
- Tr : Temps de rétention.

LISTE DES FIGURES

- Figure I-1 :** Illustration des feuilles et des fleurs du *Teucrium polium L.*
- Figure I-2 :** Illustration de plante *Teucrium polium L*
- Figure I-3 :** Répartition géographique de l'espèce *T. Polium L* en Algérie.
- Figure II-1:** Illustration du phénomène d'émulsification spontanée.
- Figure II-2 :** Schéma représentatif de la de la nanoémulsion par méthode PIT
- Figure II-3 :** Différents types de valves dans les homogénéisateurs à haute pression.
- Figure II-4 :** Principe de fonctionnement d'un microfluidiseur.
- Figure II-5 :** Illustration d'un appareil de sondes a ultrasons.
- Figure II-6 :** Principe de fonctionnement de l'émulsification par membrane.
- Figure II-7 :** Nano émulsion Huile dans Eau.
- Figure II-8 :** Nano émulsion Eau dans Huile.
- Figure II-9 :** Les deux types d'émulsions multiples.
- Figure II-10:** Emulsion W/O/W observée au microscope optique a contraste de phase.
- Figure III.1 :** Schéma d'un patch transdermique.
- Figure III.2 :** patch transdermique.
- Figure III.3 :** Adhésif médicamenteux monocouche.
- Figure III.4 :** Adhésif médicamenteux multicouche.
- Figure III.5 :** Système de réservoir.
- Figure III.6 :** Médicament dans le système adhésif.
- Figure IV .1:** organigramme de la partie expérimentale.
- Figure IV .2 :** Une image de Google de la région de Dirrah (Bouira).
- Figure IV .3 :** Dispositif d'extraction par macération : Macération – Filtration-évaporation
- Figure IV .4 :** Préparation de l'inoculum.
- Figure IV .5 :** Coulage des boites de pétries
- Figure IV .6 :** Incubation
- Figure IV.7 :** représentation graphique de la méthode de dilution d'extrait testée
- Figure IV.8:** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant.
- Figure IV .9:** L'instrument de Dls.
- Figure IV .10:** La cellule de Zéta.

Figure IV .11: microscope de marque OPTIKA.

Figure IV .12: Rhéomètre.

Figure IV.12 : a) Coulée de solution sur la peau ;b) formation d'un film transparent ;c) décoller le film après la thérapie.

Figure V.1 : Diagramme circulaire sur les caractéristiques phytochimiques.

Figure V.1 : Activité de différentes concentrations d'extrait sur *staphylococcus*

Figure V.2 : Activité de différentes concentrations d'extrait sur *psodomonas*

Figure V.3 : Activité de différentes concentrations d'extrait sur *Bacillus*

Figure V.4 : Résultat d'inhibition après 24h d'incubation d'extraits contre *Bacillus*.

Figure V.5 : Résultat d'inhibition après 24h d'incubation d'extraits contre *P.aereuginosa*

Figure V.6 : Résultat d'inhibition après 24h d'incubation d'extraits contre *S. aureus*.

Figure V.7: l'histogramme de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'acide ascorbique

Figure V.8 : l'histogramme de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait éthanolique.

Figure V.9 : Photo obtenue au microscope optique (grossissement x1000)

Figure V.10 : Comportement viscoélastique d'une dispersion à l'état gel de particules de nanoémulsion ($\Phi=0.36$) pour une fréquence $f=1\text{Hz}$

Figure V.11 : test de fréquence (stabilité) d'une dispersion à l'état gel de particules de nanoémulsion le strain est 1 % pour une fréquence $f=0,01 - 100 \text{ Hz}$.

Figure V.12 : test d'écoulement de nanoémulsion sur la peau pour un cisaillement $0.001-1000\text{S}^{-1}$.

Figure V.13 : aspect de réservoir

Figure V.14 : les patches avec le conditionnement proposé

Figures V.15 : Aspect du système film (a) la formation d'un film transparent à l'application ; (B) non collant, C) flexible et facile Film pliable après séchage.

Figure V.16 : un micromètre.

Figure V.17 : Le patch transdermique formule à l'échelle laboratoire.

Figure V.18 : Profil de taux de libération de patch transdermiques.

Figure V.19 : Spectre IR de film

Figure V.20 : Spectre IR de patch

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau IV.1 : Souches bactériennes sélectionnées.

Tableau IV.2 : Gamme de concentration d'extraits de *T.polium.L.*

Tableau V.1. Activité antibactérienne d'extrait *T.pollium.*

Tableau V.2: Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne \pm écart-type) et sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques commercialisés.

Tableau V.3: représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'Acide ascorbique.

Tableau V.4: représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique.

Tableau A: CI50 du test DPPH ($\mu\text{g/ml}$) des différents extraits

Tableau V.5: Formulation des nanoemulsion

Tableau V.6 : Les résultats de Formulation des nanoemulsions

Tableau V.7 : propriétés organoleptiques de NE

Tableau V.8 : les résultats de DIs

Tableau V.9 : les résultats de Potentiel Zéta

Tableau V.10 : les différents volumes prélevé.

Tableau V.11: Formulation des patches transdermiques.

Tableau V.12 : Les résultats de formulation de patch

Tableau V.13 : Évaluation des films.

Tableau V.14 : L'évolution de Taux de libération de médicament imprégné

Introduction générale

Introduction générale

Les plantes médicinales constituent une richesse et une alternative idéale aux médicaments synthétiques de nature chimique. Aujourd'hui, en Algérie comme partout en Afrique, les populations sont confrontées aux problèmes de non accessibilité aux soins et particulièrement aux médicaments notamment en zone rurale, et se retrouvent dans l'obligation de recourir aux pharmacies traditionnelles .

Selon l'organisation mondiale de la santé (O.M.S), la médecine traditionnelle ou phytothérapie se définit comme l'ensemble de toutes les connaissances pratiques explicables ou non pour diagnostiquer ou éliminer un déséquilibre physique, mental en s'appuyant exclusivement sur l'expérience vécue et l'observation, transmises de génération en génération (oralement ou par écrit)[1]. Sachant qu'une plante peut contenir plusieurs milliers de substances et différents principes actifs qui représentent 25% des médicaments prescrits, soit un total de 120 composés d'origine naturelle provenant de 90 plantes différentes[2], la valorisation scientifique de la médecine traditionnelle doit conduire notamment à la mise au point de médicaments à base de plantes. Les mots clés, dans ce domaine, doivent être : sécurité, efficacité et qualité.

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.

T. polium L, ou la germandrée tomenteuse «*Kayatta ou Djaâda, Gattaba*» est une espèce Méditerranéenne, connue par sa richesse en métabolites secondaires tels que les huiles essentielles et les polyphénols [3] .

La germandrée tomenteuse, lamiacée commune des terrains rocailleux, est utilisée 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[4,6].

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 nano-émulsions ont 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.

Introduction générale

C'est dans ce contexte précis que s'inscrit notre problématique. Il s'agit d'extraire les composés actifs de *T. polium* Après caractérisation formuler une nanoémulsion qui servira de réservoir pour ces substances et de les incorporer dans une forme d'administration transdermique qui est un système dans lequel les médicaments sont administrés par voie topique sous forme de gels ou de patches qui peuvent administrer des médicaments pour les effets systémiques à un taux prédéterminé et contrôlé [6, 7].

Le principe actif diffuse progressivement à travers les couches dermiques en assurant des activités biologiques et thérapeutiques. Afin de structurer notre mémoire, nous l'avons scindé en deux parties.

- La première partie de l'étude renferme 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 est dédié à une présentation générale de la nanoémulsion ainsi que les méthodes de formulation et aussi leurs avantages et inconvénients.

Le troisième chapitre décrit les patches transdermiques, leur définition et en particulier sur leur composition, ensuite les différents types de systèmes transdermiques ainsi que leur avantages et inconvénients.

- 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 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 antérieurs réalisés dans le même contexte.

Introduction générale

Enfin ce mémoire est achevé par une **conclusion générale** dans laquelle différentes perspectives et recommandations dans le même contexte sont proposées en vue d'une continuité dans cet axe jugé passionnant.

Chapitre I

Présentation de l'espèce

Teucrium polium L

Chapitre I : Présentation l'espèce de *teucrium polium*

I.1. Généralités :

Les plantes médicinales sont considérées comme une source importante de nouvelles substances chimiques qui ont un effet thérapeutique important, dans les dernières années il y a eu un intérêt croissant pour l'étude de ces plantes [5].

Le genre *Teucrium* comprend plus de 300 espèces présentes dans le bassin méditerranéen, dont 21 se trouvent en Algérie, poussant à l'état spontané dans diverses régions du globe [9]. Les espèces de la famille des lamiacées sont des herbacées ou arbrisseaux, annuelles ou vivaces, généralement aromatiques [10].

I.2. Plantes médicinales :

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée Française 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, utilisées en l'état, soit le plus souvent sous la forme desséchée, soit à l'état frais [11].

En France, l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament a mis à jours, en 2016, la Pharmacopée Française, dans sa XIème édition. Celle-ci renferme, entre autre, les listes des Plantes Médicinales présentées sous forme de deux tableaux :

Liste A « Plantes médicinales utilisées traditionnellement »,

Liste B « plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparations dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu ».

Pour chaque espèce médicinale, l'ANSM a précisé le nom français et scientifique de la plante ainsi que la famille botanique.

D'une manière générale, les plantes peuvent être classées en 3 catégories : [12, 13]

- **Plantes aliments ou plantes comestibles** qui représentent une part très importante de la ration alimentaire de l'Homme et des animaux herbivores.

Chapitre I : Présentation l'espèce de *teucrium polium*

- **Plantes médicinales** ; ce sont les espèces botaniques utilisées en phytothérapie et médecine populaire pour guérir certaines affections chez l'Homme et les animaux.
- **Plantes poisons ou plantes toxiques** ; ce sont les plantes qui peuvent entraîner des accidents toxicologiques chez les individus qui les ingèrent.

I.3. Description botanique :

Le genre *Teucrium*, encore dénommé les germandrées, regroupe environ 260 espèces de plantes herbacées ou de sous-arbrisseaux de la famille des Lamiacées. *Teucrium polium* est une espèce très variable ; de nombreuses sous espèces ont été décrites, dont certaines sont parfois érigées au rang d'espèce [14].

C'est une plante de 10 à 35 cm, exhale une odeur forte, aromatique, agréable. Vivace à tiges robustes, longuement ligneuses, dressées ou redressées, rameuses, à rameaux couverts de poils cotonneux. Les fleurs blanches, rarement purpurines, s'épanouissent depuis le mois de mai jusqu'au mois d'août [13].

Les fleurs sont blanches ou jaunâtres en grappes denses au sommet des rameaux. Leur caractéristique est de ne posséder qu'une lèvre, la lèvre inférieure, regroupant les 5 pétales soudés [15]. Le calice, couvert de poils courts et cotonneux, est à 5 dents inégales 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 [13].

La corolle a 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. Les 4 parties du fruit mûr sont brunes et ornées en réseau à leur surface [16].



Figure I.1. Illustration des feuilles et des fleurs du *teucrium polium L* [13,17]

I.4. Position systématique :

Selon Quezel et Santa, (1963) la systématique de *Teucrium polium L* est la suivante :[16]

- **Règne :** Végétal
- **Classe :** Magnoliopsida
- **Ordre :** Lamiales
- **Famille :** Lamiaceae.
- **Genre :** Teucrium
- **Espèce:** *Teucrium polium L.*

Noms vernaculaires :

- **En arabe :** Kayatta, Djaâda (Algérie), Takmazzut (Touaregs-Algerie), Jaaida (Maroc), Hachichetelrih (Liban)[18].
- **En Français :** Germandrée blanc-grisâtre, Germandrée tomenteuse, Germandrée polium, Polio de montagnes[19].

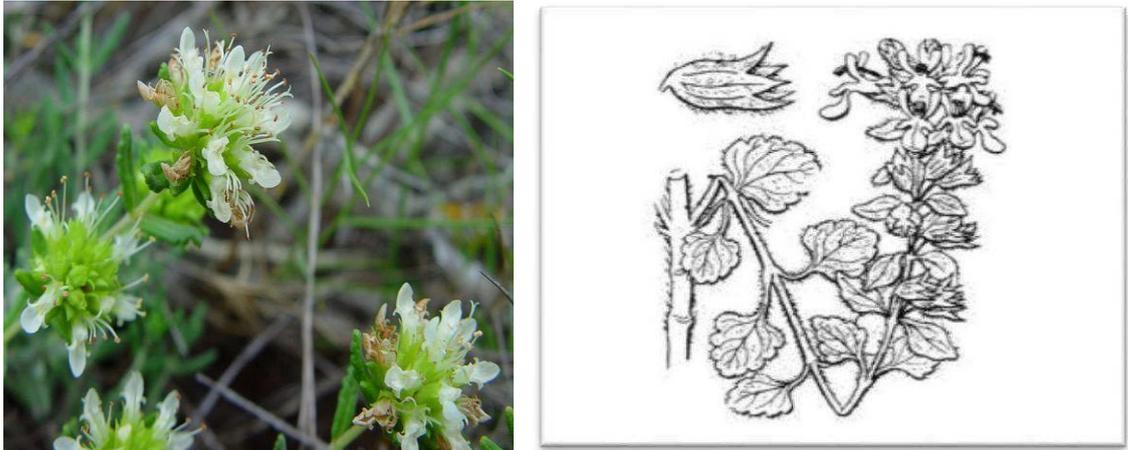


Figure I.2 : Illustration de la plante *Teucrium polium* L [13].

I.5. Distribution géographique :

Teucrium polium est un espace qui pousse à l'état sauvage principalement en Afrique du Nord, en Europe du Sud-ouest c'est un arbuste vivace bien adapté au climat méditerranéen avec des environnements chauds arides [20].



Figure I.3 : Répartition géographique de l'espèce *T. Polium* L. en Algérie [21].

I.6. Composition chimique :

Plusieurs chercheurs ont évalué la composition chimique de *T. polium* développée dans différents secteurs géographiques. La plupart de ces études, basées sur l'analyse des extraits par les méthodes chromatographiques en phase gazeuse, ont indiqué la présence de plusieurs composés incluant principalement les flavonoïdes, polyphénols[22,24], iridoides, tannins, alcaloïde[25,26] et huiles essentielles principalement mono terpéniques /sesquiterpènes hydrocarbures[5, 27,28] et sesquiterpènes oxygénés [22, 23], les diterpénoïdes avec un squelette neoclerodane, avec plus de 220 diterpènes[29].

De plus, d'autres études ont montré *T. polium* contient les glycosides tels que verbascoside et poliumoside (connus sous le nom de phénylethanoïde) au niveau des parties aériennes de la plante[30].

Par ailleurs, Plusieurs chercheurs ont identifié six flavones aglycones: lutéoléine, apigénine, diosmétine, cirsiol, cirsimaritine et cirsiléol[31], par contre les composés stéroïdiens ont été isolés[27, 28] L'analyse des principes actifs révèle la présence des saponines[32], tannins et alcaloïdes[25].

I.7. Effets biologiques et pharmacologiques et thérapeutiques :

Des espèces de *T. polium* ont été employées en tant qu'herbes médicinales pendant plus de 2000 années [33]. Les recherches expérimentales ont montré que la plante *Teucrium polium L* a des effets biologiques, pharmacologiques et thérapeutiques spécifiques comme diurétique, diaphorétique, inotropique et chronotropique, tonique, antipyrétique, cholagogue et anorexiques[34,35].

Depuis longtemps, on utilise *la germandrée*, en infusion, pour combattre la goutte, les rhumatismes, la bronchite chronique et les mucosités abondantes. En bain de bouche, elle soigne les gingivites, et en lotion, elle accélère la cicatrisation des blessures [36].

En médecine traditionnelle africaine, cette espèce est utilisée dans les périodes de stress, car il permet de se relaxer, de se détendre, d'être serein et plein d'énergie. Elle permet la relaxation des muscles en augmentant leur force et soulager ces douleurs [37], la diminution de l'anxiété et la lutte contre la fatigue et l'agressivité[13].

Chapitre I : Présentation l'espèce de *teucrium polium*

De plus, elle favorise le sommeil et permet également de stimuler la mémoire, d'augmenter sa concentration et sa lucidité [38], Les propriétés antistress et antioxydants permettent de lutter contre le vieillissement de la peau[39].

Le *Teucrium* est une plante médicinale qui permet la résistance aux antibiotiques, peuvent être utiliser pour se protéger contre les agents pathogènes et peuvent servir de substances antimicrobiennes [5, 9]. Donc elle dispose un effet antibactérien.

Cette plante a mené à diminuer le taux des acides gras et bloquent la peroxydation [40] au niveau des érythrocytes, ainsi elle a montré des effets anti inflammatoires[37,41], antifongiques[42],antinociceptifs , antispasmodique[37,43] anticancéreuses[23,41],hépatoprotecteurs[44],hypolipidémiques[23],antihypertensifs [45], hypolipémiante[30].

La germandrée a été utilisé pour divers types de conditions pathologiques, telles que gastro-intestinales troubles et rhumatismes [46], contre la jaunisse, anti anorexie, contre les coliques spasmodique et gastrique, désordres stomacaux[43,47].

Teucrium polium peut avoir quelques intérêts d'ordre cliniques on cite : les affections du foie, abaissement de la pression artérielle , fièvre c'est l'aspirine de touarègue[43,47] .

Sa décoction est largement utilisée comme agent hypoglycémiant chez les rats normoglycémiques par rapport aux modèles hyper glycémiques induits par le streptozotocine[44]. Cependant, des épreuves de sûreté sont exigées pour confirmer son action hypoglycémiant [36].

Parmi les effets Cytotoxique on trouve que les résultats qui montrent que l'extrait éthanolique de *T. polium* dispose un potentiel anti tumoral très efficace par l'inhibition, *in vivo*, de la génération de colonies de quelques lignées cellulaires en milieu d'agarose et la suppression leurs croissance[48] . Toutefois, l'extrait aqueux de *T. polium* augmente la cytotoxicité négociée contre *N*-méthyl-*N*-nitro-*N*-nitro soguanidine sur des cultures de cellules primaires des hépatocytes des rats et réduit significativement les index mitotiques et les cellules nécrotiques [49].

Chapitre II

Nanoémulsions

II.1. Généralités :

Les nanoémulsions sont de nouveaux systèmes d'administration de médicaments, elles assurent la protection du principe actif et améliorent ses actions pharmacologique et thérapeutique et minimisent l'effet indésirable ou toxique de certains composants [50].

II.2. Définition :

C'est un système colloïdal sous forme de dispersion isotrope claire ou transparente constituée de deux phases liquides [51], non miscibles telles que l'huile et l'eau, stabilisée par le film interfacial de molécules de surfactant. C'est un système thermodynamiquement instable [52], ou métastables [53].

Elles sont des émulsions avec un diamètre de gouttes nanométriques, dites « nano-gouttes ou gouttelettes » et une distribution de taille étroite [53]. La taille des gouttelettes de phase dispersée est d'environ de 10 à 100 nm [54,55].

Le terme "nanoémulsion" désigne également mini émulsions, les ultrafines émulsions, les émulsioïdes [55][56][60] les microémulsions instables et les émulsions su micrométriques [55, 62].

II.3. Méthodes de formulation des nanoemulsions :

Les NEs peuvent être préparées par différentes méthodes classées dans deux grandes catégories : les méthodes à haute énergie et les méthodes à basse énergie [57].

II.3.1. Méthodes d'émulsification à basse énergie :

Les méthodes à basse énergie sont réparties en quatre catégories : [53]

II.3.1.1 Emulsification spontanée :

Le terme émulsification spontanée vient de la simplicité du processus d'émulsification : les nanoémulsions sont générées par un simple mélange de deux phases liquides [57]. Ce procédé se fait généralement à température constante et sans modification de courbure spontanée du tensioactif. Ce processus repose sur un simple système huile / tensioactif, réglé à une température pour laquelle le tensioactif possède la meilleure affinité pour la phase huileuse (Figure II. 1) [59,60]. Lors du mélange des deux phases, le tensioactif et les autres composés miscibles dans l'eau vont se déplacer vers la phase

Chapitre II : Nanoémulsions

aqueuse, ce qui va alors provoquer une forte perturbation à l'interface des deux phases ainsi qu'une augmentation de l'air interfaciale. Il est nécessaire d'avoir un ratio eau/huile élevé[60].

Ce phénomène va entraîner un effet de bourgeonnement et donc la formation des gouttelettes d'huile. Plus la diffusion se fera rapidement, plus la perturbation sera importante. La perturbation augmente avec la rapidité de la diffusion ce qui rend alors plus facile la formation de gouttelettes de taille nanométrique.

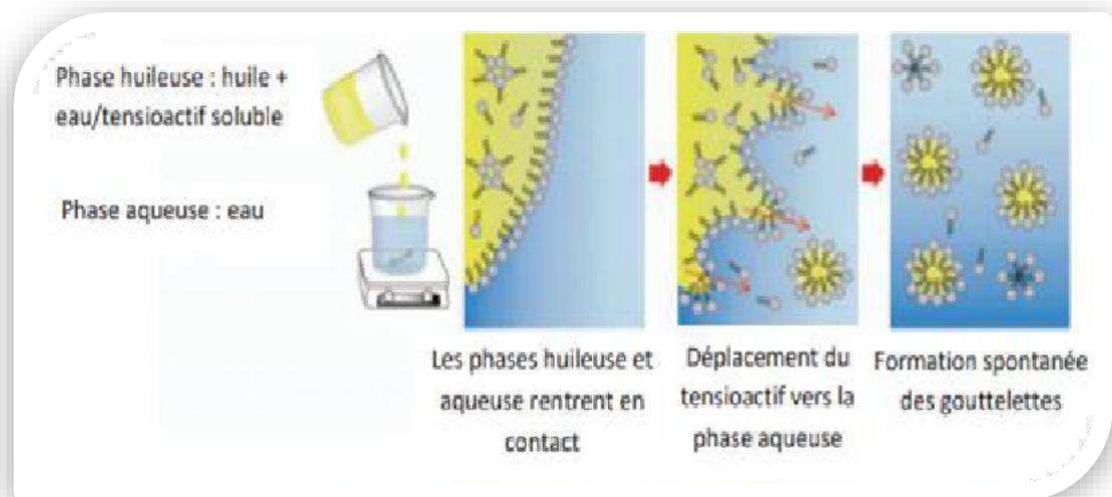


Figure II.1 : Illustration du phénomène d'émulsification spontanée[58].

II. 3.1.2. Par inversion de phase :

Également connue sous le nom de méthode de condensation, l'augmentation de la température entraîne les changements chimiques des tensioactifs polyoxyéthylène par dégradation de la chaîne polymère avec la température[62]. Cette méthode implique la transition des phases liquides par la courbure spontanée du tensioactif[60]. Ceci pourrait être réalisé en maintenant la composition de l'émulsion fixe tout en changeant la température de prise (température d'inversion de phase, TIP)[63]

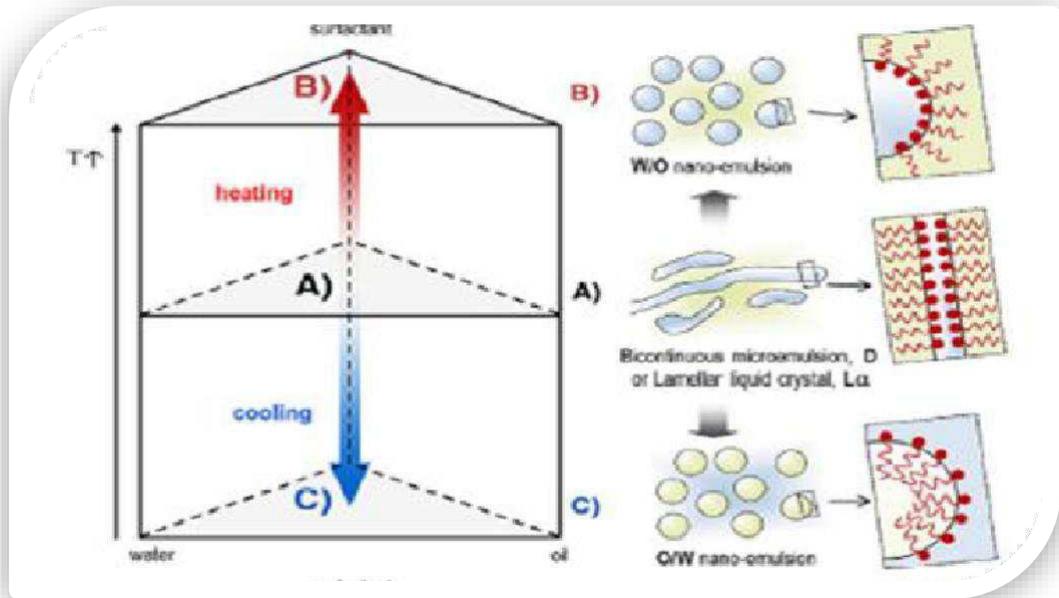


Figure II.2 : Schéma représentatif de la formation de la nanoémulsion par méthode PIT

II. 3.1.3 Composition d'inversion de phase :

Le principe est similaire à celui de la température d'inversion de phase, la différence est qu'il s'agit ici de modifier la solubilité ou la géométrie du tensioactif en modifiant la composition. Pour cela, il est possible, par exemple, d'ajouter un sel qui neutralise la charge de la tête polaire du tensioactif et favorise la formation d'émulsions E/H. On peut aussi diluer une émulsion E/H à forte concentration en électrolyte avec de l'eau pour diminuer la force ionique au-dessous de sa valeur critique et, en conséquence, inverser cette émulsion[64].

II.3.1.4. Méthode de point d'inversion d'émulsion :

Dans la méthode PIE, l'inversion de phase se produit via des mécanismes CIP[65]. L'inversion de phase catastrophique est induite en modifiant le volume fractionné de la phase dispersée plutôt que les propriétés du surfactant [66,67]. Lorsque la phase aqueuse est ajoutée au mélange huile-tensioactif, le système commence à agir comme une nanoémulsion E / H. Lorsque des quantités croissantes d'eau sont ajoutées au-dessus d'une teneur en eau critique sous agitation continue, les gouttelettes d'eau fusionnent les unes avec les autres et le point d'inversion de phase est atteint ; cela provoque la formation de structures bi-continues ou lamellaires. Une dilution supplémentaire avec de l'eau provoque

une inversion de phase d'un système E / H à un système H / E par microémulsion bi continue intermédiaire. Les tailles des gouttelettes de nanoémulsion formées dépendent des variables du procédé, telles que le taux d'addition d'eau et la vitesse d'agitation. Pour qu'une inversion de phase catastrophique se produise, le tensioactif doit principalement être présent dans la phase dispersée, de sorte que le taux de coalescence est élevé et qu'une inversion de phase rapide se produit. Les tensioactifs à petites molécules peuvent être utilisés en inversion de phase catastrophique. Ces tensioactifs sont capables de stabiliser à la fois les émulsions E / H et les émulsions H / E [64, 68,69].

II.3.2 Méthodes d'émulsification à haute énergie :

Les méthodes d'émulsification à haute énergie utilisent une source externe de l'énergie par l'action de forces mécaniques pour fragmenter les gouttelettes. Le mélangeur simple à turbine rotative n'est pas suffisamment efficace pour obtenir des gouttelettes avec une taille nanométrique. Seuls les appareils mécaniques qui peuvent générer des forces répulsives très intenses sont capables de produire de telles gouttelettes. On utilise pour cela l'homogénéisateur et le microfluidiseur à haute pression (HP) et les appareils à ultrasons[59].

II.3.2.1 Homogénéisation à haute pression :

C'est une technique basée sur l'utilisation d'un homogénéisateur à valve haute pression pour produire des gouttelettes ultrafines. Cette méthode est actuellement la plus répandue pour l'obtention d'émulsions fines à l'échelle industrielle. Elle donne de meilleurs résultats quand on l'applique à des émulsions primaires préalablement préparées à partir de deux phases dispersées avec des mélangeurs à haute vitesse avant de passer à l'HHP.

L'homogénéisateur est équipé d'une pompe qui amène l'émulsion primaire dans une chambre au-dessus de l'appareil, puis la force à traverser une valve étroite à l'extrémité de cette chambre. L'émulsion subit alors une combinaison de forces disruptives intenses (turbulence, cisaillement et cavitation). La turbulence, qui est le mécanisme prédominant de l'émulsification, conduit à la rupture des grosses gouttes en gouttelettes plus petites[70].

Différents types de valves sont disponibles pour accroître l'efficacité de la perturbation des gouttelettes dans l'homogénéisateur en maintenant une pression élevée tout au long du procédé. On utilise, par exemple, un orifice ou une soupape à pointeau

pouvant produire une élongation axiale (**Figure II.3 A**), un cylindre concentrique rotatif (**Figure II.3 B**) ou une soupape à starter (**Figure II.3.C**) produisant tous les deux une élongation radiale [71].

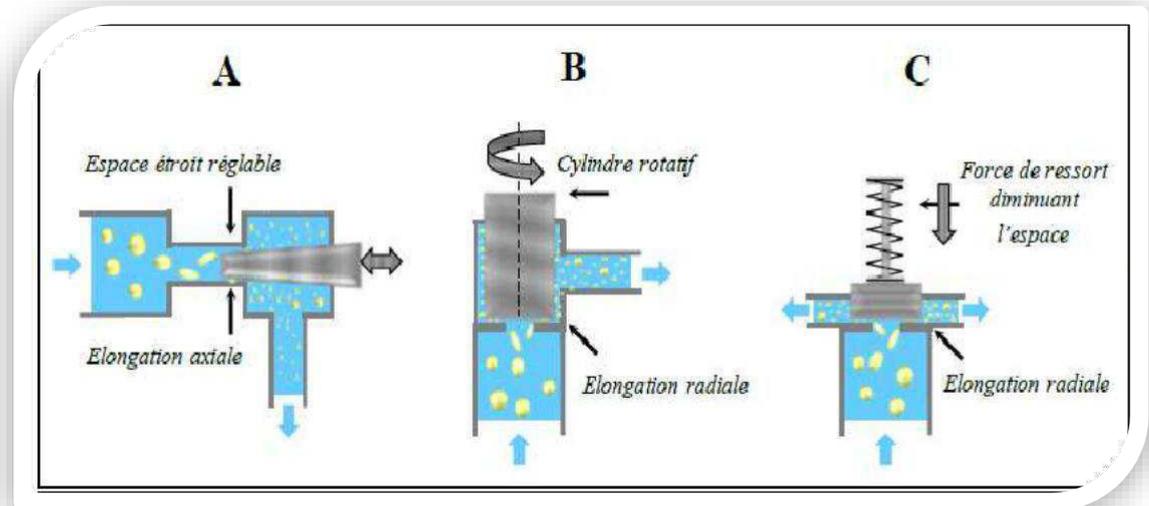


Figure II.3: Différents types de valves dans les homogénéisateurs à haute pression :
(A) Soupape à pointeau, (B) soupape à cylindre rotatif et (C) soupape à starter [71].

Le procédé d'homogénéisation peut être continu ou discontinu. Le produit résultant peut être soumis à plusieurs cycles d'HHP jusqu'à obtenir la taille des gouttelettes de nanoémulsion et l'indice de polydispersité souhaités [72].

La taille des gouttelettes obtenues par cette méthode a tendance à diminuer avec l'augmentation de la pression d'homogénéisation, de la durée du traitement pour le procédé continu ou du nombre de passages pour le procédé discontinu, avec l'accroissement de la vitesse d'adsorption d'émulsifiant à l'interface, et avec la diminution de la tension interfaciale. La viscosité des deux phases joue aussi un rôle important sur l'efficacité de l'homogénéisation. Parmi une chercheuse qui a démontré que le rapport de viscosité entre la phase dispersée (η_d) et la phase continue (η_c) doit être dans la gamme de 0,05 à 5 [73].

Par ailleurs, Plusieurs chercheurs ont rapporté que l'utilisation d'un mélange de plusieurs tensioactifs est plus efficace qu'un seul grâce à par l'augmentation du module élastique de dilatation de l'interface. Il convient de dissoudre préférentiellement le tensioactif dans la phase dispersée car cela conduit à des gouttelettes plus petites que le cas où le tensioactif est dissout dans la phase continue [74]. Des études ont déjà montré que

l'émulsification réalisée par étapes à pression croissante donne de meilleurs résultats surtout lorsque la viscosité de la phase dispersée est importante [72].

II. 3.2.2 Microfluidisation à haute pression :

Dans cette technique, on utilise un appareil « microfluidiseur » équipé d'une pompe volumétrique à haute pression(HP) qui force le produit à passer dans la chambre d'interaction qui contient des canaux très fins, dits "microcanaux". Ces derniers sont conçus de manière à ce que les deux courants de l'émulsion s'impactent à haute vitesse dans la chambre d'interaction, permettant d'obtenir des gouttelettes très fines submicroniques.

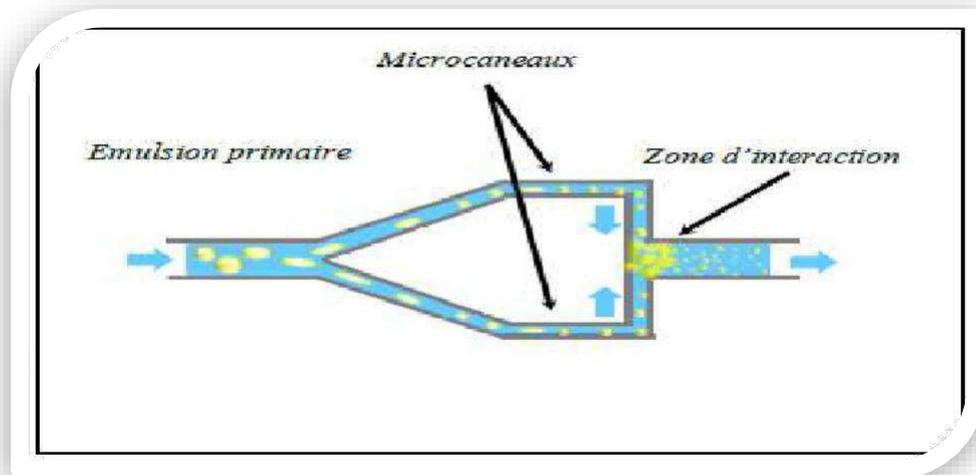


Figure II.4: Principe de fonctionnement d'un microfluidiseur[59].

Lors de l'émulsification par cette méthode, les deux phases sont combinées et traitées dans un homogénéisateur en ligne pour obtenir une émulsion primaire. Ensuite, l'émulsion primaire est introduite dans la chambre d'interaction plusieurs fois jusqu'à obtenir la taille souhaitée. Enfin, la nanoémulsion obtenue est filtrée pour éliminer les grosses gouttes et obtenir une nanoémulsion homogène mono dispersé [75]. La taille des gouttelettes obtenues par cette méthode dépend des mêmes facteurs qu'avec l'Homogénéisation à haute pression(HHP)[59].

II.3.2.3. Emulsification assistée par ultrasons :

Au cours de ces dernières années, 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[76,77]. La figure ci-dessous illustre ce procédé.

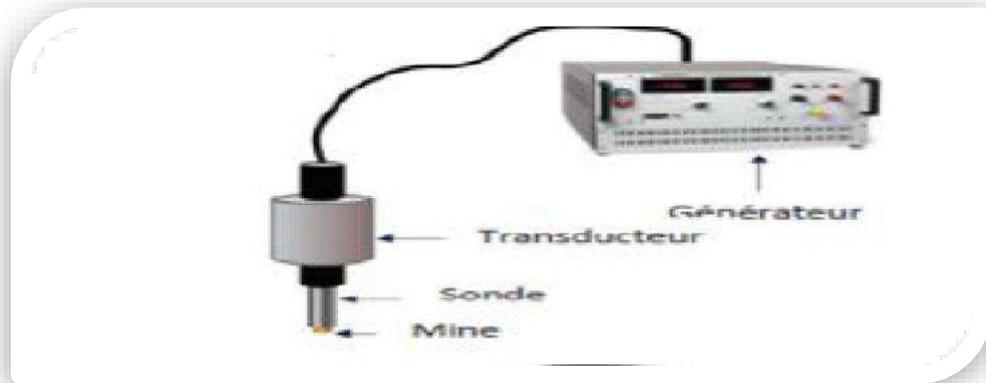


Figure II.5 : Illustration d'un appareil de sondes à ultrasons

Généralement, c'est la phase la moins visqueuse du système qui va subir le phénomène de cavitation et devenant alors la phase continue de l'émulsion. Les forces perturbatrices intenses décomposent efficacement les grosses gouttelettes en gouttelettes plus petites (< 100 nm) à l'intérieur de l'homogénéisateur [78]. Les nanoémulsions produites grâce à cette méthode sont généralement composées de très fines gouttelettes avec une répartition de taille des particules très étroite, ce qui est très intéressant pour de nombreuses applications commerciales.

Cette méthode a longtemps été comparée au procédé employant le microfluidiseur. Plusieurs études ont également montré que cette technique permettait d'obtenir des gouttelettes de petite taille [77,79]. Bien que, l'appareil utilisé pour réaliser l'émulsification par ultrasons est bien plus facile à nettoyer, cette technique n'est pas la plus adaptée pour des applications industrielles car il est nécessaire d'imposer une agitation annexe au mélange lors de la réalisation de grands volumes [59].

II.3.2.4 Emulsification par membrane :

Cette méthode est appelée parfois l'ultrafiltration. Le principe de l'émulsification par membrane consiste à forcer les gouttes à traverser les pores d'une membrane de taille

Chapitre II : Nanoémulsions

définie et très fine (**Figure II.6**) par l'application d'un gradient de pression en faisant couler la phase continue tangentiellement à la membrane. Les gouttelettes obtenues sont mono dispersés et leur taille dépend de la taille des pores de la membrane, de sa mouillabilité et des conditions du procédé (la vitesse de flux de la phase dispersée, la pression transmembranaire, la cinétique d'adsorption de l'agent émulsionnant, la tension interfaciale, la vitesse tangentielle de la phase continue).

Plusieurs chercheurs ont conclu que ces membranes ne peuvent pas produire des nano-gouttelettes [71]. Néanmoins, des études récentes sur une membrane hydrophile ont démontré que l'optimisation du procédé, notamment de la pression transmembranaire et de la vitesse d'agitation de la phase continue, permet d'obtenir des NEs avec des tailles des gouttelettes nanométriques (< 200 nm) 25 fois plus petites que la taille des pores de la membrane[80,81].

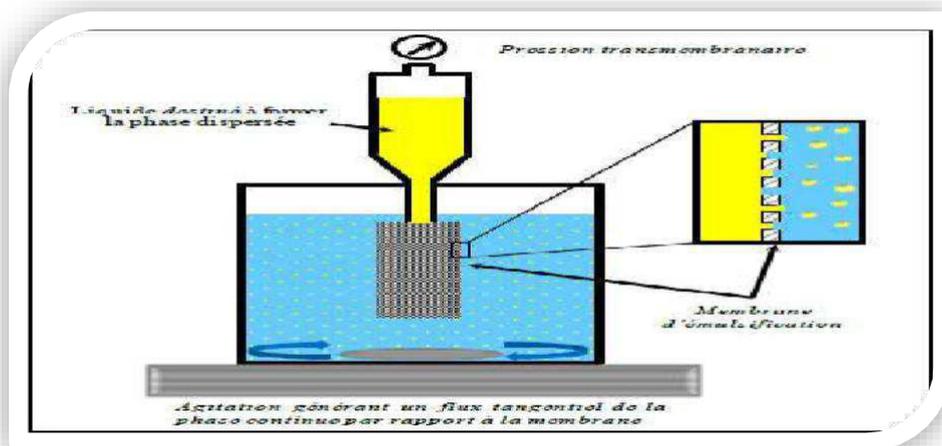


Figure II.6: Principe de fonctionnement de l'émulsification par membrane[80].

II.4. Différents types de nanoémulsions:

Il existe deux types de nanoémulsions selon la répartition des différentes phases employées.

II.4.1. Nanoémulsion simple : [82,83]

- Nanoémulsion directe** : (notée H/E pour Huile dans Eau) dans laquelle l'huile est dispersée dans la phase aqueuse continue (**figure II. 7**)

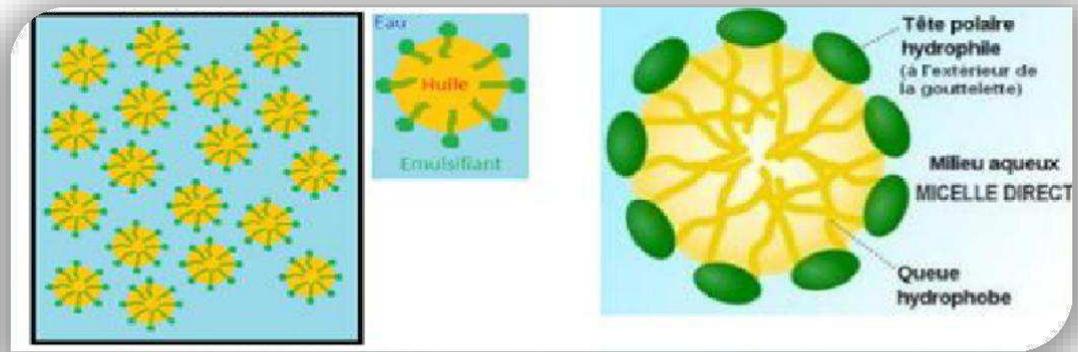


Figure II. 7 : Nanoémulsion Huile dans Eau[75].

- a) **Nanoémulsion inverse** : (notée E/H pour Eau dans Huile) dans laquelle les gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse. (Figure II. 8)

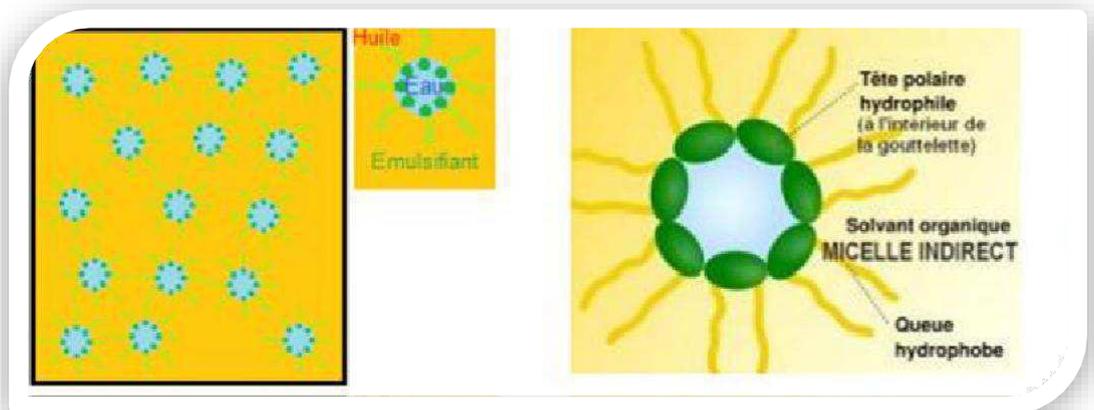


Figure II. 8: Nanoémulsion Eau dans Huile[75].

II.4.2. Nanoémulsions multiples :

Il s'agit d'émulsions ou de dispersion d'une émulsion dans une phase dispersante : [84]

- la dispersion d'une émulsion H/E dans une phase huileuse (H) donne une émulsion H/E/H (ou E/H/E).
- à l'inverse, la dispersion d'une émulsion E/H dans une phase aqueuse (E) donne une émulsion E/H/E.

Ces deux exemples correspondent au cas le plus simple d'émulsions multiples : les Émulsions doubles (Figure II.9).

On y distingue trois phases : interne / intermédiaire et externe ; Les sphères formées par la phase intermédiaire sont généralement qualifiées de globules, dispersés dans

Chapitre II : Nanoémulsions

La phase externe, et les sphères de phase interne sont appelées gouttelettes. Cette distinction n'existe pas pour les émulsions simples pour lesquelles les sphères de phase dispersée sont appelées indifféremment gouttelettes ou globules. La **Figure II.10** présente une microphotographie d'émulsion H/E/H.

Chaque phase peut contenir des ingrédients actifs différents, ce qui permet la présence d'actifs incompatibles, l'un en phase interne, l'autre en phase externe. Ce type d'émulsion permet aussi de protéger un principe actif contenu dans l'eau interne ou l'huile interne ou, plus généralement, de séparer des ingrédients solubles mais ne devant pas être en contact dans la même phase[75].

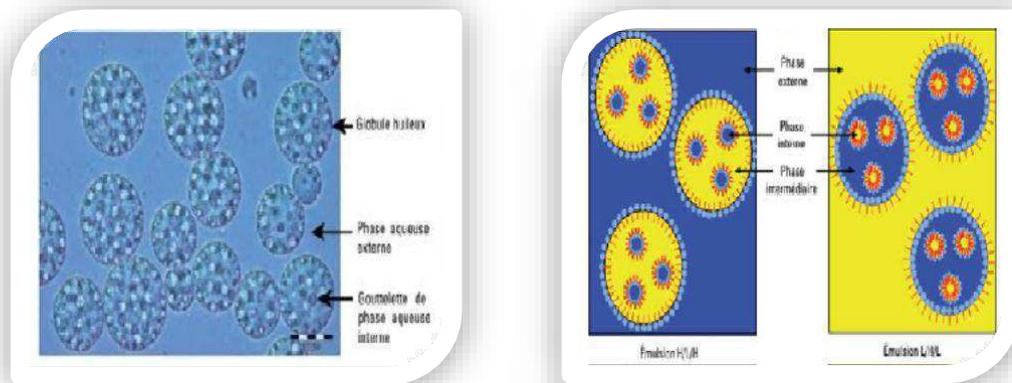


Figure II.10 : Emulsion E/H/E observée au microscope optique a contraste de phase[75].

II.5. Avantages et inconvénients des nanoémulsions:

II.5.1 .Avantages :

- ✓ les NEs sont des systèmes poly-phasiques hors équilibre thermodynamique, elles montrent une stabilité cinétique plus importante par rapport les macroémulsions, cela lui donne une résistance à la majorité des mécanismes de déstabilisation.
- ✓ Les NEs sont transparentes ou translucides, c'est à cause de la taille des gouttelettes qui est plus petite que la longueur d'onde du spectre visible (400 - 800 nm) de façon que la diffusion de la lumière devienne extrêmement faible. Pour cela la taille de gouttelettes doit être de l'ordre de 60 nm ou moins pour permettre une diffusion isotrope de la lumière.
- ✓ Elles sont stables contre la coalescence grâce à la pression de Laplace très élevée dans les petites gouttelettes qui résistent à la déformation lors de leur collision,

Chapitre II : Nanoémulsions

Mais sont moins stables contre la floculation grâce à la prédominance du mouvement brownien.

- ✓ Les nanoémulsions peuvent être formulées dans diverses formulations telles que des mousses, des crèmes, des liquides et des aérosols, ainsi utile dans le masquage de goût et aide à solubiliser le médicament lipophile.
- ✓ La très petite taille des gouttelettes entraîne une réduction importante de la force de gravité et le mouvement brownien peut être suffisant pour surmonter la gravité. Cela signifie qu'aucun crémage ni sédimentation ne se produit pendant le stockage.
- ✓ L'utilisation de nanoémulsions permet de réduire la quantité de tensioactif nécessaire et la très faible taille des gouttelettes permet une amélioration de leur stabilité physique ainsi qu'une augmentation de la surface de contact favorisant l'efficacité des principes actifs.
- ✓ Enfin, les nanoémulsions ont également la capacité de solubiliser des principes actifs hydrophiles et hydrophobes, ce qui permet d'améliorer le taux d'absorption et la biodisponibilité d'un médicament.[85,88]

II.5.2. inconvénients :

Bien que les nanoémulsions possèdent de nombreux avantages, il est également important d'avoir connaissance des potentiels inconvénients qui sont principalement liés à la très faible taille des gouttelettes à savoir :

- ✓ Leur grande aire interfaciale augmente les risques de réaction de dégradation chimique pouvant se produire à l'interface.
- ✓ Les nanoémulsions étant transparentes, elles peuvent être facilement traversées par la lumière UV et ainsi être dégradées.
- ✓ La préparation d'une nanoémulsion nécessite dans de nombreux cas, des techniques spéciales telles que l'homogénéisateur à HP, le microfluidiseur et les ultrasons qui n'ont été rendues disponibles que récemment.
- ✓ La stabilité des NEs est sensible aux conditions environnementales telles que la température et le pH.
- ✓ Il y avait un manque de démonstration des avantages des NEs et leur utilisation en comparaison avec les systèmes de macroémulsions classiques.

Chapitre II : Nanoémulsions

- ✓ Il y a un manque de connaissances sur le mécanisme de mûrissement d'Ostwald, qui est le problème d'instabilité la plus sérieuse pour les NEs et les ingrédients qui peuvent être incorporés pour surmonter le mûrissement d'Ostwald.
- ✓ La crainte de l'introduction de nouveaux systèmes sans une évaluation complète des coûts et des avantages.[86,89]

Chapitre III

Les Patches transdermiques

III.1 .Introduction :

Les patchs transdermiques, sont des dispositifs qui servent à administrer une dose de médicaments, pour un effet local ou systémique, à travers la peau. 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 transport [90] .

III.2. Le Patch Transdermique :

Les dispositifs transdermiques sont des préparations pharmaceutiques souples, de dimensions variables, qui servent de support à une ou plusieurs substances actives. Placés sur la peau non lésée, ils sont destinés à libérer et diffuser une ou plusieurs substances actives dans la circulation générale après passage de la barrière cutanée. » [91].

Cette forme se différencie des autres formes cutanées par le lieu d'action du PA. En effet celui-ci atteindra la circulation générale et sera distribué dans tout l'organisme, permettant une action systémique contrairement aux autres formes cutanées ayant une action locale ou régionale comme les patchs cutanés.

Dans ce qui suit, il ne sera question uniquement que des patchs à visée systémique. Ainsi , le terme de « patch » seul sera exclusivement employé pour désigner cettedéfinition [92,93] .

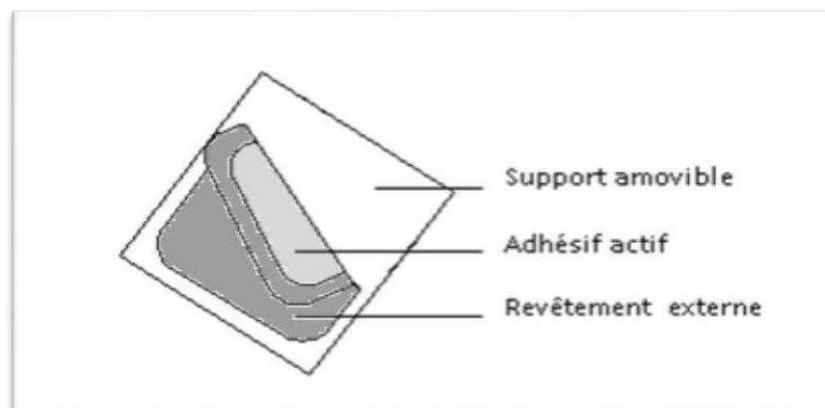


Figure III.1 : Schéma d'un patch transdermique de type adhésif actif [93].

III.3. La composition d'un patch transdermique :

Le dispositif transdermique peut inclure les composants suivants :

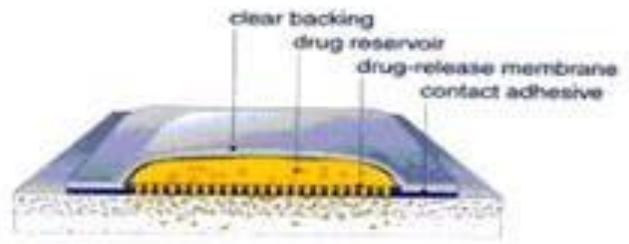


Figure III.2 : patch transdermique [94]

- Liner - Il protège le patch lorsque nous l'avons stocké pendant une longue période. Avant d'utiliser de la doublure du patch transdermique est retirée, par ex. Film de polyester.
- Médicament - La solution médicamenteuse est en contact direct avec le revêtement Antiadhésif , par ex. Nicotine et œstrogène.
- Adhésif - Il adhère les composants du patch et le patch à la peau, par ex. acrylates, silicones
- Membrane - Contrôle la libération du médicament du réservoir et des patchs multicouches.
- Sauvegarde -C'est un processus par lequel nous pouvons sauvegarder le patch de l'environnement extérieur. Ex : dérivés cellulosiques, alcool polyvinylique, caoutchouc polypropylène silicone.
- Amplificateurs de perméation - Une quantité contrôlée de médicament est libérée par l'utilisation de la perméation amplificateurs, par ex. terpènes, pyrrolidones, alcool, éthanol, tensioactifs comme le laurylsulfate de sodium, Pluronic F127 etc.[94,95].

III.4. Les différents types de systèmes transdermiques :

Les différents types de systèmes transdermiques se distinguent selon le positionnement de l'élément régulateur de la libération du PA. Tous ces types de patch rentrent néanmoins dans la catégorie des « systèmes à libération modifiée ». Les patchs peuvent contenir un ou plusieurs principes actifs.

D'autre part, la dose de PA est limitée par la taille du patch (en cm²)[96].

III.4.1. Adhésif médicamenteux monocouche :

Dans ce type, la couche adhésive contient le médicament et elle sert non seulement à faire adhérer les différentes couches ensemble mais avec la peau mais est également responsable de la libération de la drogue. Sur le côté extérieur de la couche adhésive, il y a une doublure de doublure temporaire et un support.

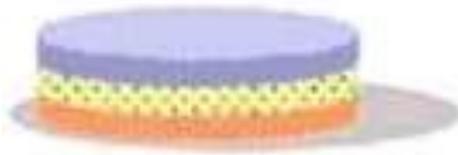


Figure III.3 : Adhésif médicamenteux monocouche [94].

III.4.2. Adhésif médicamenteux multicouche :

Il est similaire au système monocouche en ce sens que les deux couches adhésives sont également responsables de la libération du médicament. Le système multicouche est différent cependant qu'il ajoute une autre couche de médicament en adhésif, généralement séparé par une membrane (mais pas dans tous les cas). Ce patch aussi entouré d'une couche de doublure temporaire et d'un support permanent.

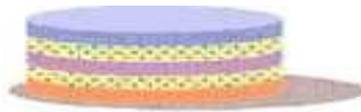


Figure III.4 : Adhésif médicamenteux multicouche [94].

III.4.3. Système de réservoir :

Dans ce système, le réservoir de médicament est intégré entre une couche de support imperméable et une membrane de contrôle. La membrane de contrôle du débit peut être microporeuse ou non poreuse uniquement qui peut libérer le médicament. Dans le compartiment réservoir de médicament, le médicament peut se présenter sous la forme d'une solution, suspension, gel ou dispersé dans une matrice polymère solide. Adhésif hypoallergénique le polymère peut être appliqué en tant que membrane polymère de surface externe qui est compatible avec le médicament.

Chapitre III : Les patchs transdermiques

Ce patch est soutenu par la couche de support. La cinétique d'ordre zéro est suivie par cette système.



Figure III.5 : Système de réservoir[94].

III.4.4. Système de micro-réservoir :

Dans ce type, le système d'administration de médicament est une combinaison de réservoir et de système matriciel. La drogue le réservoir est formée en suspendant le médicament dans une solution aqueuse de polymère soluble dans l'eau et puis dispersé la solution de manière homogène dans un polymère lipophile pour former des milliers de sphères microscopiques inaccessibles de réservoirs de médicaments. Cette thermodynamiquement instable la dispersion est stabilisée rapidement en réticulant immédiatement le polymère in situ en utilisant la réticulation agents de liaison.

III.4.5. Patch de vapeur :

Dans ce type de patch, la couche adhésive sert à faire adhérer les différentes couches entre elles mais aussi à libérer de la vapeur. Les patchs vapeur sont nouveaux sur le marché et libèrent des huiles essentielles jusqu'à 6 h.

Les huiles essentielles se dégagent de ce patch et elles ne sont utilisées qu'en cas de décongestion principalement.

Des patchs de contrôle de vapeur sont disponibles sur le marché qui améliore la qualité du sommeil. Vapeur des patchs qui réduisent la quantité de cigarettes que l'on fume en un mois sont également disponibles dans le marché.

III.4.6. Système matriciel :

- **Médicament dans le système adhésif :**

Dans ce type, le réservoir de médicament est formé en dispersant le médicament dans un polymère adhésif, puis en étalement du polymère adhésif médicamenteux par coulée au solvant ou fusion (dans le cas de colle thermo fusible adhésif) sur une couche de

Chapitre III : Les patchs transdermiques

support imperméable. Au-dessus du réservoir, polymère adhésif sans intermédiaire des couches sont appliquées à des fins de protection.



Figure III.6 : Médicament dans le système adhésif[94].

- **Système de dispersion matricielle :**

Dans ce type, le médicament est dispersé de manière homogène dans une matrice polymère hydrophile ou lipophile.

Ce disque polymère contenant un médicament est fixé sur une plaque de base occlusive dans un compartiment fabriqué à partir d'une couche de support imperméable aux médicaments. Au lieu d'appliquer l'adhésif sur le visage du réservoir de médicament, il est étalé le long de la circonférence pour former une bande de rebord adhésif [97-99].

III.5. Les Facteurs influençant les patchs transdermiques :

Il existe différents facteurs qui influent sur l'action de patchs transdermiques. Ceux-ci sont donnés ci-dessous :

- ✓ Propriétés physicochimiques
- ✓ Coefficient de partage
- ✓ Taille moléculaire
- ✓ Solubilité/point de fusion
- ✓ Ionisation
- ✓ Conditions physiologiques et pathologiques de la peau
- ✓ Effet réservoir de couche cornée
- ✓ Film lipidique
- ✓ Hydratation de la peau
- ✓ Température de la peau
- ✓ Variation régionale

Chapitre III : Les patchs transdermiques

- ✓ Lésions pathologiques de la peau
- ✓ Auto métabolisme cutané
- ✓ Propriétés de la barrière cutanée chez le nouveau-né et le jeune nourrisson
- ✓ Propriétés de la barrière cutanée dans la peau âgée
- ✓ Course
- ✓ Emplacement du corps
- ✓ Amplificateurs de pénétration utilisés[100,101].

III.6 Les avantages de l'administration transdermique par rapport aux autres systèmes d'administration sont les suivants :

Pour assurer une action efficace di patch, 10 règles principales doivent être respectées

1. Éviter le métabolisme de premier passage des médicaments.
2. Réduction de la concentration plasmatique des médicaments, avec moins d'effets secondaires.
3. Réduction des fluctuations des concentrations plasmatiques des médicaments, Utilisation de candidats-médicaments à demi-vie courte et à faible indice thérapeutique.
4. Elimination facile de l'administration du médicament en cas de toxicité.
5. Réduction de la fréquence de dosage et amélioration de l'observance du traitement par le patient.
6. Les médicaments transdermiques administrent une perfusion régulière d'un médicament sur une longue période de temps. Effets néfastes
7. L'administration transdermique peut augmenter la valeur thérapeutique de nombreux médicaments en évitant des problèmes spécifiques associés au médicament. Irritation gastro-intestinale, absorption plus faible, décomposition due à l'effet hépatique de premier passage.
8. En raison de l'avantage susmentionné, il est possible qu'un effet thérapeutique équivalent puisse être obtenu par l'administration transdermique d'une dose quotidienne de médicament inférieure à la dose nécessaire, si, par exemple, le médicament est administré par voie orale.
9. Le régime médicamenteux simplifié améliore l'observance du traitement par le patient et réduit la variabilité entre les patients et à l'intérieur d'un même patient [102-105] .

III.7. Mise en garde du système d'administration transdermique

Avec tous les avantages de ces systèmes, certaines précautions sont à prendre en considération

- 1.** Risques de réactions allergiques sur le site d'application comme des démangeaisons, des éruptions cutanées, un œdème local, etc.
- 2.** Une plus grande taille moléculaire du médicament (au-dessus de 1000) crée difficulté d'absorption.
- 3.** La fonction barrière de la peau varie d'un site à personne identique ou différente.
- 4.** Le médicament à caractère hydrophile est moins approprié car comparer au médicament à caractère lipophile en raison de leur faible perméabilité [**101, 106, 107**].

Deuxième partie

Expérimentale

Chapitre IV

Matériel et Méthodes

Introduction :

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Génie Chimique du département de Génie des procédés, à la Faculté de Technologie de l'Université Saad Dahlab Blida 1. Ce dernier est une des espèces de la famille des Lamiacées : le *Teucrium polium L.* L'objectif principal de cette présente étude est d'identifier les compositions chimiques et d'évaluer les activités biologiques et thérapeutiques.

Pour atteindre notre objectif, nous avons structuré notre partie pratique comme suit :

- ✓ Extraction des composés actifs de la partie aérienne de l'espèce végétale par macération à froid
- ✓ Détermination des activités biologiques des extraits issus de cette plante ; à savoir
 - l'activité antibactériennes vis-à-vis de quelques souches bactériennes par la méthode de diffusion sur milieu gélosé et détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI.
 - L'activité antioxydante de l'extrait par la méthode de DPPH
- ✓ Formulation des nanoémulsions pour encapsulation des extraits et caractérisations.
- ✓ Elaboration d'un patch dermique et détermination de ses caractéristiques.

La figure ci-dessous schématise l'organigramme des étapes opératoires

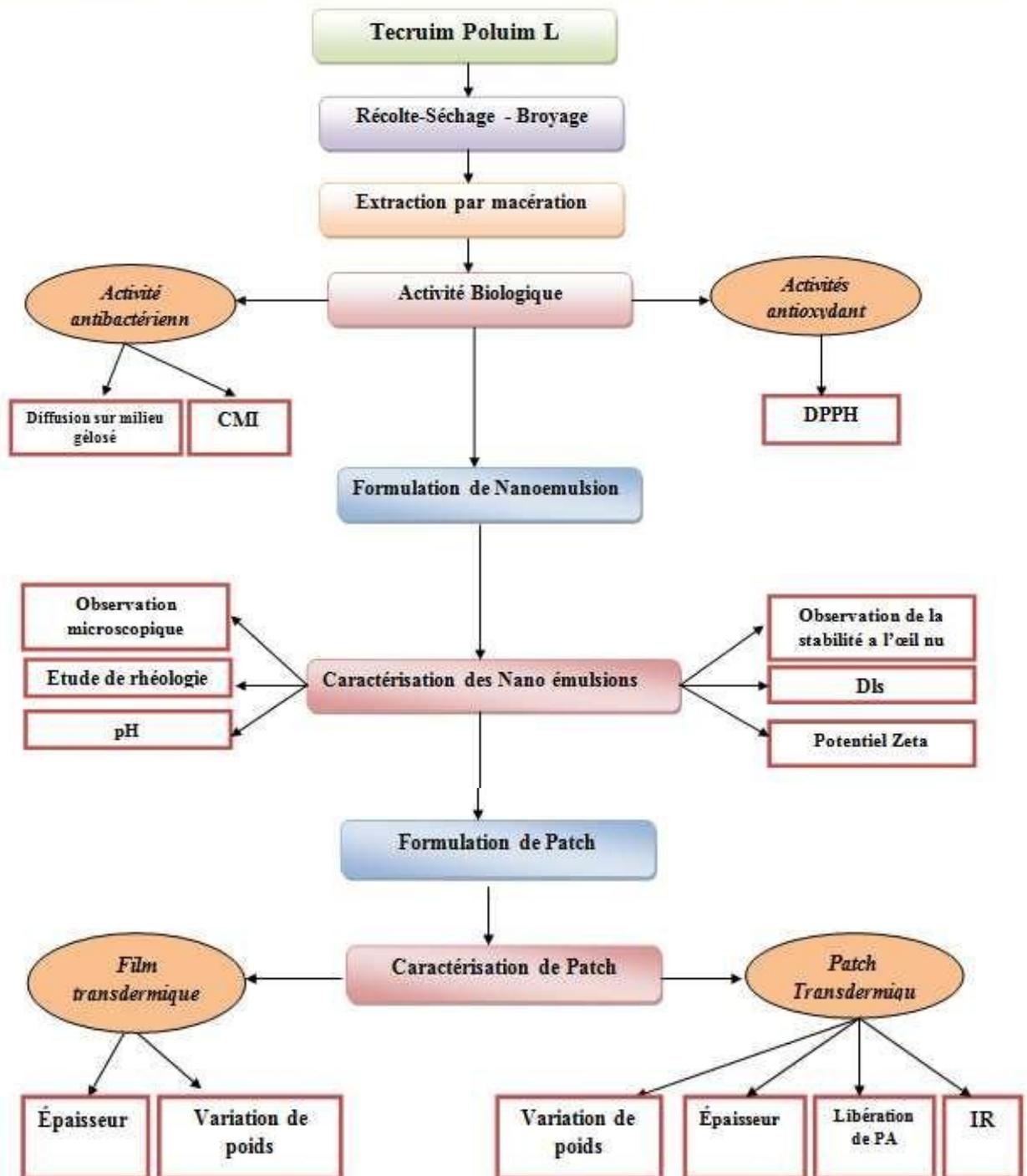


Figure IV .1 : organigramme de la partie expérimentale.

IV .1. Matériel végétal :

IV .1.1. La récolte de la plante :

Les parties aériennes (fleur, feuilles et tiges) de *Teucrium polium L* (Lamiacée) ont été recueillies dans la région de Dirrah (Bouira). La récolte de la plante choisie a été effectuée pendant le mois de Mai 2020. La figure ci-dessous illustre la localisation de la région de récolte.



Figure IV .2 : Une image de Google de la région de Dirrah (Bouira).

IV .1.2. Préparation des échantillons :

Le matériel végétal récolté a été trié, séché à l'air libre, à l'ombre, à l'abri de la lumière et de l'humidité à température ambiante (16-20°C) pendant une quinzaine de jours. Une fois séchées, les parties aériennes de la plante ont été broyées en poudre fine à l'aide d'un broyeur à couteau. Le broyat obtenu a été ensuite conservé soigneusement et stocké dans des sacs propres à l'obscurité et à température ambiante jusqu'à l'utilisation.

IV .2. Extraction par macération :

La macération est une méthode traditionnelle et couramment employée. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation. Cette procédure, malgré les temps longs d'extraction et l'utilisation d'une quantité considérable de solvants, est relativement peu coûteuse. En plus, elle se déroule à température ambiante, ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules sensibles à la chaleur[108,109].

❖ Protocole expérimental :

Une quantité de 50 g de la poudre végétale de la partie aérienne (Feuilles, Tiges, et Fleurs) a été mélangé avec 500 mL d'éthanol (96%) dans un Bécher. Le ratio solide : liquide est 1/10 (mg / mL).

Le mélange est maintenu sous une agitation magnétique pendant 6 h à l'air ambiant. La solution obtenue est ensuite filtrée sur papier filtre (Wattman N°1 de diamètre 0.2 µm) sous vide.

Le filtrat a été ensuite récupéré, l'EtOH est concentré sous vide à 60 °C à l'aide d'un rotavapeur (HAHNVAPOR HS-2005 V-N), l'extrait sec a été ensuite récupéré dans des boîtes de pétries, pesé, étiqueté et conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.



Figure IV .3 : Dispositif d'extraction par macération
1/Extraction–2/Filtration – 3/évaporation

IV.3. Calcul du rendement :

Le rendement d'une extraction se calcule par le rapport entre la masse de l'extrait obtenu et la masse de la matière première végétale traitée. Ce rendement est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = M_{ext}/M_{ech} * 100$$

M ext: la masse de l'extrait après évaporation du solvant en g.

M ech : la masse de l'échantillon végétal en g.

IV.4. Caractérisation :

IV.4.1. Criblage phytochimique :

Le screening chimique d'une drogue végétale représente toujours la première étape de l'étude chimique et permet d'orienter les recherches ultérieures.

Les techniques de détection utilisables pour un "screening" des substances actives doivent être rapides, simples et sensibles afin de ne mettre en œuvre qu'une faible quantité de matière végétale. Ces méthodes sont donc limitées à la détection de quelques groupes chimiques. Les tests phytochimiques sont basés sur des essais de solubilité, de réactions de coloration et de précipitation ainsi que sur des examens en lumière ultra violette [110] ou moins spécifiques à chaque classe de principes actifs.

Deux solvants de polarités différentes ont été utilisés (Eau, EtOH)[111].

IV.4.1.1. L'épuisement du matériel végétal avec l'eau :

Une quantité de 10 g du matériel végétal est mise en contact avec 200 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer, l'ensemble est agité pendant deux heures à l'air ambiant, le mélange est filtré et l'extrait aqueux est soumis aux différents tests[111].

IV.4.1.2. L'épuisement du matériel végétal avec l'EtOH :

Une quantité de 10g du matériel végétal est mise en contact avec 200 ml d'EtOH dans un bécher, l'ensemble est agité pendant deux heures à l'air ambiant, le mélange est filtré, et l'extrait éthanolique est soumis aux différents tests[111].

IV.4.1.3. Tests chimiques d'identification :

On procède aux tests chimiques d'identification, selon les méthodes décrites dans [112] de la manière suivante:

a. Saponosides :

La détection des saponosides est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 20 minutes [112]. La formation d'une mousse (hauteur supérieure à 1 cm) stable, persistant pendant 1 h indique la présence abondante de saponines [113,114]. La teneur en saponosides est évaluée selon les critères 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. Alcaloïdes :

Macération en milieu alcalin : Une quantité de 3 mg du matériel végétal est mise dans un bécher de 50 ml avec 15 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) (10%), l'ensemble est porté sur un agitateur pendant 3h. Ensuite, le mélange est filtré et le filtrat réparti dans trois tubes.

-Dans le premier tube, 1ml de filtrat plus 5 gouttes du réactif de Mayer, un test positif est révélé par l'apparition d'un précipité blanc-jaunâtre [111].

-Dans le deuxième tube, 1 ml de filtrat plus 5 gouttes du réactif de Bouchardât. S'il apparait un précipité brun, donc on est en présence d'alcaloïdes [115].

-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 [116].

c. Anthraquinones libres (Réaction de Borntrager) :

On ajoute 2,5 ml d'une solution de l'ammoniaque (NH₄OH) (20 %), à 5 ml de l'extrait éthanolique ou aqueux puis agiter. L'apparition d'une coloration plus ou moins rouge indique la présence des anthraquinones libres [33].

d. Terpénoïdes (Test de Slakowski) :

A 1 ml de l'extrait éthanolique ou aqueux, on ajoute 0,4 ml de chloroforme (CHCl₃) et 0.6 ml de H₂SO₄ concentré. La présence des terpénoïdes est mise en évidence par l'apparition d'un anneau marron à l'interphase[33].

e. Flavonoïdes :

La réaction de détection des flavonoïdes consiste à traiter 2,5 ml de l'extrait éthanolique avec 0.5 ml d'HCl concentré et quelques copeaux de magnésium (Mg). La présence des flavonoïdes est mise en évidence si la couleur rose ou rouge se développe après 3 min[33].

f. Tanins :

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1ml de l'extrait éthanolique, 2 ml d'eau et entre 2 à 3 gouttes de solution de Chlorure de fer (FeCl₃) diluée à 1%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire (Tanins galliques), vert ou bleu-verte (Tanins catéchiques)[115].

g. Composés réducteurs :

La détection des composés réducteurs consiste à traiter 1ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge brique[116].

h. Composés phénoliques :

Un volume de 10 ml de chlorure d'hydrogène (HCl) est ajouté à 10 ml d'infusé éthanolique. Un test positif est révélé par la coloration rouge en présence de polyphénols[33].

i. Quinones

1g de poudre végétale est macéré dans 30ml d'éther éthylique pendant 24H, après filtration, on ajoute quelques gouttes de soude (NaOH) 1N. Le virage de la phase aqueuse eau rouge indique la présence de quinones[110].

IV .5. Evaluation des activités biologiques :

IV .5.1. Activité antibactérienne :

C'est une méthode de mesure in-vitro, du pouvoir antibactérien des composés. La technique utilisée est celle du contact direct qui compte deux méthodes, la méthode des puits et la méthode de diffusion. Nous avons adopté la dernière, qui est une méthode classique, mais toujours d'actualité puisqu'elle est encore utilisée fréquemment dans les laboratoires de bactériologie pour la mesure du pouvoir antibactérien des antibiotiques de synthèse [117].

Cette étude a été effectuée au laboratoire de microbiologie du département Génie des procédés sur les souches bactériennes pathogènes suivantes (**Tableau IV.1**)

Tableau IV.1 : Souches bactériennes sélectionnées.

| Souche | Groupe | Code ATCC |
|-------------------------------|------------------|-----------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Gram négatif (-) | 9027 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Gram positif (+) | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Gram positif (+) | 6633 |

IV .5.1.1. Technique de diffusion sur milieu gélosé (Antibiogramme) :

Le principe de cette méthode, consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour d'une source d'antibiotique déposée à la surface de la gélose. La sensibilité des souches aux extraits de la plante a été réalisée par la technique, in vitro, de diffusion en milieu gélosé, ou méthode des disques [118]. Cette technique consiste à introduire le germe que l'on veut étudier à la surface du milieu gélosé (Muller Hinton), contenu dans des boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm puis, on applique des disques imprégnés de substance chimique que l'on veut tester. On aperçoit les substances diffusées dans la gélose avec une forme circulaire. Après 18-24 heures, les disques apparaissent entourés d'une zone d'inhibition [119].

IV .5.1.2. Stérilisation du matériel :

L'eau distillée, les tubes à essai utilisés dans la préparation des suspensions bactériennes (Inoculum) ainsi que dans la préparation des dilutions de nos échantillons, ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

IV .5.1.3. Préparation de l'inoculum :

Pour préparer l'inoculum, des échantillons de 3 à 5 colonies bien isolées parfaitement identiques ont été prélevés à l'aide d'une pipette pasteur puis transférés dans des tubes stériles contenant 20 ml de gélose nutritive inclinée.

A l'aide d'un vortex, la suspension bactérienne est secouée pendant 15 -30 secondes jusqu'à ce que la suspension soit homogène, Les bactéries ont été conservées dans des tubes stériles pendant 18 h à 37 °C.

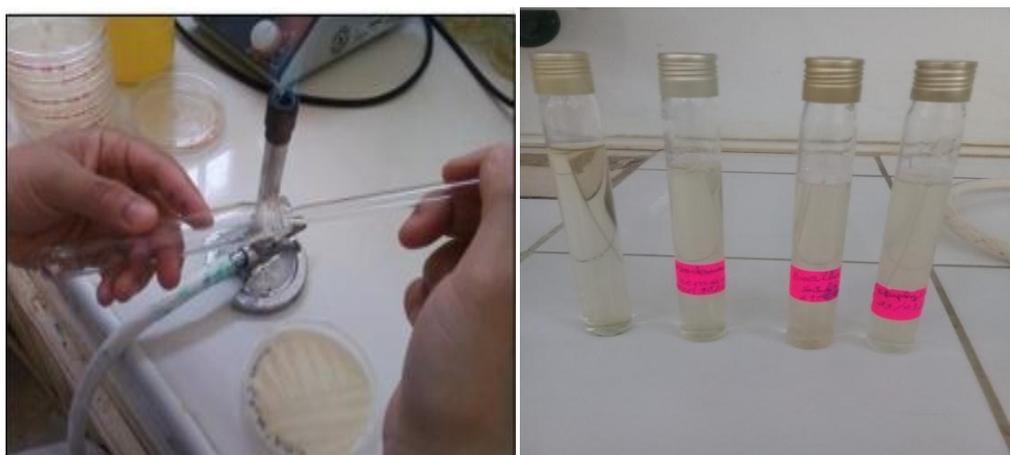


Figure IV .4 : Préparation de l'inoculum

IV .5.1.4. Préparation des dilutions des extraits :

La solution mère a été préparée par la dissolution de 2,5 mg d'extrait dans 10 ml de DMSO dans un tube à essai stérile. Les tubes ont été énergétiquement agités au vortex jusqu'à ce que la solution préparée devienne homogène.

Pour l'extrait éthanoïque, une solution mère à 250µg/ml est obtenue. Cette solution mère est diluée progressivement dans le DMSO afin de préparer une gamme de solutions ayant des concentrations de 2,5 ; 4 ; 5 ; 6,5 ; 8,5 ; 12,5 ; 16 ; 25 ; 31 et 62µg/ml. La solution mère et les solutions diluées seront ensuite utilisées pour l'évaluation de leurs activités antibactériennes.

IV .5.1.5. Test de sensibilité à l'extrait éthanolique : test d'inhibition.

A. Préparation des boîtes de gélose :

➤ **Préparation en zone stérile**, les consignes suivantes ont été prises en compte :

- Désinfecter la paillasse à l'eau de javel diluée
- Utiliser un bec benzène pour réaliser une zone stérile.

➤ **Fusion de la gélose :**

- Réchauffer le contenu des bouteilles de Mueller Hinton au bain marie. Remuer régulièrement pour homogénéiser.

➤ **Couler la gélose dans les boîtes :**

Couler la gélose (Mueller Hinton) dans les boîtes de Pétri stériles organisées dans la zone stérile limitée aux 20 cm autour du bec (15 ml par boîte). Laisser refroidir avec couvercle entre ouvert pour éliminer la vapeur d'eau pendant 20 minutes. Une fois solidifiées, les boîtes de gélose peuvent être stockées quelques jours au réfrigérateur (couvercle vers le bas).

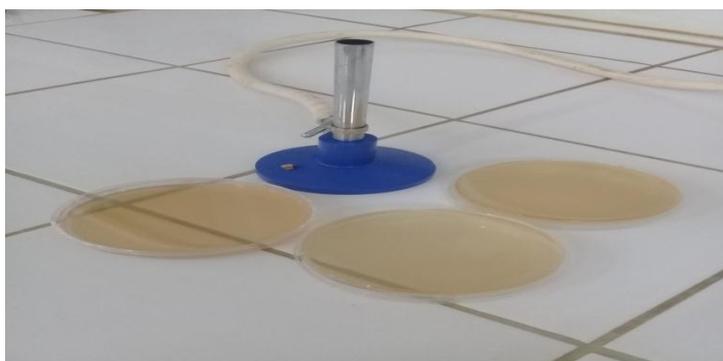


Figure IV .5 : Coulage des boîtes de pétries

B. Ensemencement, Dépôt des échantillons et incubation :

Des boîtes de pétri stériles, préalablement coulées, sontensemencées par étalage de 1 ml de suspension bactérienne de 10^8 UFC/ml (Unité Faisant Colonie) à l'aide d'un écouvillon sur toute la surface de gélose Mueller Hinton. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. A l'aide d'une pince stérile, les disques stériles de 6 mm de diamètre contenant le produit à tester des concentrations croissantes 2,5; 4; 5 ;6,5 ;8,5;12,5 ;16 ; 25 ; 31 et 62 μ g/ml et ont été placés à la surface du milieu solidifié. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées dans une étuve à 37°C pendant 48 h.

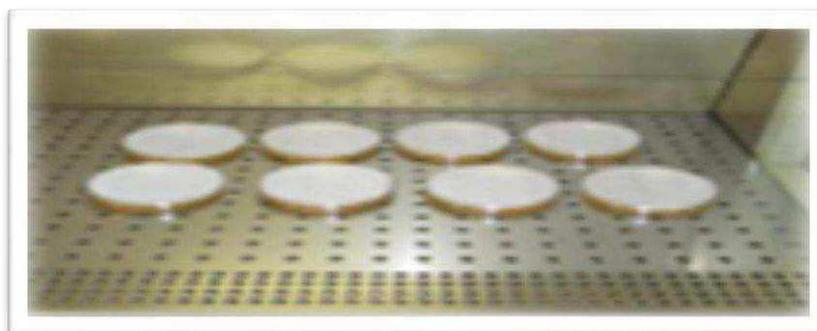


Figure IV .6 : Incubation

Les extraits préparés ont été dilués dans le DMSO, ce choix a été fait, parce que ce dernier est le solvant préconisé par la majorité des auteurs qui ont prouvé qu'il n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.

C. Lecture :

Après la culture, la lecture s'effectue en mesurant sur chaque disque le diamètre d'inhibition du principe actif. Cette distance millimétrique est ensuite reportée sur l'échelle de concordance afin que la souche soit interprétée sensible, intermédiaire ou résistante vis-à-vis du principe actif étudié [120].

La sensibilité des différentes souches vis-à-vis de l'extrait étudié est classée selon le diamètre d'inhibition et selon les critères suivants[121,122] :

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

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

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

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

Les bactéries montrant une sensibilité aux extraits, seront sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Plus la zone d'inhibition mesurée est grande, plus le germe est sensible.

IV .5.1.6. Test de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme.

Ce test a été réalisé pour étudier l'antibiogramme standard des germes utilisés et le comparer avec l'effet de notre extrait brut.

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques est appréciée selon le même protocole qu'avec les disques de papiers imprégnés d'extrait.

Les antibiotiques utilisés comme composés de référence sont : Gentamycine et Tétracycline.

IV .5.1.7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices : (CMI)

Afin de tester l'activité antibactérienne d'extraits de *T.polium* ; une série de dilutions contient 10 tubes avec le milieu de culture liquide ont été préparé, le premier tube contenant 4ml et les 9 autres 2ml de la solution de culture, une série de dilution a été réalisée pour l'extrait testé, la gamme de concentrations est indiquée dans le tableau :

Tableau IV.2 : Gamme de concentration d'extraits de *T.polium*.

| N° de tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------------------|----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
| La concentration UI/ml | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.13 | 1.6 | 0.8 | 0.4 | 0.2 | 0.1 | Témoin |

Enfin, 100 UI/ml de culture est ajoutée à 2ml des différentes concentrations ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

La figure ci-dessous illustre les étapes de la méthode par dilution.

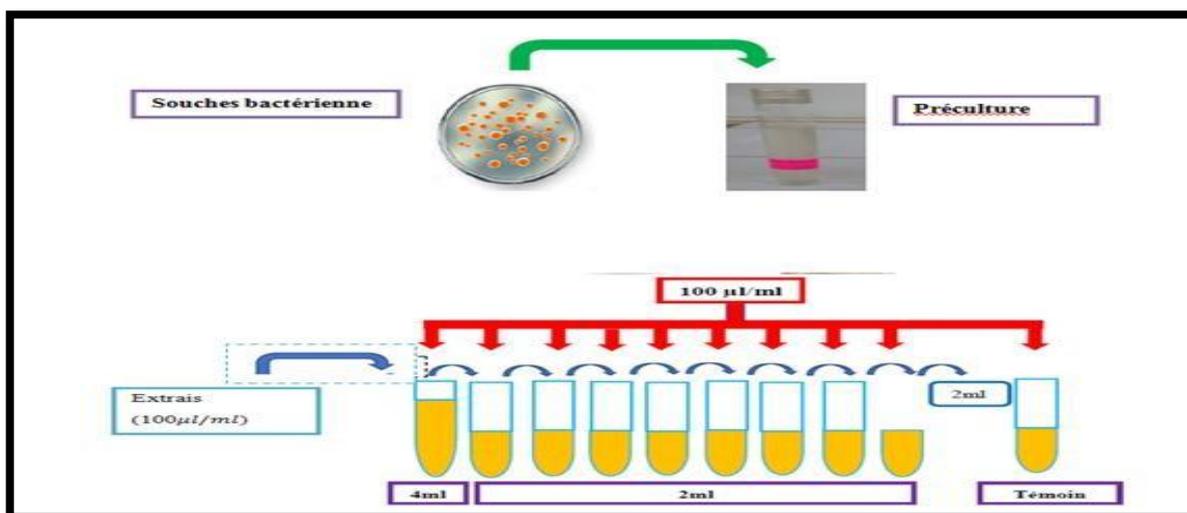


Figure IV.7 : représentation graphique de la méthode de dilution d'extrait testée.

IV .5.1.8. Lectures des résultats :

Les résultats de la concentration minimale inhibitrice sont déterminés directement à partir des tubes pour lesquels il n'y a pas croissance visible après 24 h d'incubation.

IV .5.2 Activité antioxydante :

IV. 5.2.1 Evaluation de l'activité antioxyante :

Plusieurs méthodes sont disponibles pour évaluer *in vitro*, l'activité antioxydante des extraits des composés phénoliques, 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. La méthode du piégeage du radical libre DPPH(2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) est la plus simple à réaliser [123].Le DPPH est largement employé pour évaluer le balayage de divers produits naturels et il est considéré comme un composé modèle pour les radicaux libres de ces produits.

Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du pouvoir antioxydant des extraits naturels de la partie aérienne de la plante *Teucrium polium L.*

IV .5.2.2 Estimation du pouvoir antiradicalaire (DPPH•):

Principe : Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine (DPPH•) est un radical organique libre, stable et de couleur rouge pourpre. En présence de composés anti radicalaires, le radical DPPH• est traduit et change de couleur en virant au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance[124]. Le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la forme libre en solution dépend de la nature, de la concentration et de la puissance de la substance anti radicalaire[125].On peut résumer cette réaction par l'équation suivante :



Où (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH. (violet) pour le transformer en molécule DPPH-H [126].

Le (DPPH•) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante, en raison de sa stabilité en forme radical libre et la

simplicité de l'analyse (**Figure IV.8**). Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm [127].

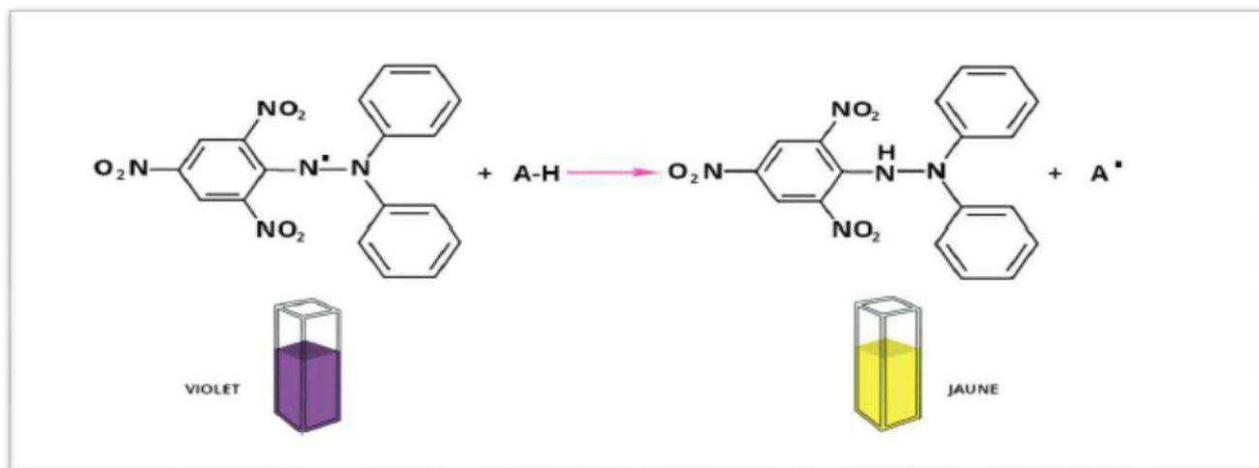


Figure IV .8: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant.

IV .5.2.3. Protocole expérimental :

A. Préparation de la solution du DPPH:

On introduit 0,004 g de DPPH dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète avec du méthanol.

B. La préparation de la solution mère de C= 0.4 mg /ml :

On met 10 mg de l'extrait dans 25 ml de méthanol sous agitation modérée jusqu'à sa solubilité totale ensuite on filtre la solution obtenue.

C. Préparation des solutions diluées :

Une série de solutions filles ont été préparées par dilutions de volumes précis prélevés de la solution mère

D. Préparation des échantillons :

Selon le protocole décrit par [128] avec quelques modifications. 1 ml de différentes concentrations de l'extrait (0.1 ; 0.15 ; 0.2 ; 0.25 ; 0.3 et 0.4 mg/ml) ont été ajoutés à 2ml du DPPH.

E. Préparation des blancs :

Le contrôle négatif (témoin) est préparé en mélangeant 1 ml de méthanol avec 4ml de la solution de DPPH.

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

La lecture de l'absorbance est faite contre le blanc (méthanol) pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

Le contrôle positif (référence) est présenté par la solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque témoin et à différentes concentrations (0.01, 0.012, 0.014, 0.025 et 0.03).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition et calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule suivante :

$$PI\% = \frac{(Abscontrôle - Abséchant)}{Abscontrôle} * 100$$

L'étude de la variation de l'activité anti radicalaire en fonction de la concentration des extraits, permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI50), une faible valeur de la CI50 correspondant à une grande efficacité de l'extrait.

Le calcul des IC50 a été réalisé graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés ; pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. La valeur de la CI50 est exprimée en µg/ml (3 répétitions pour chaque concentration).

IV .6. Formulation des nanoémulsions :

L'émulsion E /H préparée par mélange de la phase aqueuse 30%(V/V) et la phase huileuse 70% (V/V).

La phase huileuse contient l'huile oléique et le span80 (10 V/V). Le mélange est chauffé à 40°C en utilisant l'agitateur magnétique à 350 tr/min pendant 20min.

La phase aqueuse contenant l'extrait (6% P/V) dissous dans l'eau en utilisant un agitateur magnétique à 350 tr/min pendant 10-15min jusqu'à dissolution complète de la poudre. Les émulsions E/H ont été préparées en mélangeant la phase aqueuse et la phase huileuse en utilisant un agitateur magnétique à 350tr/min pendant 10min.

IV .7. Caractérisation des nanoémulsions :

IV .7.1. Observations macroscopiques :

Les émulsions formulées ont été observées à l'œil nu. Les paramètres suivants ont été suivis au cours du temps : le crémage, floculation, la couleur, l'odeur et la consistance.

IV .7.2 Mesure de la distribution de taille des nanoémulsion par DLS :

Principe :

Dans une suspension donnée, les particules sont en mouvement constant, aléatoire, indépendamment les unes des autres (mouvements Browniens). Lorsqu'elles diffusent la lumière, certains faisceaux diffusés par des particules différentes a instant donné peuvent s'additionner ou s'annuler (phénomènes d'interférences), conduisant ainsi à des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée totale au cours du temps. Dans la technique de DLS, ces fluctuations sont mesurées sur une période de temps donnée, par un compteur de photons. Elles sont directement liées au taux de diffusion des particules, lui-même dépendant de leur rayon hydrodynamique. Ces mesures permettent donc d'accéder directement à la taille des particules dans la suspension analysée.

Les instruments de DLS sont constitués de plusieurs modules en séries :

- 1) Une source laser, émettant une lumière monochrome constante de longueur d'onde égale à 250 nm, qui vient frapper l'échantillon contenu dans une cuve d'analyse ;
- 2) Des détecteurs repartis à différents angles autour de l'échantillon, permettant de récupérer les photons diffusés par les particules qu'il contient ;
- 3) Un analyseur d'intensité associé a une interface informatique, qui effectue le traitement du signal détecte et permet de déterminer la distribution de tailles des particules contenues dans l'échantillon.

Compte tenu de la longueur d'onde du laser, cette technique est particulièrement adaptée pour l'analyse des NP, dont les tailles attendues sont généralement inférieures à 250 nm, et qui diffusent donc la lumière dans toutes les directions, améliorant ainsi la détection et la précision de mesure sur la taille.

Protocole d'analyse :

On prépare une dilution de 1ml de la formulation dans 2ml d'éthanol.

En utilisant les paramètres suivants :

- ✓ température d'analyse = 25°C (pièce et instrument thermostats) ;
- ✓ nombre d'acquisitions par échantillon = 3 ;
- ✓ durée des acquisitions = 5 secondes.

Pour chaque échantillon analyse, le diamètre des particules, les histogrammes de dispersion de tailles (intensité en fonction du diamètre) et le pourcentage de polydispersité (%Pd) ont été vérifiés. Les conditions de dispersion donnant les diamètres les plus petites possibles et les suspensions les plus homogènes ont été retenues pour la suite de l'étude.

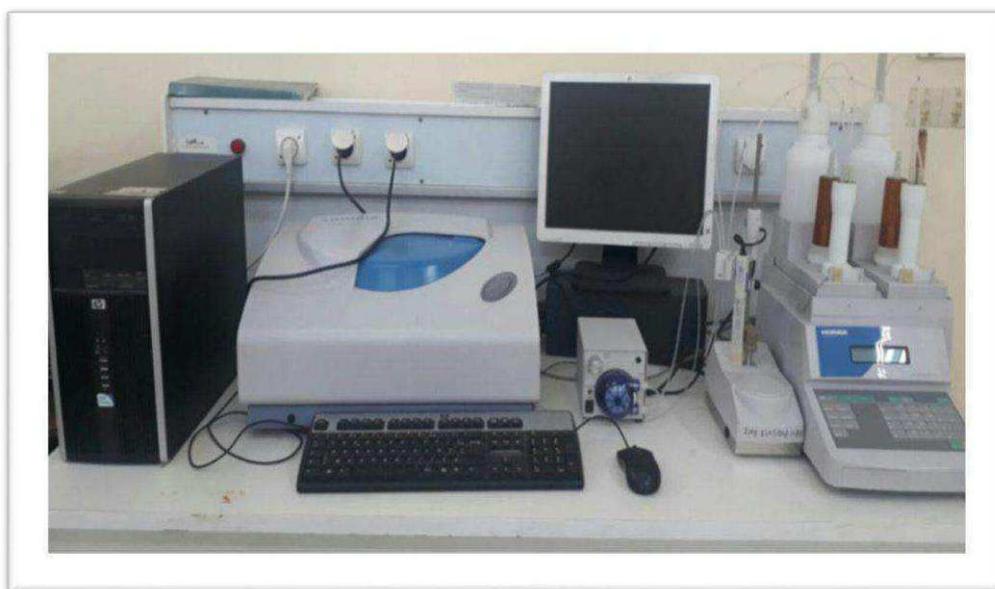


Figure IV .9: Le granulomètre Laser Horiba

IV .7.3. Mesure du potentiel Zêta :

a) Principe :

Le potentiel Zêta est un indicateur très important de la stabilité d'un système dispersé, Il est utilisé pour mesurer la charge à la surface d'une gouttelette en nanoémulsion[129]négative ou positive. Une valeur absolue élevée indique que les gouttelettes sont suffisamment dispersées. L'appareil «HORIBA» que nous avons employé pour mesurer ce potentiel utilise la technique de micro électrophorèse capillaire. Un champ électrique est appliqué à la cellule contenant l'échantillon pour mettre les particules en mouvement.

b) Technique :

La mesure de potentiel zêta par cette technique nécessite de manipuler avec une dispersion très diluée (0.01%) pour acquérir une bonne qualité de signal. L'échantillon est préparé en milieu dilué en dispersant directement 1 ml de NE dans 2ml de l'éthanol à un pH et force ionique souhaités. Les valeurs présentées dans le manuscrit correspondent à une valeur moyenne calculée pour trois prélèvements avec 3 mesures par prélèvement, ce qui assure une mesure significative.



Figure IV .10: La cellule du Zêta mètre

IV .7.4. Observations microscopiques :

Les observations microscopiques ont été effectuées avec un microscope binoculaire de marque OPTIKA pour observer la taille et la dispersion des gouttelettes, d'observer leur forme, de déterminer l'état d'agrégation, et d'identifier certaines formes d'instabilités.



Figure IV .11: Microscope binoculaire de marque OPTIKA

IV .7.5. Etude de la rhéologique :

L'écoulement le plus simple est celui des fluides Newtoniens où la contrainte varie linéairement avec le gradient de cisaillement. Cependant, la majorité des fluides, dont les dispersions, présentent des comportements non Newtoniens plus complexes. Ces comportements sont souvent l'indication des interactions entre particules qui se développent au sein des dispersions. Des mesures de viscosité sous cisaillement et de viscoélasticité pour quantifier le changement de comportement d'un état liquide vers un état de gel ont été réalisées.

IV .7.5.1. Viscosité d'une dispersion :

La viscosité d'une dispersion peut être influencée par la taille des particules, leur distribution granulométrique, la fraction volumique ou l'état d'agrégation. Dans cette partie, les relations pour des sphères dures non déformables et non agrégées sont discutées. La présence d'une particule au sein d'un fluide provoque une perturbation des champs de vitesses par rapport à un fluide sans particules. La viscosité apparente d'une dispersion est proportionnelle à la concentration en particules et peut être exprimée sous la forme $\eta=f(\Phi)$. De nombreux modèles empiriques tels que les modèles de Quemada ou Krieger-Dougherty sont proposés dans la littérature pour établir une relation entre la viscosité et la concentration en particules des dispersions[130,131].

IV .7.5.2. Dispositif de mesure :

a) Critères de choix de mesures :

En rhéomètre rotatif, le fluide est soumis à un cisaillement entre deux surfaces, l'une en rotation sur son axe (le rotor) et l'autre immobile (le stator). Ces surfaces peuvent être de géométries différentes : la géométrie plan-plan, cône-plan ou bien encore, à cylindres coaxiaux (plus communément appelés géométrie Couette). Les grandeurs rhéologiques accessibles sont d'une part la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ déterminé à partir de la géométrie de la surface et de la vitesse de rotation, et d'autre part, la contrainte de cisaillement σ mesurée à partir du couple à appliquer pour maintenir le mouvement du rotor. Ces deux grandeurs permettent d'établir le rhéogramme $\sigma=f(\dot{\gamma})$, justifiant l'écoulement du matériau.

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

Des mesures ont été effectuées sur un rhéomètre MCR302 avec une géométrie cône-plan (un diamètre de 60 mm, un angle de 1° à $T^\circ 20^\circ\text{C}$) pour les dispersions qui sont très visqueuses et les gels

b) Technique de mesure

La dispersion est déposée sur le plan fixe et le cône mobile est en mouvement à une vitesse de descente constante afin d'avoir un étalement identique quel que soit l'échantillon. Le comportement rhéologique dépend fortement de l'agrégation des particules et des contacts qui les connectent. Dans le cas d'une dispersion stable, les particules ne sont pas agrégées, il n'y a pas de résistance au cisaillement et nous obtenons un comportement newtonien. Mais la majorité des fluides, comme les dispersions, se comportent comme des fluides dits non-Newtoniens dépendant de la vitesse de cisaillement. Les deux comportements les plus courants sont [130] :

- **Rhéofluidifiant**: la viscosité décroît lorsque le cisaillement augmente. Les dispersions se présentent souvent comme des fluides rhéofluidifiants : les particules s'organisent sous l'effet de l'écoulement et le cisaillement par des forces hydrodynamiques qui peuvent causer la rupture d'agrégats.
- **Rhéopaississant** : la viscosité augmente lorsque le cisaillement augmente.

Ce caractère est moins marqué pour les dispersions : lorsque ces dernières sont très concentrées, l'augmentation du cisaillement entraîne un désordre dans la dispersion et une réorganisation causant l'augmentation de la viscosité.

IV .7.5.3. Viscoélasticité du milieu

Les propriétés d'écoulement des gels colloïdaux et notamment la viscoélasticité sont utilisées pour évaluer si la dispersion est à l'état liquide ou à l'état de gel (viscoélastique) mais aussi pour caractériser les forces inter-particulaires et la nature du réseau formé par les particules.

IV .7.5.4. Mesure en écoulement dynamique :

L'échantillon est déformé sinusoïdalement, la méthode consiste à appliquer une déformation γ de 0,001% à 1000 % à une vitesse angulaire ω constante de 10 rad/s et à mesurer la variation du module élastique G' et du module visqueux G'' .

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

Pour analyser la réponse de l'échantillon soumis à la déformation γ , le signal est décomposé en deux oscillations, l'une en phase permettant de calculer G' et l'autre en déphasage pour G'' pour une fréquence ω . Par la suite, nous pouvons écrire l'expression de la contrainte, ici notée τ [130,132].

Mise en place de l'échantillon

- On relève la tête du rhéomètre, à l'aide d'une spatule non métallique et on place l'échantillon sur le plateau du rhéomètre directement sous le mobile.
- On abaisse la tête du rhéomètre sur l'échantillon. L'indicateur à cadran doit indiquer le même écart établi.
- On coupe l'échantillon en excès à partir du bord avec une spatule non métallique et on attend 5 minutes ou plus pour permettre à l'échantillon de se réchauffer
- On mesure et on enregistre en mode Piloté par un logiciel (Rheo3000).

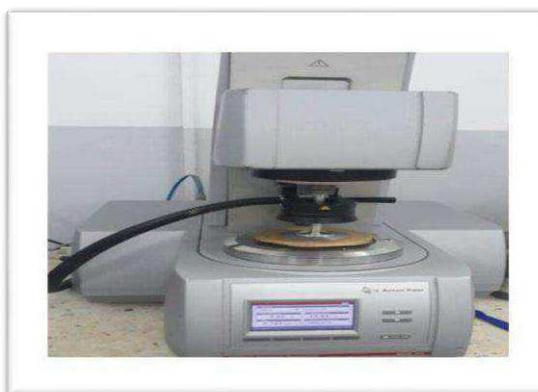


Figure IV .12: Le Rhéomètre utilisé.

IV .7.6. Mesure du pH :

La mesure du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre muni d'une électrode en verre plongée dans la solution à contrôler à température ambiante. L'appareil renvoie une valeur comprise entre 0 et 7 dans le cas de solution acide, et entre 7 et 14 dans le cas de solutions alcalines. Les électrodes doivent être contrôlées et calibrées régulièrement à l'aide de solutions tampons de pH connu.

IV .8. Elaboration de patch dermique :

Afin d'appliquer les extraits de cette espèce végétale en tant que principe actif, on a opté pour la préparation d'une forme galénique d'administration le patch transdermique.

IV .8.1. Les polymères utilisés :

- **Polyvinyl alcool (PVA)** dont les propriétés sont :
 - Soluble dans l'eau
 - Excellentes propriétés filmogènes et adhésives
 - Non toxique et biocompatible [133].
- **Ethyle cellulose (EC)** :
 - Matériau non toxique, non irritant et non allergique.
 - Bonnes propriétés filmogènes qui forment des films plus résistants[134].

IV .8. 2. Préparation des patchs transdermiques :

Les patchs transdermiques contenant de NES étaient préparés par la technique d'évaporation de solvant [135]. Le mélange support a été coulé en versant un 2% (m/V) solution d'alcool polyvinylique (PVA) suivi de séchage à 60 ° C pendant 6 h. Le réservoir de médicaments est préparé en dissolvant EC dans l'éthanol et le Glycérol 15%(p /p) comme plastifiant.

Le principe actif 50 mg dans 5 ml d'éthanol a été ajouté dans la dispersion homogène sous agitation lente avec un agitateur magnétique.

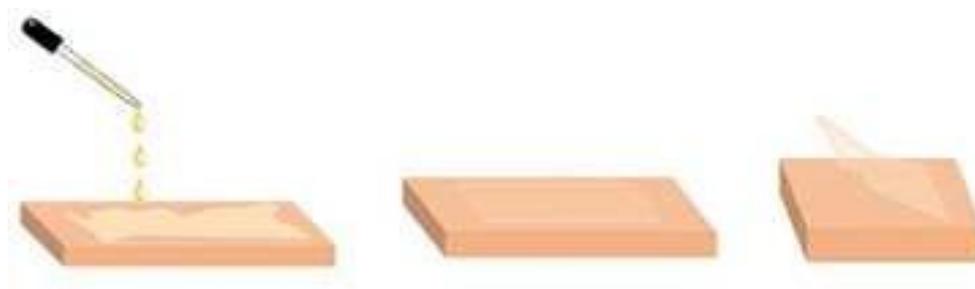


Figure IV.12 : a) Coulée de la solution ;b) formation d'un film transparent

c) décollement du film après thérapie.

IV .9.Caractérisations du Patch :

IV.9.1. Caractérisation physico-chimique : Les patchs élaborés ont été caractérisés par détermination de certaines propriétés à savoir :

IV .9.1.1. Épaisseur :

L'épaisseur des patchs a été mesurée à trois différents endroits à l'aide d'un micromètre [136] et les valeurs moyennes ont été calculées.

IV .9.1.2. Variation de poids :

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

IV .9.1.3. Pliage d'endurance :

Déterminé en pliant à plusieurs reprises un film au même endroit jusqu'à ce qu'il se brise. 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 [137].

IV.9.2. Caractérisation spectroscopique :

On a réalisé cette analyse pour identifier les groupements fonctionnels présents dans notre film et aussi sur le patch. Pour se faire, on a déposé des deux échantillons sur le support qui est spécifique pour les films du spectrophotomètre FTIR à l'aide d'une spatule et on lance l'analyse.

IV.10. Cinétique de libération du principe actif :

Contenu du médicament :

Des patchs de surface spécifiée (1 cm²) ont été portés à 10 ml avec un tampon phosphate pH 5,4. Un blanc a été préparé en utilisant un patch sans médicament traité de manière similaire. Les solutions ont été filtrées à travers une Seraing à filtre, diluées de manière appropriée et l'absorbance a été lue à 210 nm dans un spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau.

Chapitre V

Résultats et discussion

V. Résultats et discussion :

V.1. Rendement d'extraits de *teucrium polium L* :

L'extraction est réalisée par la méthode de macération qui a donné lieu à un extrait de couleur vert-foncé avec une très forte et persistante odeur.

Calcul de rendement :

$$\text{Rd} = \frac{m_{\text{exp}}}{m_{\text{the}}} \times 100$$

| |
|-------------------|
| Rd= 20,6 % |
|-------------------|

Le rendement de la partie aérienne de *Teucrium polium L* est de l'ordre de 20,6 %, ce résultat est satisfaisant et comparable à ceux trouvés dans les travaux précédents[138].

D'une manière générale, les rendements des extraits sont dépendants du type de solvant utilisé (la méthode d'extraction) ainsi que de l'origine de la plante et la taille de l'échantillon étudié, ainsi que de la présence de substances interférentes [139]. Donc la technique d'extraction est une étape très importante dans la libération et la récupération des composés phytochimiques existants dans le matériel végétal [140].

V.2. Etude phytochimique :

Le criblage phytochimique préliminaire montre que l'extrait éthanolique de *Teucrium polium L* contient plusieurs composés chimiques comme les tanins, les saponosides et les terpénoïde qui sont en quantités plus importantes, d'autre part, les quinones et les alcaloïdes existent en quantités moyennes, et pour les composés réducteurs sont présentes en faibles quantités.

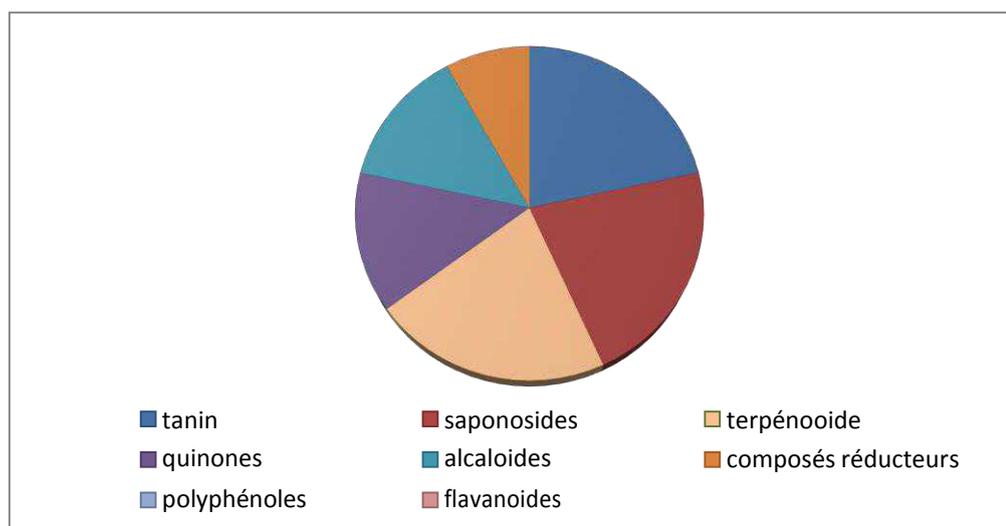


Figure V.1' : Diagramme circulaire sur les caractéristiques phytochimiques.

De façon générale, notre étude vient de confirmer le travail de Y BELLIK, SM HAMMOUDI et al [141] qui ont montrés que *T. polium* est riche en divers métabolites secondaires comme : tanins, saponosides, huiles essentielles, alcaloïdes, anthraquinones libre. Cette richesse explique l'intérêt et l'attention particulière portée par les chercheurs, à travers les études scientifiques.

La présence des terpenoides possède des propriétés anti inflammatoire [13],antiseptiques[116],effet anticancéreux et cytotoxique[142], la richesse saponosides de cette plante pourrait expliquer ses actions hémolytique, molluscicide, anti-inflammatoire, antibactérienne et antiparasitaire, cytotoxique et anti tumorale[143], antibiotiques[116], les tanins ramolliraient la gencive, ils ont aussi des propriétés hémostatiques et astringentes prononcés qui hâtent la guérison des blessures et des muqueuses enflammées [144], ils ont aussi reconnus pour leur propriétés antioxydants[145] , la présence d'alcaloïde explique le rôle anesthésiant local des cette plante[143] les quinones constituent un groupe de substance biologiquement très actives , ils ont aussi des fongicides[110] .

V.3. Activités Biologiques :

V.3.1. Évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait *teucrium pollium* par la méthode de l'antibiogramme :

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. L'extrait est

Chapitre V: Résultats et discussion

considéré comme bactéricide si aucune colonie n'est observée dans la zone d'inhibition. Par contre, il est caractérisé de bactériostatique quand quelques colonies sont présentes même en densité faible.

Les résultats montrent que les réponses sont très variables en fonction de la souche testée, du type d'extrait et de la concentration utilisée. Ils sont donnés dans le tableau V.1 et les figures V.1, V.2, et V.3.

Dans le tableau ci-après :

D : diamètre de la zone d'inhibition ; **S** : Sensibilité ; **-** : Résistante ; **+** : Sensible ; **++** : Très sensible.

L'activité antibactérienne s'est manifestée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques imprégnés d'extrait éthanolique et représentée dans les figures ci-dessous.

Tableau V.1 : Activité antibactérienne d'extrait *T. polium*.

| Diamètre des zones d'inhibition (mm) et sensibilité des souches bactériennes | | | | | | | |
|---|------------------|-----------------------|----------|-------------------|----------|-----------------|----------|
| | | <u>Staphylococcus</u> | | <u>Psodomonas</u> | | <u>Bacillus</u> | |
| | C (µg/ml) | D | S | D | S | D | S |
| Extraits <u><i>T. polium</i></u> | C1= 63 | 10 | + | 8 | - | 00 | / |
| | C2= 31 | 00 | / | 11 | + | 00 | / |
| | C3=25 | 9 | + | 12 | + | 00 | / |
| | C4=16 | 12 | + | 7 | - | 12 | + |
| | C5=13 | 14 | + | 9 | + | 13 | + |
| | C6=8 | 8 | - | 8 | - | 10 | + |
| | C7=6 | 12 | + | 14 | + | 14 | + |
| | C8=5 | 11 | + | 8 | - | 11 | + |
| | C9=4 | 10 | + | 9 | + | 12 | + |
| | C10= 3 | 8 | - | 8 | - | 12 | + |



Figure V.1: Activité de différentes concentrations d'extract sur *staphylococcus*



Figure V.2: Activité de différentes concentrations d'extract sur *psodomonas*

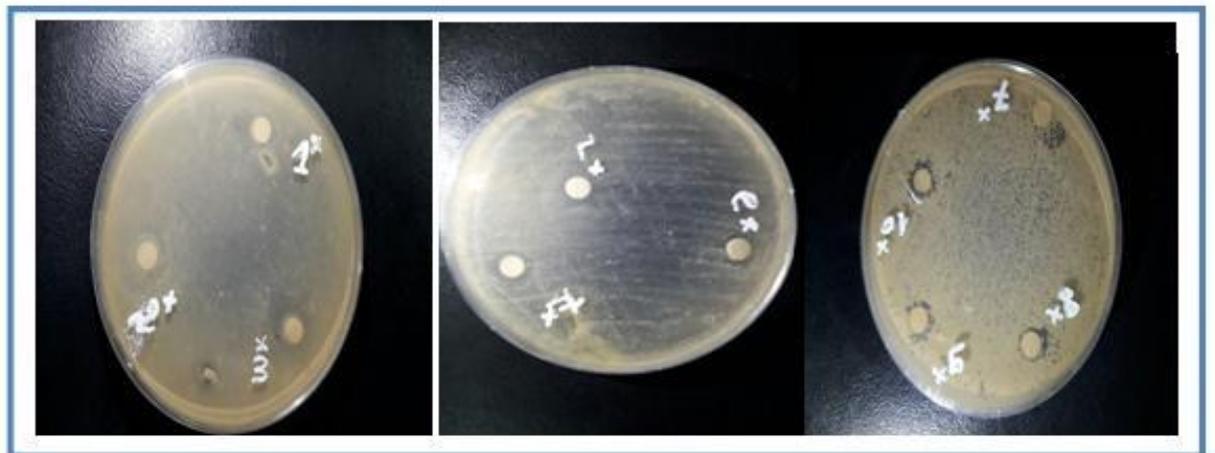


Figure V.3: Activité de différentes concentrations d'extract sur *Bacillus*

Chapitre V:Résultats et discussion

L'extrait *T.pollium* a montré le meilleur résultat sur *bacillus*, avec un diamètre élevé de la zone d'inhibition avec un diamètre de 14mm à 6 µg/ml. Il possède un large spectre d'inhibition puisque son effet inhibiteur couvre aussi bien les bactéries Gram positif que celles Gram négatif.

Les résultats les plus intéressants et les plus saillants ont été enregistrés sur *psodomonas* à 6µg/ml 14 mm, et sensibles pour les concentrations 63, 16, 8,5et 3 µg/ml, par contre pour *Staphylococcus*, un diamètre de14 mm à 13 µg/ml a été observé et s'avèrent sensibles pour les concentrations 8 et 3 µg/ml.

Tableau V.2 : Diamètres des zones d'inhibition en mm (moyenne ± écart-type) et sensibilité des souches microbiennes vis-à-vis des antibiotiques commercialisés.

| Antibiotiques utilisés | Psodomonas | | Bacillus | | Staphylococcus | |
|------------------------|------------|-----|------------|---|----------------|-----|
| | D | S | D | S | D | S |
| Gentamycine | 15,30±2,31 | ++ | 14,10±0,67 | + | 30,70±1,08 | +++ |
| Tétracycline | 30,01±1,27 | +++ | 16±1.23 | + | 31,90±0,53 | +++ |

+++ : Extrêmement sensible.

L'antibiogramme (**tableau V.2**) montre que toutes les souches bactériennes à l'exception de *bacillus*, sont très sensibles à extrêmement sensibles et dépassent, pour *S. aureus*, largement les résultats obtenus avec les autres extraits.

Pour *bacillus*, l'extrait éthanolique de *T.pollium* révèle un résultat (13,00±0,00) et (14,00±0,00) (voir **tableau V.1**) qui se rapproche le plus de celui exprimé par la *Gentamycine* (14,10±0,58),et pour *Psodomonas* l'extrait révèle un résultat (14,00±0,00) pour la concentration 6 µg/ml qui se rapproche le plus de celui exprimé par la *Gentamycine* (15,30±2,31).

Chapitre V:Résultats et discussion

- Vis-à-vis des bactéries à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosase* sont avérées les plus résistantes.
- La présence d'une zone d'inhibition bien appréciable autour des extraits testés permet de constater une activité relativement importante vis-à-vis des Cocci Gram + *Staphylococcus aureus* et *Bacille Gram -*.
- On peut dire que cette espèce de *Teucrium* est significativement sensible aux extraits avec des CMI extrêmement faibles montrant un effet *bactériostatique*.

- Les résultats obtenus par les travaux précédents[146]montrent une résistance envers *Pseudomonas* par contre dans d'autres travaux[147], sont actives sur *Pseudomonas* et d'autres bactéries.
- Les résultats rapportés par les chercheurs révèlent une activité antibactérienne des extraits de *Teucrium* [148].

L'activité antimicrobienne des produits naturels est expliquée par la présence de groupes d'hydroxyles phénoliques capables de former des liaisons hydrogènes avec les emplacements actifs des enzymes de la cellule ciblée. Le mode d'action des extraits dépend du type de microorganismes, du type d'extrait et de sa concentration. [149]

En général, les bactéries Gram(-) sont plus résistantes que les bactéries Gram(+) et ce grâce à la structure de leur membrane externe[17]. Plusieurs travaux ont confirmé la grande résistance des bactéries G- par rapport aux G+. Ce constat peut être dû à l'action de certains composés, d'une part et à la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries G- qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule entrante, d'autre part [150].

L'activité des principes actifs et des extraits végétaux peut dépendre de leur composition chimique. Elle peut être liée à la polarité des substances bioactives, aux conditions de séchage, de broyage de la plante[151]et dépend également de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principes actifs [152].

Par conséquent, il est suggéré que les extraits phénoliques soient utilisés comme source potentielle d'agents antibactériens naturels contre les bactéries multi-résistantes [153].

V.3.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice d'extraits de *T. pollium* :

La valeur de la CMI correspond à la première concentration qui inhibe la croissance bactérienne. L'inhibition de croissance se traduit par un éclaircissement de la couleur du milieu. Les figures (V.4 - V.6) montrent les résultats obtenus de l'activité antibactérienne de l'extrait sur les souches bactériennes après la période d'incubation.

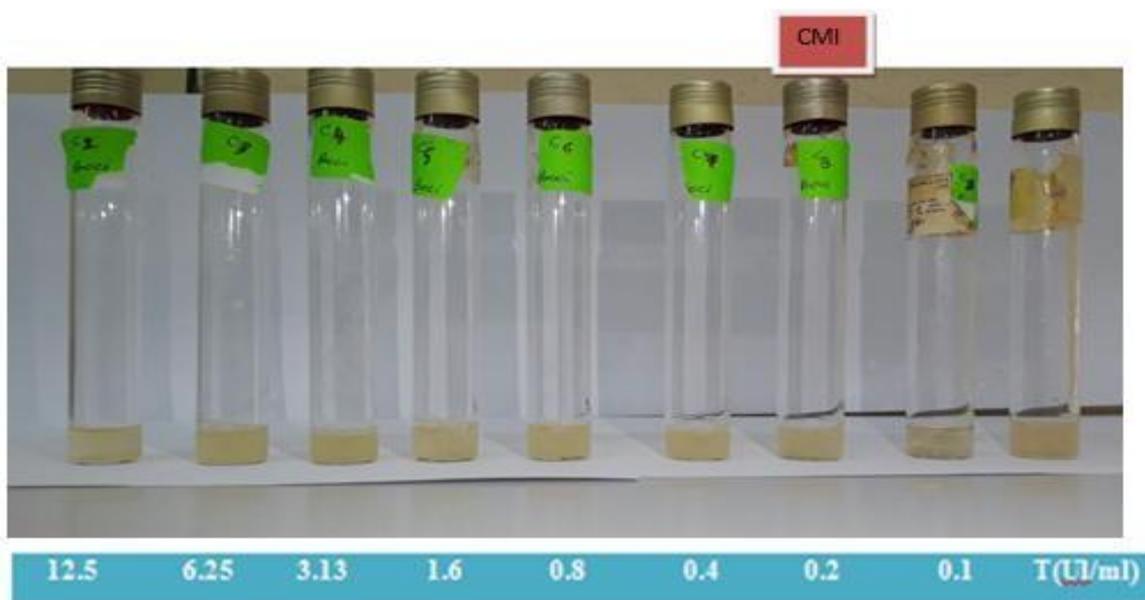


Figure V.4 : Résultat d'inhibition après 24h d'incubation d'extraits contre *Bacillus*.

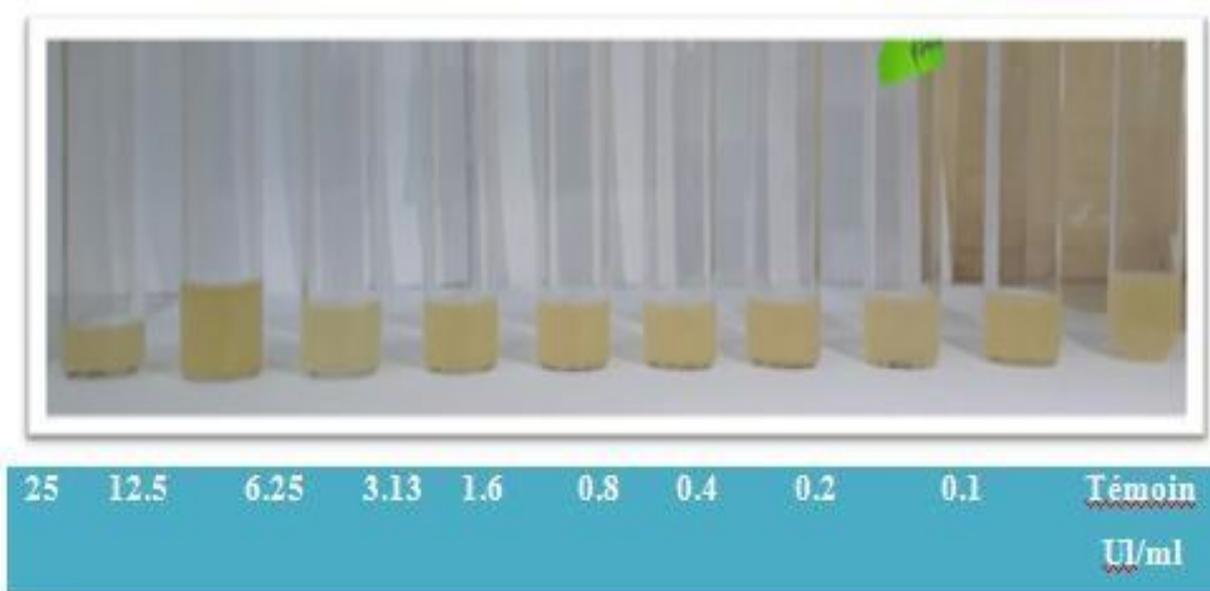


Figure V. 5: Résultat d'inhibition après 24h d'incubation d'extraits contre *P. aeruginosa*.

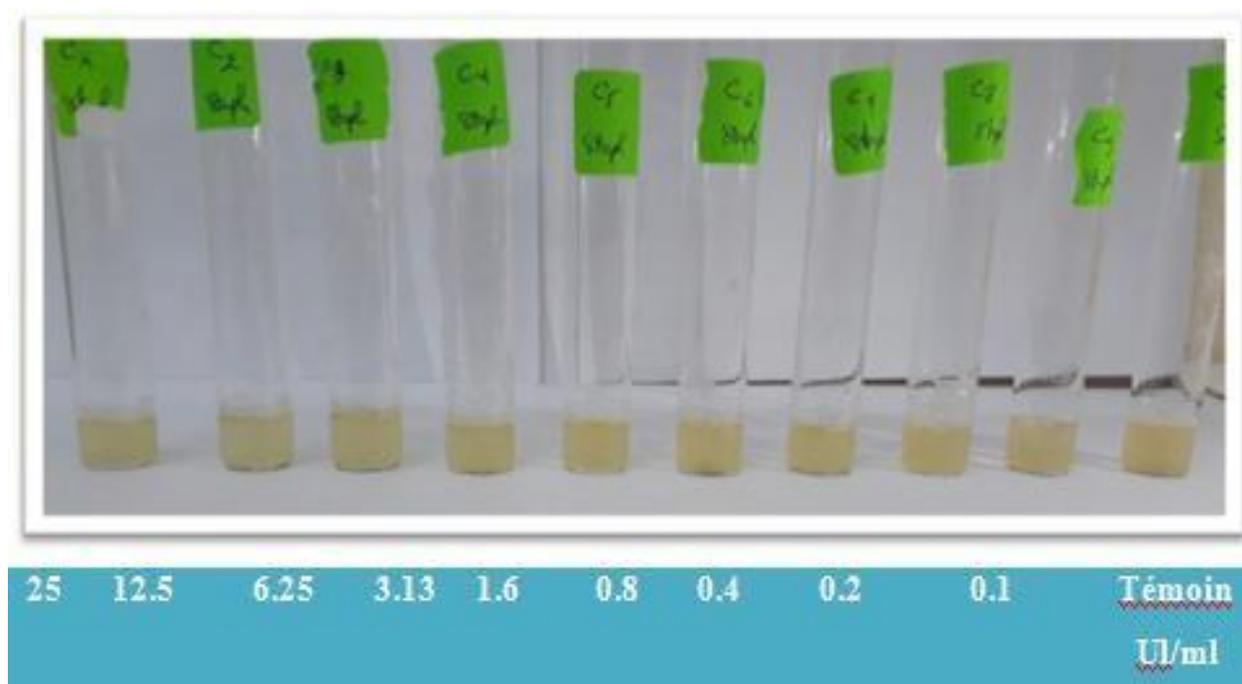


Figure V.6 : Résultat d'inhibition après 24h d'incubation d'extraits contre *S. aureus*.

L'évaluation des CMI de l'extrait de *T. polium* a donné une valeur de **0,2mg/ml** avec *b. subtilis* par contre aucune différence n'a été notée pour le reste des souches.

Selon les travaux antérieurs, l'activité antimicrobienne est considérée comme forte lors que les valeurs de CMI sont comprises entre 50 µg/ml et 500 µg/ml, modérée quand elles sont entre 600µg/ml et 1 500 µg/ml et faibles quand elles sont supérieures à 1500 µg/ml. En basant sur cette classification, les extraits éthanoliques de *Teucrium polium*L. semblent avoir une activité forte pour *bacillus* et faible sur les souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus*. [154]

V.3.3. Évaluation de l'activité anti oxydant de l'extrait *T.pollium* par la méthode DPPH :

Dans cette étude, la méthode choisie pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits préparés de cette plante, est le piégeage du radical libre DPPH car cette technique est reconnue comme étant simple, rapide et efficace, en raison de la grande stabilité du radical [155]. L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une

Chapitre V:Résultats et discussion

solution alcoolique de DPPH à 515 nm qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H, par les antioxydants présents dans l'extrait végétal [155, 156].

L'effet de piégeage des extraits sur le radical DPPH est exprimé en valeurs d'IC50 ($\mu\text{g/ml}$). On rappelle que l'IC50 représente la quantité de réactifs nécessaire à l'inhibition de la moitié de la quantité initiale de radicaux présents. En effet, la IC50 est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, plus cette valeur est basse, plus l'activité antioxydante est grande.

Cette concentration est calculée graphiquement par les régressions linéaires des tracés du pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations des échantillons testées.

Les résultats obtenus du test de mesure de l'absorbance du radical libre DPPH (**Tableau V.3 et V.4**) nous a permis de tracer l'histogramme de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de chaque extrait de la plante étudiée (**Figure V.7 et V.8**).

| C (mg/ml) | PI% |
|-----------|-------|
| 0 | 0 |
| 0,01 | 26,22 |
| 0,012 | 57,56 |
| 0,014 | 74,2 |
| 0,025 | 87,42 |
| 0,03 | 91,47 |

Tableau V.3 : représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'acide ascorbique.

| C (mg/ml) | PI% |
|-----------|-------|
| 0 | 0 |
| 10 | 27,77 |
| 15 | 35,99 |
| 20 | 46,45 |
| 25 | 65,87 |
| 30 | 74,84 |
| 40 | 83,93 |

Tableau V.4 : représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait éthanoïque.

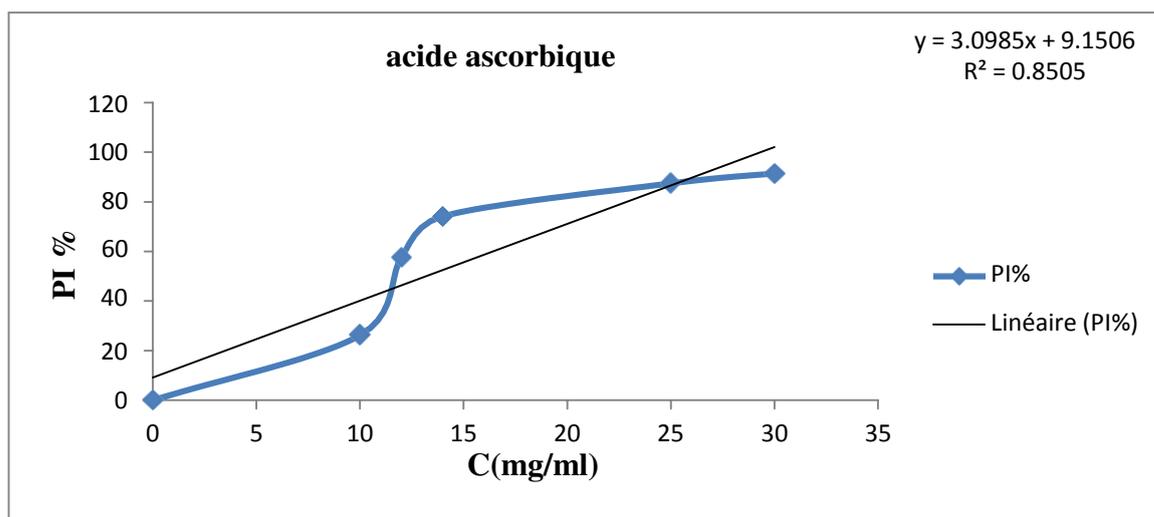


Figure V.7 : l'histogramme de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'acide ascorbique.

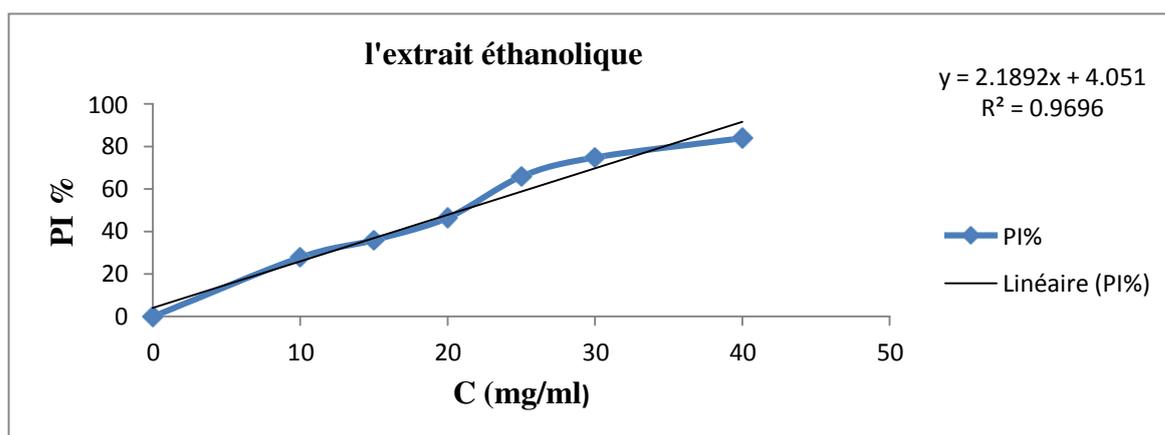


Figure V.8 : l'histogramme de variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration d'extrait éthanolique.

Tableau A : CI50 du test DPPH ($\mu\text{g/ml}$) des différents extraits

| Antioxydants | Valeur d'IC50 ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------------|------------------------------------|
| Acide ascorbique | 12 |
| Extrait éthanolique | 20 |

Chapitre V:Résultats et discussion

Les résultats semblent que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration pour l'acide ascorbique et pour l'extrait de *T.polium L.*

On remarque que le pourcentage d'inhibition du radical libre pour l'extrait est inférieur à celui de l'acide ascorbique pour la majorité des concentrations utilisées, mais reste la valeur de l'extrait éthanolique est proche de la valeur de l'acide ascorbique donc elle possède une activité antioxydante.

À la lumière de ces résultats, on constate que l'extrait de *Teucrium polium L* peut ramener le radical libre stable 2,2 diphenyl-1picrylhydrazyl (DPPH) au diphenyl-picrylhydrazine jaune-coloré avec un IC50 de 20 $\mu\text{g/ml}$ montrant une activité antioxydante inférieure à celle de l'acide ascorbique. Il semble d'après ces résultats que l'antioxydant le plus efficace avec un IC50 de 12 $\mu\text{g/ml}$ par rapport à l'extrait étudié.

Pour le *Teucrium polium geyrri*, le résultat trouvé est 19,46 $\mu\text{g/ml}$ [157], malgré que ce sont les mêmes espèces. D'autre part, à comparer avec d'autres espèces comme *Teucrium marum* (Lamiacée), et trouvent une valeur d'IC50 de 13,13 $\mu\text{g/ml}$ par[147]est inférieurs de nos résultats, ainsi que[158]qui obtient avec un IC50 de 58,6336 $\mu\text{g/ml}$ montrant une valeur supérieur à celle signalée dans notre étude.

D'une manière générale, notre espèce possède une activité antioxydante faible en comparaison avec celle de l'acide ascorbique qui est un antioxydant puissant.

En effet, dans ce sens et d'une manière générale, le pouvoir antioxydant est fortement tributaire de la concentration en composés phénoliques [159].

Ces données sont corroborées par les travaux de[160], qui ont montré une corrélation significative et positive entre les teneurs en composés phénoliques et l'activité antioxydante. Néanmoins dans le cas de nos résultats relatifs à l'activité anti radicalaire DPPH, cette relation n'est pas toujours évidente, puisqu'elle peut être non significative voire même négative dans certains cas. En effet, ils estiment que l'existence d'une synergie entre les différents composés phénoliques peut être déterminante dans la capacité antioxydante d'une plante donnée[161]. Ainsi cette activité ne dépend pas seulement de la teneur en polyphénols mais aussi de la structure et de l'interaction entre les différents composés [162, 163].

V. 4. Formulation de nanoémulsion :

Dans cette partie, on a réalisé plusieurs formulations avec différents protocoles dans les mêmes conditions opératoires :

Tableau V.5 : Compositions des formulations des nanoémulsions

| | | F1 | F2 | F3 | F4 |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Phase huileuse (70%) | Huile oléique (%) | 48 | 60 | 60 | 60 |
| | Span80 (%) | 22 | 05 | 10 | 10 |
| | Tween80 (%) | / | 05 | / | / |
| Phase aqueuse (30%) | Extrait (%) | 05 | 04 | 04 | 05 |
| | Eau (%) | 25 | 26 | 26 | 25 |

Les différentes préparations ont présenté les caractéristiques suivantes :

Tableau V.6 : Les caractéristiques des formulations des nanoémulsions

| Formulation | F1 | F2 | F3 | F4 |
|--------------------|--|---|---|--|
| Aspect | la formulation à un aspect très visqueux | l'émulsion à un aspect parfait, mais la taille à l'échelle macrométrique. | La texture observée après formulation ne correspond pas à celle d'une émulsion. | on a obtenu une émulsion d'une taille nanométrique avec une bonne texture. |

Chapitre V:Résultats et discussion

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| | | | | |
|--|--|--|--|--|

Compte tenu de ces résultats obtenus et présentés dans le **Tableau V.6** , la meilleure formulation est F4, elle a été adoptée adopté pour les prochaines étapes de notre étude.

V. 5. Caractérisation des nanoémulsions :

V .5.1 Observation des nanoémulsions à l'œil nu :

Dans cette partie, trois critères ont été considérés pour évaluer la qualité organoleptique de NE d'extraits *Teucruim pollium L* : l'aspect, la couleur, et l'odeur. (**Tableau V.7**)

Tableau V.7 : propriétés organoleptiques de NE :

| Caractéristiques organoleptiques | Nanoémulsion |
|----------------------------------|------------------------------------|
| Aspect | Visqueux avec l'absence de crémage |
| Couleur | vert jaunâtre |
| Odeur | Forte |

La stabilité des nanoémulsions retenues a été vérifiée en termes de leur apparence. Après plusieurs jours, les nanoémulsions laissées à l'air libre n'ont fait apparaître aucun changement de leurs aspects et sont restées toujours stables et homogènes.

En effet, les nanoémulsions contenant de grosses gouttelettes pourraient initialement se former, mais sont plutôt instables, entraînant la croissance des gouttelettes pendant une durée de stockage prolongée.

En effet, la floculation des gouttelettes apparaît chaque fois que les forces d'attraction nettes de la phase dispersée sont plus fortes que sa propre tension interfaciale

Chapitre V:Résultats et discussion

En conséquence, l'augmentation de la température de stockage des nanoémulsions provoque l'augmentation de l'agitation thermique des molécules[164] et la diminution aussi dans leur tension interfaciale.

Par conséquent, les NE thermodynamiques instables auraient tendance à augmenter leur diamètre de goutte pour réduire leur énergie libre totale. De même, [165] ont démontré que le stockage de 10 % de NE en phase dispersée à haute température ont généré de nouvelles populations de gouttelettes plus grosses après 15 jours de stockage. Cependant qu'en pratique, les nanoémulsions seraient généralement stockées à des températures modérées, et seraient donc plus stables qu'aux températures plus élevées.

V. 5.2. Mesure de la distribution de taille des nanoémulsions par Dls :

La dimension des particules de la phase dispersée conditionne la stabilité de la dispersion. En outre, la connaissance de la taille moyenne des particules peut aider à prévoir les tendances et les caractéristiques d'arrangement, donc savoir si les particules vont se disperser ou flocculer et par voie de conséquence utiliser d'autres alternatives, telle que l'homogénéisation, pour modifier la distribution des particules et pour améliorer, de ce fait, la qualité du produit, son efficacité, et sa stabilité. Sachant que plus, la taille des gouttelettes est petite, plus l'émulsion n'aura des chances d'être stable. Cependant, la taille des gouttelettes à lui seul n'est pas une garantie de la stabilité d'une émulsion.

La mesure de la taille des gouttelettes des émulsions préparées va nous permettre principalement à ce stade de connaître le type d'émulsion.

Tableau V.8 : les résultats des tailles de gouttelettes obtenus par Dls

| Diamètre (nm) | Pi |
|---------------|-------|
| 13,1 | 1,037 |
| 15,7 | 0,492 |
| 14,9 | 0,487 |

Myn= 14,56 nm

Chapitre V:Résultats et discussion

Les résultats obtenus dans le (**Tableau V.8**) sont en accord avec les données de la littérature, la taille nanométrique est confirmée avec un diamètre moyen des gouttelettes situé entre 10et 50 nm.

Par DLS a permis de déterminer non seulement la taille des particules, mais aussi le degré de stabilité et d'homogénéité dans les différents milieux, grâce au pourcentage de polydispersité (P_i). Dans notre cas le P_i est inférieurs à 1, ce qu'indique que notre distribution est monodispersée. (Voir **Annexe IV**)

V. 5.3. Mesure du potentiel Zéta :

Le potentiel zéta est un paramètre très important qui fournit des informations utiles sur la stabilité des nanoémulsions et peut donner des indications sur les phénomènes désagréables tels que la précipitation ou floculation.

Notre nanoémulsion a montré un potentiel zéta positif de valeur + 1.2 en raison de la charge positif libre. En effet, les différents excipients ont conféré à la gouttelette une charge nette positive. Cependant cette partie mérite d'être plus approfondie compte tenu de la complexité du système.

V. 5.4. Observations microscopiques :

Les images suivantes montrent l'aspect des dispersions mais à cette échelle, on ne peut pas prétendre que ce sont les gouttelettes de la nanoémulsion car l'observation à une échelle nanométrique nécessite des moyens plus sophistiqués tels que la microscopie électronique à transmission.



Figure V.9 : Photos obtenues au microscope optique (grossissement x1000).

V. 5.5. Analyse rhéologique :

Afin de mesure de la viscosité des nanoémulsions, on a eu recours à des analyses rhéologiques.

Une mesure de la viscosité, le suivi de son évolution dans le temps et l'examen de son comportement rhéologique, montre si l'émulsion est suffisamment visqueuse « collable » ou facile à étaler, selon l'usage envisagé [166, 167].

Il est clair que plus le fluide est épais, plus la viscosité est importante, plus il est liquide, plus la viscosité est faible. En générale, les émulsions les plus visqueuses ont tendance à avoir une meilleure stabilité dans le temps.

V.5.5.1. Test de viscoélasticité :

Pour déterminer les modules G' et G'' à basse fréquence caractéristiques d'émulsions, on établit la dépendance de ces modules en fonction du taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ (exprimée en s^{-1}). Les résultats en régime harmonique pour émulsion sont représentés sur la **Figure V.10**.

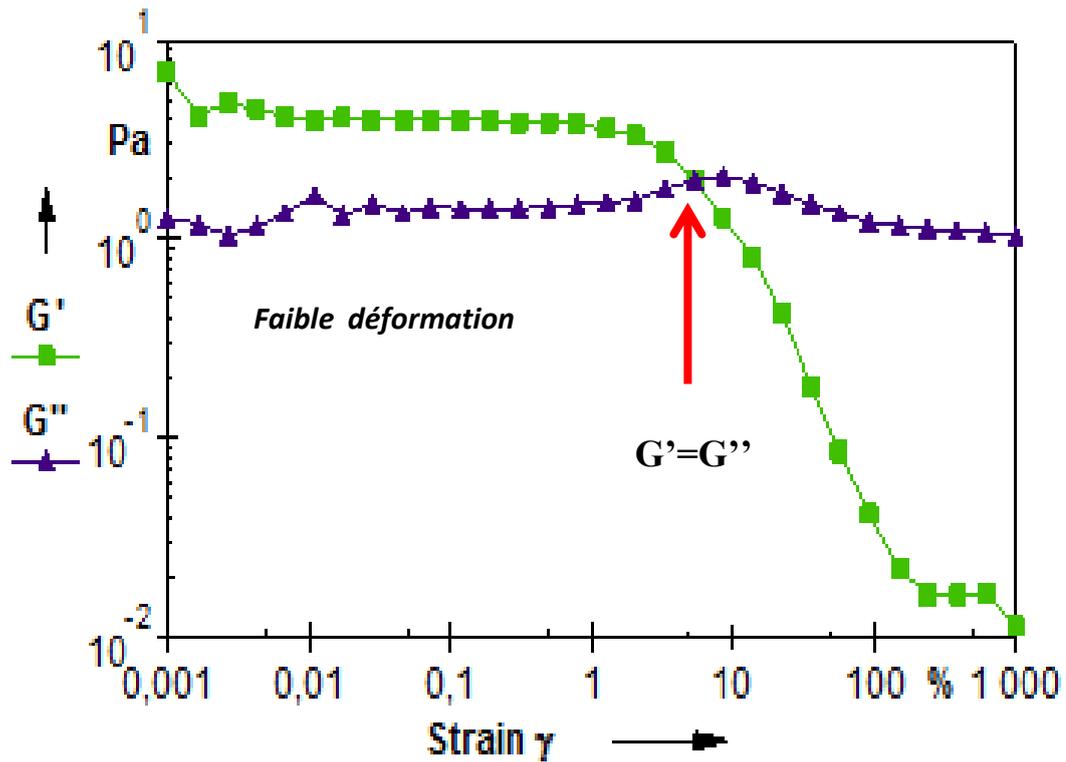


Figure V.10 : Comportement viscoélastique de la nanoémulsion pour une fréquence $f=1\text{Hz}$

Discussion :

Nous définissons la zone LVE pour laquelle la valeur du module G' 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), et donc 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 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' .

- On observe bien une décroissance en fonction du taux de cisaillement caractéristique des fluides non Newtoniens.

V.5.5.2. Test de fréquence:

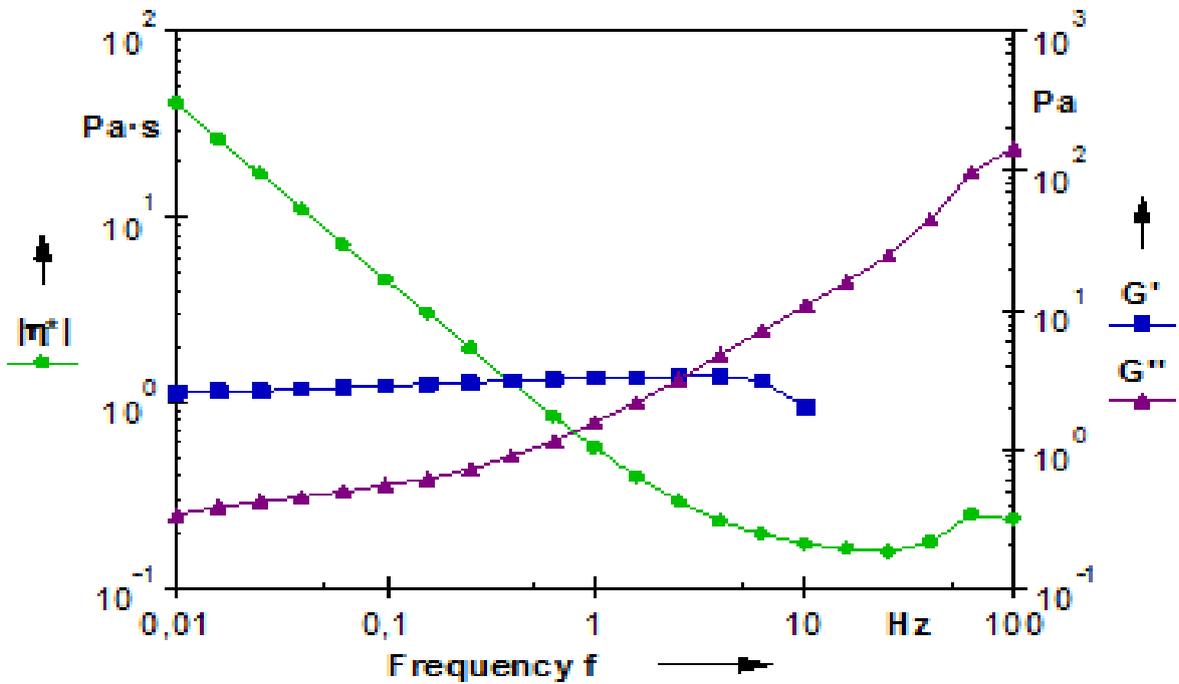


Figure V.11 : test de fréquence (stabilité) de nanoémulsion pour une fréquence $f=0,01 - 100$ Hz.

Discussion :

- Entre 2, 51-100 Hz : $G'' > G'$ donc la formulation est visqueux dans cette partie.
- À partir de 2,51Hz jusqu'à 0.01 Hz (à basse fréquence) : $G' > G''$ dans la zone LVE donc le produit élastique dans cet intervalle.
- On remarque que le module visqueux élastique reste constant et ne dépend pas à la variation de fréquence, et delà, on peut conclure qu'en changeant la fréquence le produit reste stable.

V.5.5.3. Test d'écoulement :

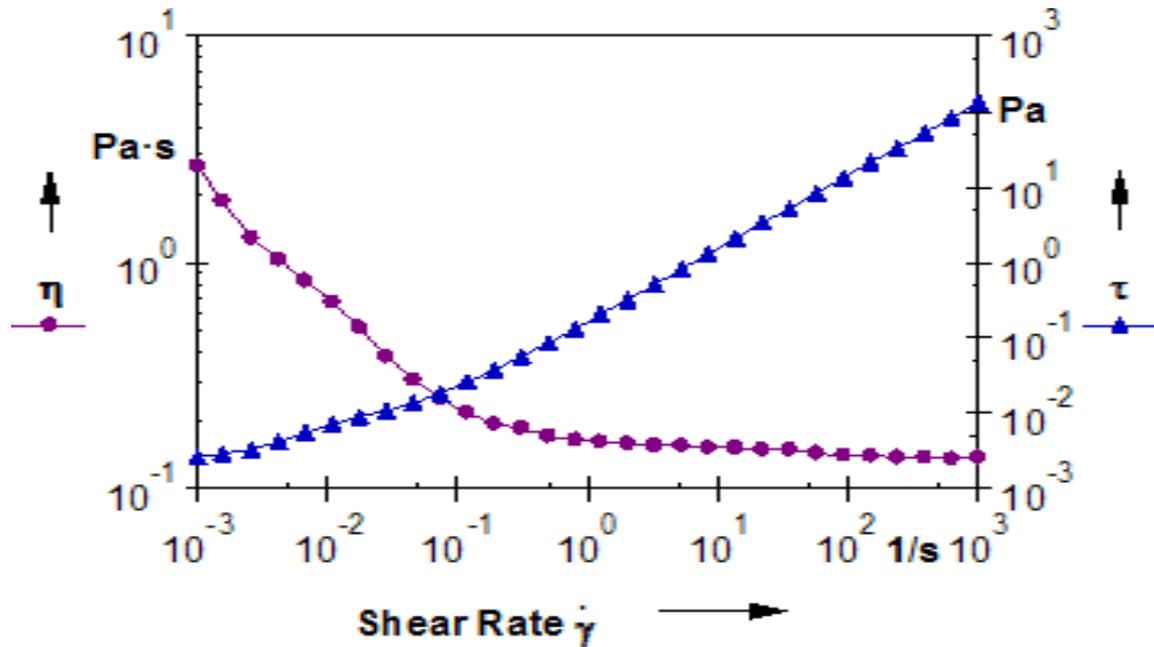


Figure V.12 : test d'écoulement de nanoémulsion sur pour un cisaillement $0.001-1000S^{-1}$.

Discussion :

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

V. 5.6. Mesure du pH :

Le contrôle du pH d'une solution permet d'en évaluer l'acidité ou à l'inverse, l'alcalinité. C'est un point crucial au moment de la préparation des phases aqueuses des émulsions pour vérifier l'activation de l'émulsifiant ou en contrôle post-production sur l'émulsion elle-même, selon la norme NF EN 12850, des variations de pH importantes entre la phase aqueuse et l'émulsion peuvent révéler des informations importantes sur le comportement du liant mis en émulsion. La valeur du pH est estimée à 3.30

La valeur du pH est satisfaisante par ce qu'elle est compatible avec le pH de la peau.

V.6. Formulation du Patch :

V.6.1. préparation des films :

Nous avons préparé plusieurs mélanges de solutions que nous avons introduits dans des boîtes de pétrie en verre :

V.6.2. Préparation des patchs :

Nous avons réalisé trois formulations de patch jusqu'à obtenir un patch qui correspond à un patch présentant les mêmes caractéristiques structurales qu'un patch industriel. Le tableau suivant rassemble les compositions des différentes préparations.

Tableau V.11 : Compositions des différentes préparations.

| | F1 | F2 | F3 |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|
| EC (mg) | 150 | 200 | 250 |
| Ethanol (ml) | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| Emulsion (mg) | 50 | 50 | 50 |
| Glycérol (ml) | 15 | 87 | 58 |

La figure ci-dessous illustre l'aspect du mélange utilisé pour la préparation qui se présente sous forme d'une masse visqueuse et très consistante



Figure V.13 : aspect de la préparation

Chapitre V:Résultats et discussion

Sur le tableau ci-dessous, sont présentés les caractéristiques des différentes préparations qui seront utilisées comme matrices réservoirs du principe actif.

Tableau V.12 : Les caractéristiques des formulations de patch

| Formulation | F1 | F2 | F3 |
|-------------|-------------------------------------|---|--|
| Aspect | Le réservoir obtenu est trop fluide | Le réservoir nécessite du temps pour le séchage | Le réservoir est visqueux et présente des meilleures caractéristiques. |

Compte tenu de ces résultats, la F3 a été sélectionnée comme réservoir pour la formulation du patch. Deux types de conditionnement des patchs ont été proposés, le premier présente une libération prolongée et l'autre à libération immédiate.



Figure V.14 : Images des patchs avec le conditionnement proposé.

V.7. Caractérisation des patchs :

V.7.1. Structure et aspect du film :

Après séchage du film dans les boites à pétrie, nous avons retiré avec une pince, et nous avons obtenu, les aspects des films sont présentés sur la figure suivante :



Figures V.15 : Aspect du système film (a) la formation d'un film transparent à l'application ; (B) non collant, C) flexible et facile Film pliable après séchage.

Tableau V.13 : Évaluation des caractéristiques des films.

| | A1 | A2 | A3 | A4 |
|--|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Volume du Membrane de support PVA (ml) | 15 | 20 | 25 | 30 |
| Variation de Poids (mg cm⁻²) | 05,32± 0.30 | 14.11 ± 0.30 | 20.74 ± 0.30 | 30.13 ± 0.30 |

Chapitre V:Résultats et discussion

| | | | | |
|---|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Épaisseur (μm) | 40 \pm 10 | 120 \pm 10 | 206 \pm 10 | 282 \pm 10 |
|---|-------------|--------------|--------------|--------------|

Les résultats de la caractérisation physico-chimique des films sont présentés dans le **tableau V.1 3**. L'épaisseur varie entre 40 \pm 10 et 282 \pm 10 μm , ce qui indique qu'ils présentent des épaisseurs différentes. Les poids variant entre 05,32 mg et 30.13 mg, ce qui indique que le poids d'un film à un autre.

Parmi ces résultats et aussi selon le pliage, le choix a porté pour la formulation du film N°3 qui est le meilleur par rapport aux autres car le A1 de 40 \pm 10 μm est très fin et se déchire facilement et le film N°4 est plus épais et non pliable donc les films A2 et A3 de 120 \pm 10 et 206 \pm 10 d'épaisseur sont les meilleurs en termes de durabilité de pliage et d'épaisseurs raisonnables mais d'un côté de l'aspect, le A3 est plus lisse et transparent que A2 .

Les résultats indiquent que le processus utilisé pour préparer les patchs dans cette étude était capable de produire des patchs avec une teneur en principe actif uniforme

V.7.2. Evaluation de la qualité des patchs :

V.7.2.1. Observation à l'œil nu :

Tous les patchs ont présenté une surface lisse et plate; et cette surface lisse a été conservée une fois le patch appliqué sur la peau. Les résultats des tests d'endurance au pliage ont indiqué que les patchs ne se cassent pas et ont maintenu leur intégrité avec le pliage général de la peau une fois appliqués[168].

V.7.2.2.Perméation cutanée in vitro :

Le profil de libération in vitro est un outil important qui prédit à l'avance comment un médicament se comportera in vivo[169] .Les résultats d'études de perméation cutanée in vitro de NE à partir de patchs transdermiques sont présentés sur la **figures V.17** et le **tableau V.14**.

Le Taux de libération de médicament imprégné par centimètre carré de timbres ont été tracés en fonction du temps.

Tableau V.14 :L'évolution de Taux de libération de médicament imprégné

| t (heure) | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 5 | 6 | 20 | 22 | 24 |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Taux de Libération en % | 33,3 | 34,4 | 39,1 | 81,6 | 83,6 | 86,2 | 86,4 | 86,7 | 86,9 |

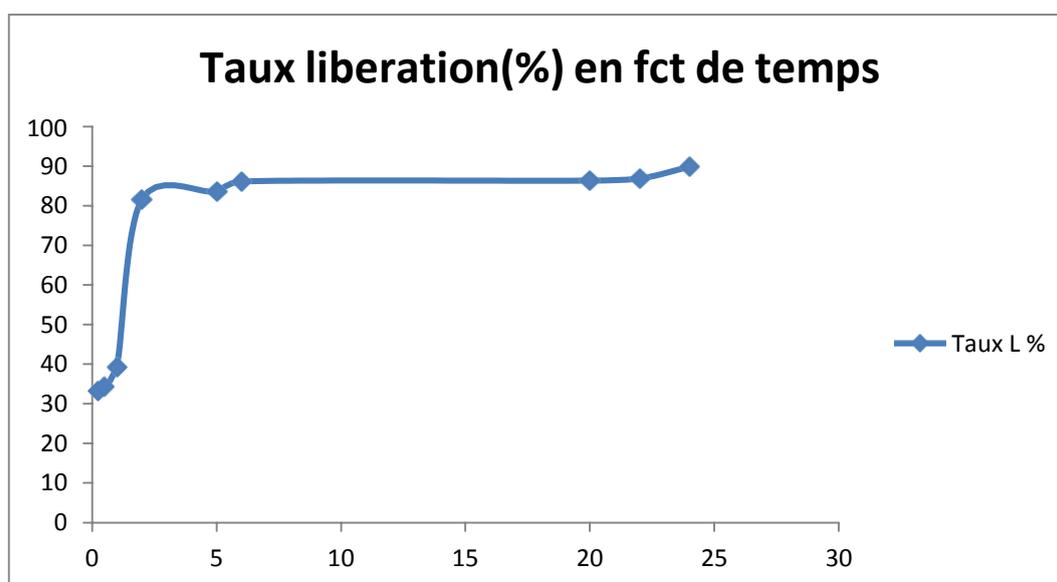


Figure V.18 : Profil de taux de libération du PA du patch

Discussion :

A partir des résultats obtenus, on observe au début une libération immédiate du principe actif suivi d'une libération prolongée (**Figure V.18**), ce profil de libération est obtenu grâce à deux types de nanoémulsions. Une population de nanoémulsion à libération intermédiaire qui fait que l'on atteint très rapidement des concentrations élevées en PA dans le système cutané (soulagement rapide), et une libération prolongée, permettent de maintenir des concentrations élevées et quasiment constantes en PA pendant 24 heures (soulagement à long terme).

On remarque que pour la cinétique de libération du NES du film va commencer à libérer après 2 heures, et le pourcentage maximal de NES libéré est estimé à 86 % pour un temps de 6h pour se libérer complètement au bout de 24 h. On remarque que le principe actif ne commence à se libérer qu'à partir de 15min avec une quantité de 33.3%.

V.7.2.3. Analyse réalisé sur le film et le patch par IR :

Les spectres infrarouges ($4000-500\text{ cm}^{-1}$) réalisés sur le film transdermiques et le patch sont présentés sur les figures (**Figure V. 19** et **20**).

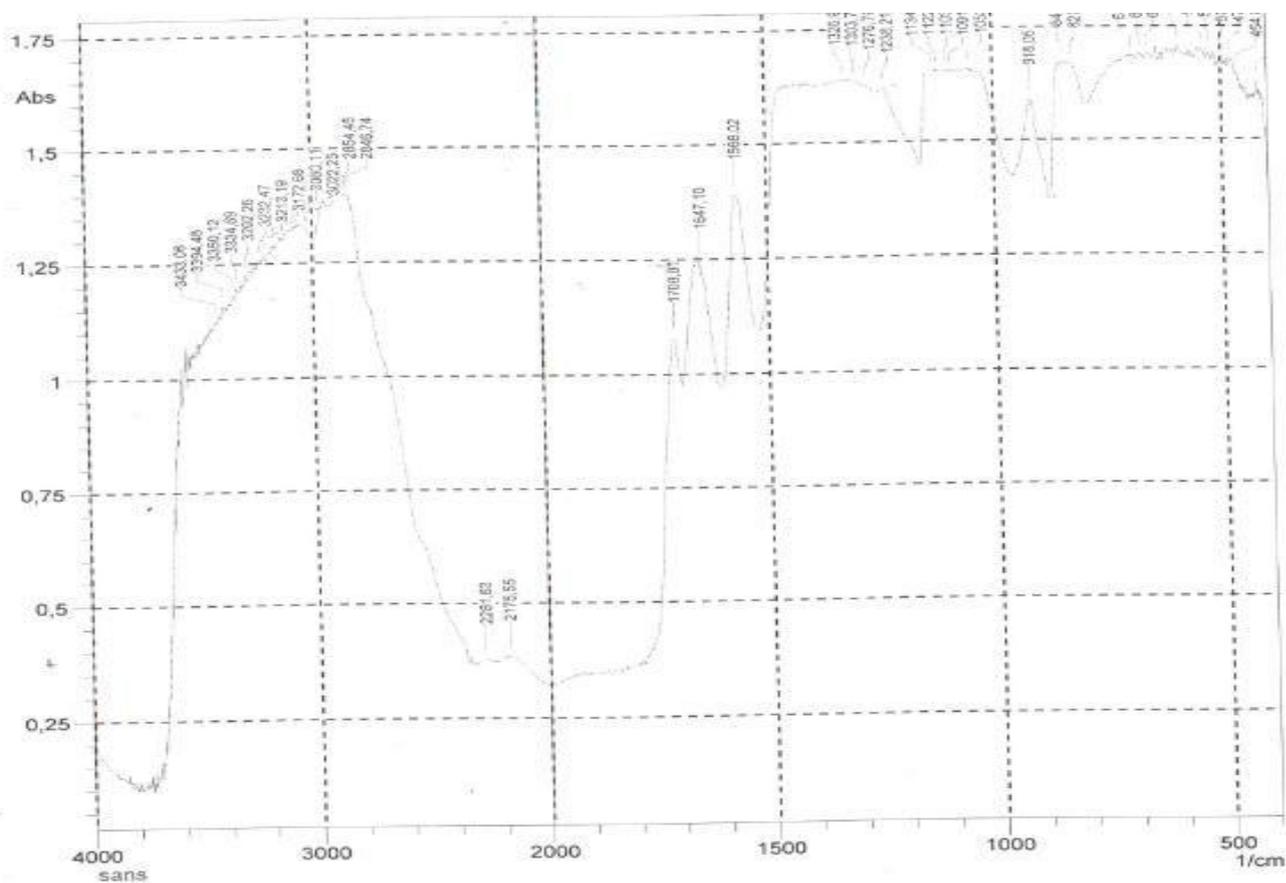


Figure V. 19 : Spectre IR du film

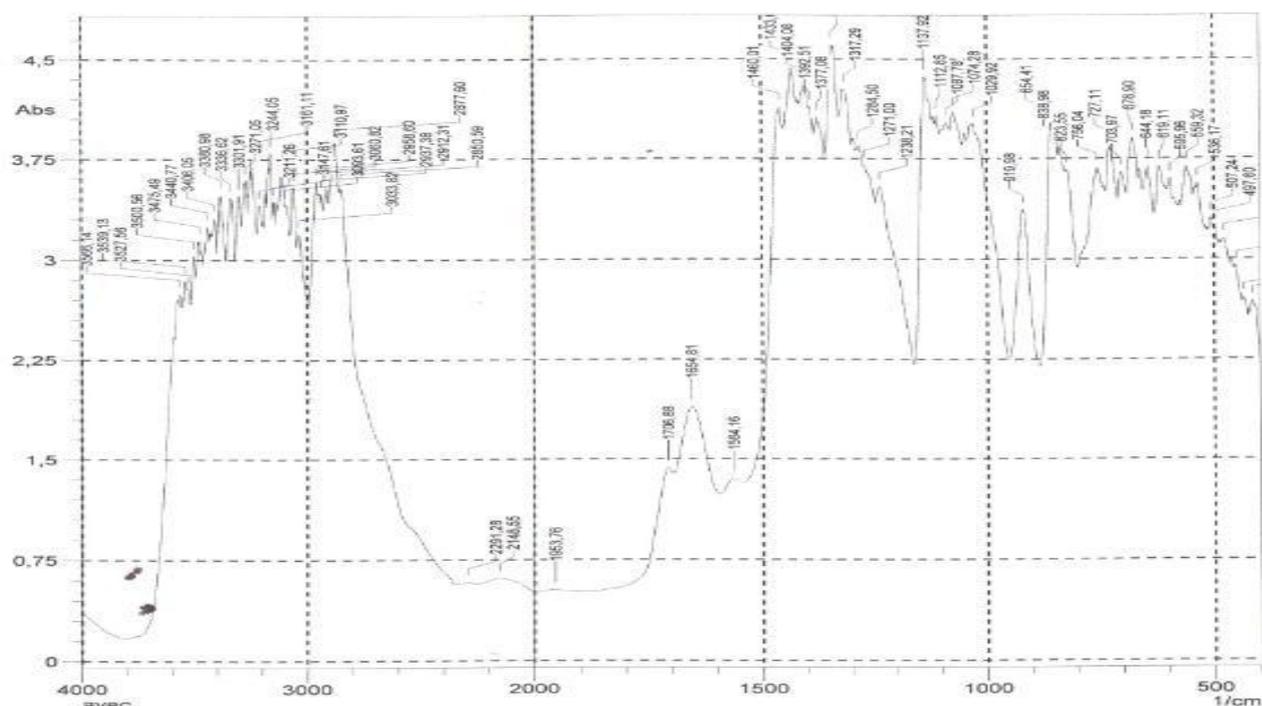


Figure V.20 : Spectre IR de patch

Discussion :

La technique d'IR a été utilisée ici pour faire la comparaison entre le film transdermique et le patch pour identifier la présence des pics qui correspondent à notre émulsion. Les spectres ont montré la présence de groupement acide carboxylique ($3500-3560\text{ cm}^{-1}$) et également la présence de bandes d'absorption des liaisons C-N ($1990-2140\text{ cm}^{-1}$); C=O aldéhyde et cétone et N-H amine ou amide ($1650-1730\text{ cm}^{-1}$ et $1560-1640\text{ cm}^{-1}$).

A la lumière de ces spectres, on peut conclure que les composés de la nanoémulsion sont présents dans le patch, ceci est justifié par l'apparition de groupements caractéristiques et qui n'existent pas du tout dans le film placebo. (Voir Annexe V)

Conclusion générale

Conclusion générale

Notre pays est doté d'une biodiversité végétale immense qui reste à découvrir. Une grande partie de cette flore est constituée par des espèces médicinales et c'est dans le cadre de la recherche de molécules à activités biologiques nouvelles, d'origine végétale, que notre travail s'inscrit.

L'objectif visé dans ce présent travail est d'extraire les substances actives du *T. polium* ; espèce très répandue dans notre pays, l'évaluation des activités antioxydante et antibactérienne. Après l'avoir encapsulé dans une nanoémulsion, proposer une forme galénique d'administration sous forme de patch.

La sélection de la plante a été basée sur quelques données ethno-pharmacologiques. Le screening phytochimique réalisé, a mis en évidence la présence de divers métabolites secondaires tels que: huiles essentielles, polyphénols, flavonoïdes, tanins, stérols, terpènes, saponosides et alcaloïdes dans cette plante.

L'extraction par solvants a fait ressortir l'éthanol polaire comme meilleur agent d'extraction dans les conditions opératoires optimisées. La caractérisation phytochimique de cette espèce a mis en évidence sa richesse en tanins, flavonoides, alcaloides, composés réducteurs etc. Les valeurs exactes déterminées seront exposées dans un autre document du projet de recherche ou notre travail est inséré.

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait de cette plante est effectuée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH, elle a donnée des résultats acceptables, avec une valeur de 20 $\mu\text{g/ml}$ donc l'extrait de notre plante présente une capacité de réduction du DPPH non négligeable, mais celle-ci reste modérée par rapport au pouvoir antioxydant des extraits des autres espèces de la famille des Lamiacées.

L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester vis-à-vis de trois souches : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus*. Les souches testées ont montré une sensibilité aux extraits de la plantes avec des diamètres de zones d'inhibition variant entre 7 à 14mm.

Les tests biologiques effectués dans ce travail ont montré que l'effet antibactérien de notre plante sur différentes souches bactériennes de gram positif et négatif est significatif. Cette efficacité est due à la présence des polyphénols qui sont des antioxydants naturels et les

Conclusion générale

constituants des huiles essentielles qui sont des métabolites secondaires réputés pour leurs effets antibactériens.

La nanoémulsion a été formulée suite à des tests préliminaires et en se basant sur des observations visuelles. Une des formulations a été sélectionnée pour la suite de l'étude compte tenu de son aspect homogène, sa transparence et une stabilité potentielle et non confirmée sur une durée déterminée.

Par DLS, la taille moyenne des gouttelettes a été estimée à 15nm, aucune augmentation de taille n'a été enregistrée pendant un mois de stockage ce qui semble conférer à notre système une stabilité.

Des patches ont été élaborés à partir de biopolymères disponibles. Un film rigide avec une bonne endurance a été obtenu. Des propriétés de viscoélasticité ont été confirmées par la rhéologie.

L'incorporation dans le film formulé de la nanoémulsion a montré par des tests de libération a montré que le principe actif se libère progressivement et de manière prolongée pendant 24 h, durée estimée très convenable dans le cas d'une cicatrisation.

Enfin, ce travail nous a permis de nous initier à de nombreuses techniques expérimentales et particulièrement l'encapsulation d'un extrait végétal dans une nanoémulsion puis incorporé dans un patch formulation d'un patch contient NES. Loin d'être achevé, il est recommandé de :

- ✓ Réaliser une matrice d'expériences pour rentabiliser plus l'extraction
- ✓ Approfondir le volet formulation des nanoémulsions qui à lui seul constitue un axe de recherche innovant
- ✓ Déterminer le taux d'encapsulation par HPLC
- ✓ Réaliser des tests in-vivo pour mettre en avant les activités surtout cicatrisantes de cette plante qui est connue sous le nom de Khiata et qui est utilisée sous forme brute pour panser les blessures. La conditionner sous forme de patch serait meilleure, plus esthétique et aseptique plus efficace et nous reconforte du moment que ce travail est au cœur de notre formation.

Références bibliographiques

19. Rasekh, H.R., et al., *Acute and subchronic toxicity of Teucrium polium total extract in rats*. 2005.
20. Malki, S. and A. Yahia, *Etude Morphologique, Biochimique, Physiologique et Biologique de quelques populations de Teucrium polium L. Capitatum dans l'Est algérien*, 2017, جامعة الخوة مننوري فسطنجة.
21. BENTAHAR, A. and N. LAMRI, *Extraction des huiles essentielles de deux plantes médicinales (Rosmarinus officinalis L et Teucrium polium L) et formulation des pommades antimicrobienne*, 2018, université Akli Mouhend-Oulhadj de Bouira.
22. Proestos, C., et al., *Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity*. Food Chemistry, 2006. 95(4): p. 664-671.
23. Stefkov, G., et al., *Effects of Teucrium polium spp. capitatum flavonoids on the lipid and carbohydrate metabolism in rats*. Pharmaceutical biology, 2011. 49(9): p. 885-892.
24. Djabou, N., et al., *Chemical and genetic diversity of two Mediterranean subspecies of Teucrium polium L*. Phytochemistry, 2012. 83: p. 51-62.
25. Shakhaneh, J. and O. ADIGÜZEL, *Teucrium polium inhibits nerve conduction and carrageenan induced inflammation in the rat skin*. Turkish journal of medical sciences, 2001. 31(1): p. 15-21.
26. Parsaee, H. and R. Shafiee-Nick, *Anti-spasmodic and anti-nociceptive effects of Teucrium polium aqueous extract*. Iranian Biomedical Journal, 2006. 10(3): p. 145-149.
27. Kabouche, A., et al., *Analysis of the essential oil of Teucrium polium ssp. aurasiacum from Algeria*. Journal of essential oil Research, 2007. 19(1): p. 44-46.
28. Moghtader, M., *Chemical composition of the essential oil of Teucrium polium L. from Iran*. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 2009. 5(6): p. 843-846.
29. Piozzi, F., et al., *Advances on the chemistry of furanoditerpenoids from Teucrium genus*. Heterocycles-Sendai Institute of Heterocyclic Chemistry, 2005. 65(5): p. 1221-1234.
30. Rasekh, H., M. Khoshnood-Mansourkhani, and M. Kamalinejad, *Hypolipidemic effects of Teucrium polium in rats*. Fitoterapia, 2001. 72(8): p. 937-939.
31. Stefkov, G., et al., *Seasonal variation of flavonoids in Teucrium polium L.(Lamiaceae)*. Maced Pharm Bull, 2009. 55(1-2): p. 33-40.
32. Hassan, S., et al. *Saponin rich extracts from quillaja, yucca, soybean, and guar differ in antimicrobial and hemolytic activities*. in JOURNAL OF DAIRY SCIENCE. 2007. AMER DAIRY SCIENCE ASSOC 1111 N DUNLAP AVE, SAVOY, IL 61874 USA.
33. Bendif, H., *Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques Lamiaceae*. Ajuga iva, 2017.
34. Khleifat, K., J. SHAKHANBEH, and K.A. TARAWNEH, *The chronic effects of Teucrium polium on some blood parameters and histopathology of liver and kidney in the rat*. Turkish journal of Biology, 2002. 26(2): p. 65-71.
35. Niazmand, S., et al., *The positive inotropic and chronotropic effects of Teucrium polium L. extract on Guinea pig isolated heart*. Pharmacologyonline, 2008. 2: p. 588-594.
36. Gharaibeh, M.N., H.H. Elayan, and A.S. Salhab, *Hypoglycemic effects of Teucrium polium*. Journal of ethnopharmacology, 1988. 24(1): p. 93-99.
37. Abdollahi, M., H. Karimpour, and H.R. Monsef-Esfehani, *Antinociceptive effects of Teucrium polium L. total extract and essential oil in mouse writhing test*. Pharmacological Research, 2003. 48(1): p. 31-35.
38. Lagnika, L., *Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises*, 2005, Strasbourg 1.
39. HAMMOUDI, R., et al., *ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS PHENOLIQUES DE LA PLANTE Teucrium polium geyrii*. Algerian Journal of Arid Environment "AJAE", 2012. 2(1): p. 7-7.

40. Tepe, B., et al., *Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of Teucrium polium and Stachys iberica*. *Fitoterapia*, 2011. 82(2): p. 237-246.
41. Menichini, F., et al., *Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four Teucrium essential oils from Greece*. *Food Chemistry*, 2009. 115(2): p. 679-686.
42. Esmaili, M.A. and R. Yazdanparast, *Hypoglycaemic effect of Teucrium polium: studies with rat pancreatic islets*. *Journal of ethnopharmacology*, 2004. 95(1): p. 27-30.
43. Kaur, G.J. and D.S. Arora, *Bioactive potential of Anethum graveolens, Foeniculum vulgare and Trachyspermum ammi belonging to the family Umbelliferae-Current status*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010. 4(2): p. 087-094.
44. Shtukmaster, S., P. Ljubuncic, and A. Bomzon, *The effect of an aqueous extract of Teucrium polium on glutathione homeostasis in vitro: a possible mechanism of its hepatoprotectant action*. *Advances in pharmacological sciences*, 2010. 2010.
45. Niazmand, S., et al., *Cardiovascular effects of Teucrium polium L. extract in rabbit*. *Pharmacognosy Magazine*, 2011. 7(27): p. 260.
46. Dehghani, F., et al., *Effect of Teucrium polium on histology and histochemistry in rat stomach*. *Indian Journal of Gastroenterology*, 2005. 24(3): p. 126.
47. Kasabri, V., F.U. Afifi, and I. Hamdan, *In vitro and in vivo acute antihyperglycemic effects of five selected indigenous plants from Jordan used in traditional medicine*. *Journal of ethnopharmacology*, 2011. 133(2): p. 888-896.
48. Nematollahi-Mahani, S., et al., *Cytotoxic effects of teucrium polium. On some established cell lines*. *Pharmaceutical biology*, 2007. 45(4): p. 295-298.
49. Khader, M., P. Eckl, and N. Bresgen, *Effects of aqueous extracts of medicinal plants on MNNG-treated rat hepatocytes in primary cultures*. *Journal of ethnopharmacology*, 2007. 112(1): p. 199-202.
50. Baboota, S., et al., *Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib*. *Acta pharmaceutica*, 2007. 57(3): p. 315.
51. McClements, D.J., *Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities*. *Soft matter*, 2012. 8(6): p. 1719-1729.
52. Mahajan, H.S. and S. Savale, *Nanoemulsion: A versatile mode of drug delivery system*. *Indian Journal of Novel Drug Delivery*, 2016. 8(3): p. 123-132.
53. Ali, A., *Nanoémulsions d'intérêt pharmaceutique stabilisées par la beta-lactoglobuline*, 2016, Université Paris-Saclay.
54. Solans, C., et al., *Nano-emulsions*. *Current opinion in colloid & interface science*, 2005. 10(3-4): p. 102-110.
55. El-Aasser, M.S. and E.D. Sudol, *Miniemulsions: overview of research and applications*. *JCT research*, 2004. 1(1): p. 21-32.
56. Solè, I., et al., *Nano-emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006. 288(1-3): p. 138-143.
57. Ahmed, K., et al., *Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties*. *Food Chemistry*, 2012. 132(2): p. 799-807.
58. McClements, D.J., *Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance*. *Soft matter*, 2011. 7(6): p. 2297-2316.
59. Anton, N. and T.F. Vandamme, *The universality of low-energy nano-emulsification*. *International journal of pharmaceutics*, 2009. 377(1-2): p. 142-147.
60. Shah, P., D. Bhalodia, and P. Shelat, *Nanoemulsion: a pharmaceutical review*. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2010. 1(1).
61. Bouchemal, K., et al., *Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation*. *International journal of pharmaceutics*, 2004. 280(1-2): p. 241-251.

62. Shinoda, K. and H. Saito, *The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant*. Journal of Colloid and Interface Science, 1968. 26(1): p. 70-74.
63. Nishitani Yukuyama, M., et al., *Challenges and future prospects of nanoemulsion as a drug delivery system*. Current pharmaceutical design, 2017. 23(3): p. 495-508.
64. Sokolov, Y.V., *Nanoemulsion formation by low-energy methods: a review*. News of Pharmacy, 2014(3 (79)): p. 16-19.
65. Vandamme, T.F. and N. Anton, *Low-energy nanoemulsification to design veterinary controlled drug delivery devices*. International journal of nanomedicine, 2010. 5: p. 867.
66. Gilbert, R., P. Lovell, and M. El-Aasser, *Emulsion Polymerization and Emulsion Polymer*, 1997, Wiley, Chichester.
67. Maestro, A., et al., *Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method*. Journal of Colloid and Interface Science, 2008. 327(2): p. 433-439.
68. Fernandez, P., et al., *Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004. 251(1-3): p. 53-58.
69. Ishak, K. and M.S.M. Anuar, *Phase inversion of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates (mcl-PHA)-incorporated nanoemulsion: effects of mcl-PHA molecular weight and amount on its mechanism*. Colloid and Polymer Science, 2016. 294(12): p. 1969-1981.
70. Armanet, L. and D. Hunkeler, *Phase inversion of polyacrylamide-based inverse-emulsions: Influence of inverting-surfactant type and concentration*. Journal of applied polymer science, 2007. 103(6): p. 3567-3584.
71. Perazzo, A., V. Preziosi, and S. Guido, *Phase inversion emulsification: Current understanding and applications*. Advances in colloid and interface science, 2015. 222: p. 581-599.
72. Flourey, J., A. Desrumaux, and J. Lardières, *Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2000. 1(2): p. 127-134.
73. Huang, X., et al., *The roles of osteocytes in alveolar bone destruction in periodontitis*. Journal of Translational Medicine, 2020. 18(1): p. 1-15.
74. Kumar, M., et al., *Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: a review*. Preventive nutrition and food science, 2019. 24(3): p. 225.
75. Messaoud, S.Y.H., *Récupération assistée du pétrole par injection de Surfactants*, 2020, UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA.
76. Lovelyn, C. and A.A. Attama, *Current state of nanoemulsions in drug delivery*. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2011. 2(05): p. 626.
77. Tadros, T., et al., *Formation and stability of nano-emulsions*. Advances in colloid and interface science, 2004. 108: p. 303-318.
78. Magimel, A., *Etude du fractionnement de graines entières oléo-protéagineuses pour l'obtention de fractions multifonctionnelles de type "émulsions actives" dans le domaine de la formulation cosmétique*, 2016.
79. Tang, S.Y., P. Shridharan, and M. Sivakumar, *Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions—comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer*. Ultrasonics sonochemistry, 2013. 20(1): p. 485-497.
80. Jadhav, A., et al., *Ultrasound assisted manufacturing of paraffin wax nanoemulsions: process optimization*. Ultrasonics sonochemistry, 2015. 23: p. 201-207.
81. Kentish, S., et al., *The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008. 9(2): p. 170-175.
82. Nakashima, T., et al., *Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression*. Nature medicine, 2011. 17(10): p. 1231-1234.

83. Laouini, A., H. Fessi, and C. Charcosset, *Membrane emulsification: A promising alternative for vitamin E encapsulation within nano-emulsion*. Journal of membrane science, 2012. 423: p. 85-96.
84. McClements, D.J. and S.M. Jafari, *General aspects of nanoemulsions and their formulation*, in *Nanoemulsions*. 2018, Elsevier. p. 3-20.
85. Zhang, J., L. Bing, and G.A. Reineccius, *Formation, optical property and stability of orange oil nanoemulsions stabilized by Quallija saponins*. LWT-Food Science and Technology, 2015. 64(2): p. 1063-1070.
86. Yukuyama, M., et al., *Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics—a review*. International journal of cosmetic science, 2016. 38(1): p. 13-24.
87. Piorkowski, D.T. and D.J. McClements, *Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications*. Food Hydrocolloids, 2014. 42: p. 5-41.
88. Santos, A.C., et al., *Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations*. Expert opinion on drug delivery, 2019. 16(4): p. 313-330.
89. Solans, C., et al., *Nano-emulsions: formation, properties, and applications*. Surfactant science series, 2003: p. 525-554.
90. Arunachalam, A., et al., *Transdermal drug delivery system: a review*. Journal of Current Pharma Research, 2010. 1(1): p. 70.
91. Mergeay-Fabre, M., *Développement des formes transdermiques*, 2014, Université Toulouse III-Paul Sabatier.
92. Falson-Rieg, F., V. Faivre, and F. Pirot, *Nouvelles formes médicamenteuses*. 2004: Éd. Tec & Doc.
93. Chaptal, A., *Les cahiers 24x32—Mémoire sur la situation des TICE et quelques tendances internationales d'évolution*. Sciences et Technologies de l'Information et de la Communication pour l'Éducation et la Formation, 2009. 16(1): p. 43-101.
94. Rani, S., et al., *Transdermal patches a successful tool in transdermal drug delivery system: an overview*. Der Pharmacia Sinica, 2011. 2(5): p. 17-29.
95. Hopp, M.S., *Developing custom adhesive systems for transdermal drug delivery products*. Pharmaceutical technology, 2002. 26(3): p. 30-30.
96. Jeanbourquin, J., et al., *Les patchs transdermiques à effet systémique*. pharmaJournal, 2018.
97. Williams, A.C. and B.W. Barry, *Penetration enhancers*. Advanced drug delivery reviews, 2012. 64: p. 128-137.
98. Trottet, L., et al., *Effect of finite doses of propylene glycol on enhancement of in vitro percutaneous permeation of loperamide hydrochloride*. International journal of pharmaceutics, 2004. 274(1-2): p. 213-219.
99. Zhang, J.-P., et al., *Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: a comparative study*. Archives of pharmacal research, 2012. 35(1): p. 109-117.
100. Gaikwad, A.K., *Transdermal drug delivery system: Formulation aspects and evaluation*. Comprehensive Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. 1(1): p. 1-10.
101. Vinod, K., et al., *Transdermal drug delivery system over coming challenges of popular drug delivery system*. International Journal of Pharma World Research, 2010. 1(3): p. 1-14.
102. SHINGADE, G.M., *Review on: recent trend on transdermal drug delivery system*. Journal of drug delivery and therapeutics, 2012. 2(1).
103. Sharma, A., S. Saini, and A. Rana, *Transdermal drug delivery system: a review*. International Journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences, 2013. 4(1): p. 286-292.
104. Wilkosz, M.F. and R.H. Bogner, *Senior Care-Transdermal Drug Delivery-Part 1: Current Status-This first article in a series examines therapeutic advantages and disadvantages of currently available transdermal delivery systems*. US pharmacist, 2003. 28(4): p. 40-55.
105. Ansel, H.C., N.G. Popovich, and L.V. Allen Jr, *Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems*. 2020.
106. Cheston, M., *Berlin. Clinical report-Alternative Routes of Drug Administration-Advantages & Disadvantages (subject review)*. Pediatrics, 1997. 100(1): p. 143-152.

107. Ravi, S., P. Sharma, and M. Bansal, *Review: Transdermal Drug Delivery of Nicotine*. Int J Drug Dev Res, 2011. 3: p. 01-08.
108. Spigno, G. and D.M. De Faveri, *Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts*. Journal of Food Engineering, 2007. 78(3): p. 793-801.
109. Budić-Leto, I., et al., *Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the Babić grape variety*. Food technology and biotechnology, 2005. 43(1): p. 47-53.
110. FETTAH, A., *ÉVALUATION IN-VITRO DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTERIENNE DES EXTRAITS NATURELS D'UNE SOUS ESPECE DE TEUCRIUM POLIUM L. CULTIVÉE DANS LA RÉGION DE BENI SOUIK, BISKRA*.
111. Fatima, G. and T. Hanane, *Contribution à l'étude phytochimique et l'activité antiradicalaire de la plante Majorana hortensis*, 2019.
112. Daira, N., M.C. Maazi, and A. Chefrou, *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, 2016. 85: p. 276-290.
113. Bekro, Y.-A., et al., *Etude ethnobotanique et screening phytochimique de Caesalpinia benthamiana (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpiniaaceae)*. Sciences & Nature, 2007. 4(2): p. 217-225.
114. Karim, T., et al., *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, 2015: p. 144-153.
115. Fettah, A., *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*, 2019, UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA.
116. Lella, O.A., et al., *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, 2017. 6(5): p. 1510-1514.
117. Koffi, E., et al., *Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants*. Journal of Animal and Plant Sciences (JAPS), 2010. 5(3): p. 550-558.
118. Guérin-Faubleé, V. and G. Carret, *L'antibiogramme: principe, méthodologie intérêt et limites*. Journées nationales GTV-INRA, 1999: p. 5-12.
119. Celiktas, O.Y., et al., *Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations*. Food Chemistry, 2007. 100(2): p. 553-559.
120. Le Houérou, H.N., *Biogeography of the arid steppeland north of the Sahara*. Journal of Arid Environments, 2001. 48(2): p. 103-128.
121. Ponce, A., et al., *Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard*. LWT-Food Science and Technology, 2003. 36(7): p. 679-684.
122. Elhoussine, D., B. Zineb, and B. Abdellatif, *GC/MS analysis and antibacterial activity of the essential oil of Mentha pulegium grown in Morocco*. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2010. 6(3): p. 191-198.
123. Mighri, H., et al., *Antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia herba-alba essential oil cultivated in Tunisian arid zone*. Comptes Rendus Chimie, 2010. 13(3): p. 380-386.
124. Gachkar, L., et al., *Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils*. Food Chemistry, 2007. 102(3): p. 898-904.
125. Asadi, S., et al., *In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six Salvia species from Iran: a comparative study*. Food and chemical toxicology, 2010. 48(5): p. 1341-1349.
126. Wang, S.-Y., et al., *Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of Taiwania cryptomerioides Hayata*. 2002.

127. Bozin, B., et al., *Phenolics as antioxidants in garlic (Allium sativum L., Alliaceae)*. Food Chemistry, 2008. 111(4): p. 925-929.
128. Rebey, I.B., et al., *Bioactive compounds and antioxidant activity of Pimpinella anisum L. accessions at different ripening stages*. Scientia horticulturae, 2019. 246: p. 453-461.
129. Jaiswal, M., R. Dudhe, and P. Sharma, *Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system*. 3 Biotech, 2015. 5(2): p. 123-127.
130. Ancey, C., P. Vollmöller, and S. Cochard. *Rhéophysique des suspensions concentrées: cadre théorique et similitude*. in *17ème Congrès Français de Mécanique*. 2005.
131. Tadros, T.F., *Correlation of viscoelastic properties of stable and flocculated suspensions with their interparticle interactions*. Advances in colloid and interface science, 1996. 68: p. 97-200.
132. Macosko, C.W., *Rheology Principles. Measurements and Applications*, 1994.
133. Kwon, J.S., et al., *Preparation of erythromycin-loaded poly (vinylalcohol) film and investigation of its feasibility as a transdermal delivery carrier*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2014. 11(3): p. 211-216.
134. Patel, D.P., et al., *Development and evaluation of ethyl cellulose-based transdermal films of furosemide for improved in vitro skin permeation*. Aaps Pharmscitech, 2009. 10(2): p. 437-442.
135. Arora, P. and B. Mukherjee, *Design, development, physicochemical, and in vitro and in vivo evaluation of transdermal patches containing diclofenac diethylammonium salt*. Journal of pharmaceutical sciences, 2002. 91(9): p. 2076-2089.
136. Pamela, S.V., P.L. Adrian, and B.C. Manuel, *Diagnóstico de modelos de yeso vs digitales: exactitud y fiabilidad en la comparación del Análisis de Bolton y sus mediciones correspondientes*.
137. Kusum Devi, V., et al., *Design and evaluation of matrix diffusion controlled transdermal patches of verapamil hydrochloride*. Drug development and industrial pharmacy, 2003. 29(5): p. 495-503.
138. Ounis, R., D. Boumaza, and S. Karouche, *Evaluation du contenu phénolique et des activités biologiques de Teucrium polium*. 2018.
139. Fiamegos, Y.C. and C.D. Stalikas, *Phase-transfer catalysis in analytical chemistry*. Analytica chimica acta, 2005. 550(1-2): p. 1-12.
140. Saleem, T., et al., *A Green Nutraceutical Study of Antioxidants Extraction in Cleome Brachycarpa—An Ethnomedicinal Plant*. SAINS MALAYSIANA, 2020. 49(8): p. 1915-1924.
141. Bellik, Y., et al., *Phytochemicals to prevent inflammation and allergy*. Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery, 2012. 6(2): p. 147-158.
142. Khazaei, M., et al., *Review on Teucrium polium biological activities and medical characteristics against different pathologic situations*. Journal of Contemporary Medical Sciences, 2018. 4(1).
143. Das, T., et al., *Saponin: role in animal system*. Veterinary World, 2012. 5(4): p. 248.
144. Abena, M.E.N., et al., *Caractérisations Phytochimique et Pharmacotoxicologique de Spilanthes Africana (Asteraceae) Utilisée par les Tradithérapeutes pour les Extractions Dentaires*. HEALTH SCIENCES AND DISEASE, 2020. 21(8).
145. Ngono, X.R., et al., *Screening Phytochimique, Propriétés Analgésiques et Toxicité Aigüe de l'Extrait Aqueux des Écorces de la Tige de Paullinia Pinnata (Sapindaceae)*. HEALTH SCIENCES AND DISEASE, 2019. 20(6).
146. HAMMOUDI, R. and M.H. MAHAMMED, *Contribution à l'Etude de la Composition Chimique des Huiles Essentielles de la Plante Teucrium polium ssp. geyrii (Lamiaceae)*. 2010.
147. Ricci, D., et al., *Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of Teucrium marum (Lamiaceae)*. Journal of ethnopharmacology, 2005. 98(1-2): p. 195-200.
148. Özkan, G., et al., *Screening of Turkish endemic Teucrium montbretii subsp. pamphylicum extracts for antioxidant and antibacterial activities*. Food control, 2007. 18(5): p. 509-512.

149. Derwich, E., et al., *GC/MS analysis and in vitro antibacterial activity of the essential oil isolated from leaf of Pistacia lentiscus growing in Morocco*. World Applied Sciences Journal, 2010. 8(10): p. 1267-1276.
150. Yami, B., *Antibacterial study of two medicinal plants (Allium sativum) and (Lavandula angustifolia)*. International Journal of Management Sciences and Business Research, 2013.
151. Moussaid, M., et al., *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, 2012. 1(1): p. 11-13.
152. Thangaraj, H., et al., *In vitro activity of ciprofloxacin, sparfloxacin, ofloxacin, amikacin and rifampicin against Ghanaian isolates of Mycobacterium ulcerans*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. 45(2): p. 231-233.
153. Sharafati Chaleshtori, F., M. Saholi, and R. Sharafati Chaleshtori, *Chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of Bunium persicum, Eucalyptus globulus, and Rose Water on multidrug-resistant Listeria species*. Journal of evidence-based integrative medicine, 2018. 23: p. 2515690X17751314.
154. Kalpoutzakis, E., et al., *New hemisynthetic manoyl oxide derivatives with antimicrobial activity*. Chemical and pharmaceutical bulletin, 2001. 49(7): p. 814-817.
155. Paixao, N., et al., *Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines*. Food Chemistry, 2007. 105(1): p. 204-214.
156. Maisuthisakul, P., M. Suttajit, and R. Pongsawatmanit, *Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants*. Food Chemistry, 2007. 100(4): p. 1409-1418.
157. HAMMOUDI, R. and H.M. Mahfoud, *Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional algérien*, 2015.
158. Bencheikh, S.E., et al., *Chemical analysis, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of Teucrium polium ssp. aurasianum Labiatae*. Der Pharma Chem, 2015. 7: p. 308-314.
159. Hanson, P.M., et al., *Variation for antioxidant activity and antioxidants in tomato*. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004. 129(5): p. 704-711.
160. Trabelsi, N., et al., *Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the halophyte Limoniastrum monopetalum leaves*. LWT-Food Science and Technology, 2010. 43(4): p. 632-639.
161. Djeridane, A., et al., *Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds*. Food Chemistry, 2006. 97(4): p. 654-660.
162. Verdan, A.M., et al., *Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites*. Journal of inorganic biochemistry, 2011. 105(10): p. 1314-1322.
163. BEN, C.J.P. and V. SIVANADANAM, *Micropropagation of Jatropha maheshwarii Subr. & Nayar, an endemic species restricted to the southern terminus of India*. genus, 2008: p. 15.
164. Taylor, A., et al., *All-optical imaging of gold nanoparticle geometry using super-resolution microscopy*. The Journal of Physical Chemistry C, 2018. 122(4): p. 2336-2342.
165. Qian, C. and D.J. McClements, *Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size*. Food Hydrocolloids, 2011. 25(5): p. 1000-1008.
166. Brochette, P., *Emulsification. Elaboration et étude des émulsions*. Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés, 1999. 2(J2150): p. J2150. 1-J2150. 18.
167. Pierat, N., *Préparations d'émulsions par inversion de phase induite par agitation*, 2010, UHP-Université Henri Poincaré.
168. Mutalik, S. and N. Udupa, *Glibenclamide transdermal patches: physicochemical, pharmacodynamic, and pharmacokinetic evaluations*. Journal of pharmaceutical sciences, 2004. 93(6): p. 1577-1594.

169. Katayose, S. and K. Kataoka, *Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly (ethylene glycol)- poly (l-lysine) block copolymer*. *Bioconjugate chemistry*, 1997. 8(5): p. 702-707.

Les annexes

Les annexes

Annexe I : Matériels et réactifs utilisés

Matériels lors de cette étude :

Les matériaux, réactifs et les solvants utilisés dans nos études sont présentés dans les tableaux 1 et 2 ci-dessous :

| | |
|------------------------------------|--------------------|
| Balance électronique | Etuve |
| Chauffe ballon | Barreau magnétique |
| Réfrigérant | Papier a filtre |
| Pompe à vide | Entonnoir |
| Cryostat | Boite de pétrie |
| Agitateur et plaque chauffante | Pro pipette |
| Rota-vapeur | Ecouvillon |
| Broyeur à couteau | Support |
| Bain marié | Bec benzène |
| Vortex | autoclave |
| Tube à essai stérile | Pipette pasteur |
| Coton | Pince stérile |
| Disque Gentamycine et Tetracycline | Chauffage a reflux |

Un certain nombre d'accessoires et petit matériel spécifique est utilisé dans le cadre de cette étude : Spatule, papier aluminium et film, des sacs propre, gants et masques et lunette de protection pour la manipulation des produits dangereux et différents types de verrerie (fioles jaugées, bécher, Pissette, erlenmeyer, burette, éprouvette).

Avant emploi, le matériel est rincé à l'eau distillée puis nettoyé à l'acétone rincé à l'eau distillée afin d'éliminer toute trace de poussières et de graisses afin d'éviter la contamination de produit au cours de la formulation.

Réactifs chimique et solvants utilisés :

| | |
|---------------|----------------------|
| L'éthanol | L'eau distillée |
| Acétone | Eau de javel |
| DMSO | Milieu Hinton |
| LB liquide | Souches bactériennes |
| Huile oléique | Span 80 |
| PVA | Méthanol |
| DPPH | EC |

Les annexes

Annexe II : Liste des souches microbiennes testées

Staphylococcus aureus :

Position taxonomique :

Règne : Eubacteria

Embranchement : Fimicutes.

Classe : Bacilles.

Ordre : Bacillales.

Famille : Stphylococcaceae

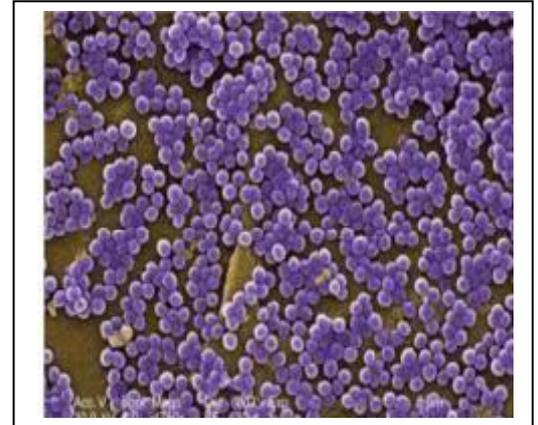
Genre : Staphylococcus

Espèce : Staphylococcus aureus.

Description et pathogénéicité :

C'est une bactérie de forme arrondie, groupée en grappe de raisin. Elle est gram positif et facultativement anaérobie. Elle se développe généralement sur les muqueuses nasales et la peau, dans les appariés gastro-intestinal et urinaire des animaux a sang chaud. Contrairement aux autres staphylocoques communs, S. aureus produit une coagulas qui est une enzyme responsable de la coagulation du sang.

S .aureus est l'agent pathogène le plus important chez l'homme, il cause des abcès, l'infection des blessures, des pneumonies, des empoisonnements alimentaires et d'autres maladies (Klein, 1995).



Pseudomonas aeruginosa :

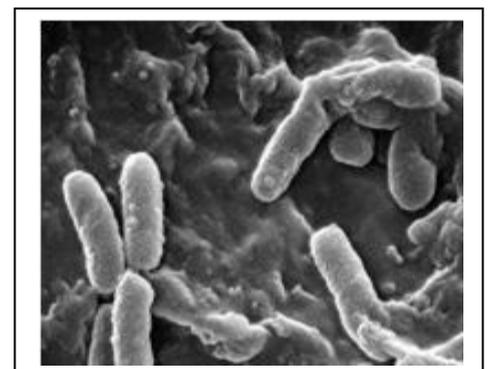
Règne : Bactérie

Division : Proteobacteria

Classe : Gamma proteobacteria

Ordre : Pseudo monadales

Famille : Pseudomonadaceae



Les annexes

Genre : Pseudomonas

Espèce : Pseudomonas aeruginosa

Description et pathogénéicité :

C'est une bactérie gram-négative du genre Pseudomonas. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles.

Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries à gram-négatif de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement. Le taux de mortalité atteint 50 % chez les patients vulnérables (immunodéprimés).

bacillus subtilis :

Règne : bactérie

Embranchement : firmicutes

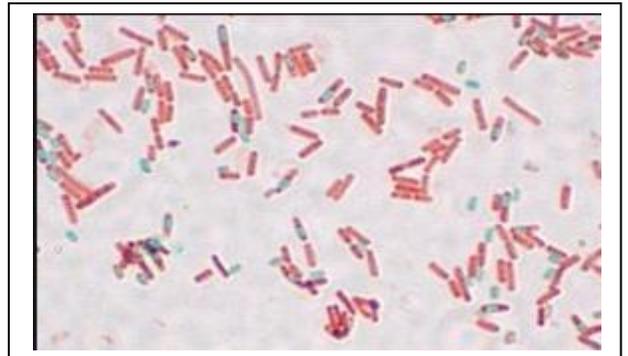
Classe : bacilli

Ordre : bacillales

Famille : bacillaceae

Genre : Bacillus

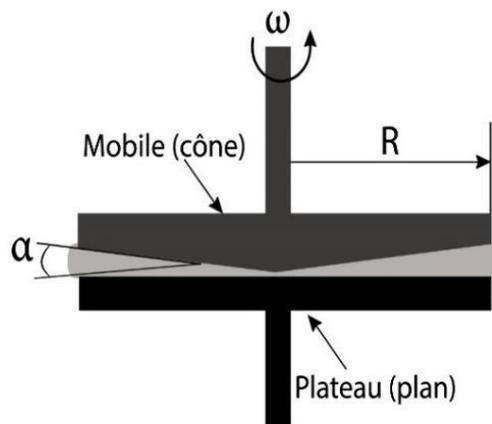
Espèces : Bacillus subtilis



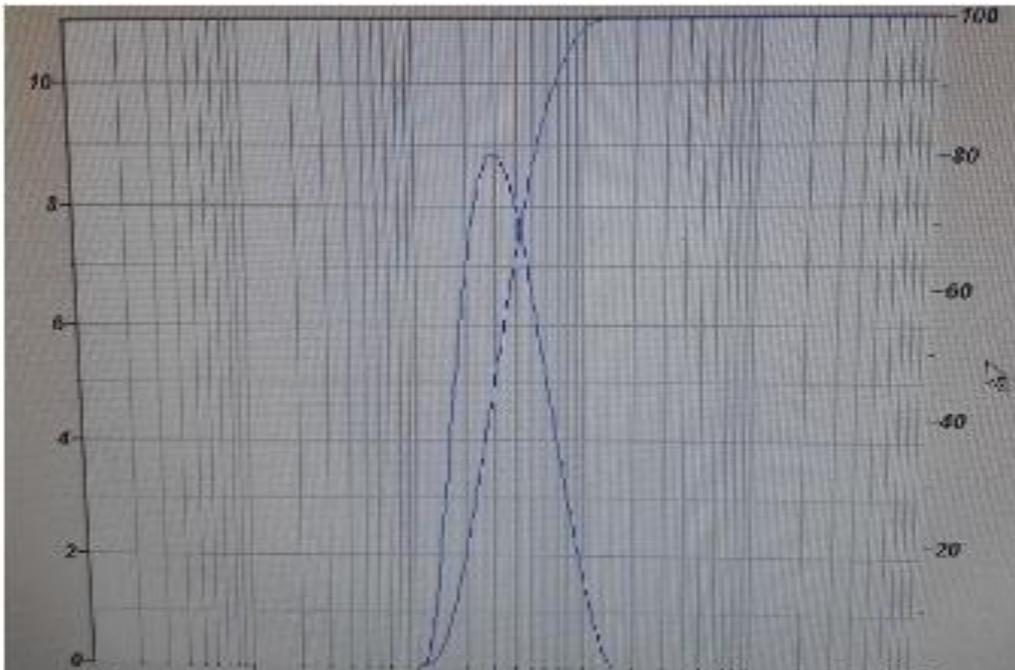
Les annexes

Annexe III : Les rhéomètres rotatifs cône-plan

Dans cette géométrie, le fluide est cisailé entre un cône et un plan. Le cône est caractérisé par son rayon R et par l'angle α . Il est fixé sur la partie tournante du rhéomètre, qui lui confère une rotation par rapport à son axe avec une vitesse angulaire constante ω . L'angle α est très faible ($\leq 4^\circ$) pour obtenir un taux de cisaillement vertical constant dans le volume de mesure.



Annexe IV : Mesure de la distribution de taille des nanoémulsions par Dls



Les annexes

Annexe V : Les Spectres d'IR

Spectres IR pour le film :

| Liaison | Nombre d'onde | Intensité |
|--------------------------------|----------------------|--|
| N-H amine primaires | 3100-3500 | m |
| O-H alcools ;phénols | 3200-3400 | large |
| N-H ions ammoniums | 2 400–3 200 | multiples bandes larges |
| O-H acide carboxilique | 2500-3200 | F à m ; large |
| C=C | 2100-2250 | f |
| C=O ester | 1700-1740 | F |
| C=C | 1625-1685 | m |
| N=O | 1510-1580 | F ; 2 bandes |
| N=O | 1325-1365 | F ; 2 bandes |
| C-O (ester) | 1 100–1 300 | deux bandes (distinctes des cétones, qui ne possèdent pas une liaison C–O) |
| C-N amines aliphatiques | 1020-1220 | souvent chevauchées par d'autres |
| C _{tri} -H aromatique | 800-860 | F |
| C-X chloroalcanes | 540-760 | F à m |
| C-X Bromoalcanes | 500-600 | m à F |

Les annexes

Spectres IR pour le patch :

| Liaison | Nombre d'onde | Intensité |
|--------------------------------------|----------------------|--|
| O-H acides carboxyliques | 3 500–3 560 | |
| N-H amine primaires | 3100-3500 | m |
| O-H alcools ;phénols | 3200-3400 | large |
| N-H ions ammoniums | 2 400–3 200 | multiples bandes larges |
| O-H acide carboxilique | 2500-3200 | F à m ; large |
| C=C | 2100-2250 | f |
| C-N (R–N=C=S) | 1990-2140 | |
| C=O ester | 1700-1740 | F |
| C=O aldéhyde et cétone | 1650-1730 | F |
| N-H amine ou amide | 1560-1640 | F ou m |
| N-O composés <u>nitro</u> aromatique | 1 350-1 520 | plus basse si conjuguée |
| C-O (ester) | 1 100–1 300 | deux bandes (distinctes des cétones, qui ne possèdent pas une liaison C–O) |
| C-N amines aliphatiques | 1020-1220 | souvent chevauchées par d'autres |
| C _{ar} -H aromatique | 800-860 | F |
| C-X chloroalcanes | 540-760 | F à m |
| C-X Bromoalcanes | 500-600 | m à F |