

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITE DE BIDA 1
Faculté de Technologie
Département de Génie de Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de
MASTER EN GENIE DES PROCEDES
Spécialité : Génie chimique

Intitulé du mémoire

**Extraction d'huile essentielle application à la
formulation d'une pommade anti-inflammatoire**

Présenter par :

KALAFAT Soumia

MADJBAR Kenza

Encadré par :

Mme. DJEDRI BANI Safia

Année universitaire 2016/2017

RESUME

Le but de notre travail est la formulation d'une pommade anti-inflammatoire à partir d'huile essentielle de graine de nigelle. L'obtention de ces huiles se fait par différents modes d'extraction à savoir enfleurage extraction par solvant organique et l'extraction par ultrason ...etc. Notre objectif est l'obtenir une huile essentielle bio de ce fait on s'est intéressé à l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau et hydrodistillation qui sont couramment employer en pharmacologie

L'évaluation des pouvoirs anti-inflammatoires des huiles essentielles de Nigelle sativa a été déterminée selon le modèle de l'œdème à la carragénine chez les souris d'où on a confirmé l'existence de l'activité anti-inflammatoire de l'HE de N.sativa. Leur pouvoir antimicrobien a été étudié *in vitro* sur cinq souches bactériennes et trois souches fongiques

L'activité anti-inflammatoire de la pommade formulée est testée, en provoquant une inflammation locale au niveau de l'oreille de souris selon la méthode de Manga et ses collaborateurs d'où on a déterminé un pourcentage d'inhibition de l'inflammation supérieure à l'anti-inflammatoire de référence.

L'activité antimicrobienne de la pommade a été également évaluée *in vitro* sur cinq souches bactériennes et trois souches fongiques.

Finalement une étude de la toxicité cutanée aiguë de la pommade formulée sur des lapins a révélé l'absence d'un effet irritant.

En conclusion, Nos résultats confirment le bien-fondé de l'utilisation ethnopharmacologique de N. sativa comme anti-inflammatoire et comme antimicrobienne

Mots clés: Nigella sativa l- anti-inflammatoire – HE- pommade

ملخص :

الهدف من هذا العمل هو صياغة مرهم مضاد للالتهابات بواسطة الزيت الاساسية لبذور الحبة السوداء, حيث يتم الحصول عليها بعدة طرق كطريقة التشريب ، الاستخلاص بواسطة المذيبات العضوية والاستخراج بالموجات فوق الصوتية.. الخ.

الهدف هو الحصول على الزيوت الحيوية الاساسية, لذلك نحن مهتمون في باستخراج عن طريق جر البخار و التقطير المائي التي تستخدم عادة في علم الصيدلة.

تم تقييم القوى المضادة للالتهابات لزيت الحبة السوداء وفقا لنموذج ذمة الكاراجينان في الفئران ,حيث تم تأكيد وجود هذا النشاط. اما من حيث قدرتها المضادات للميكروبات فقد تمت دراستها في المختبر على خمس سلالات بكتيرية وثلاث سلالات فطرية.

كما تم تقييم القوى المضادة للالتهابات للمرهم المصنوع بعدما تسببنا في التهابات موضعية على مستوى اذن الفئران وفقا لطريقة Manga و تحديد نسبة تثبيت الالتهاب, كما قمنا ايضا بدراسة قدرتها المضادة للميكروبات .

و اخيرا تم تأكيد عدم وجود اي تأثير مهيج على جلد الارانب المعالجة بالمرهم المصنوع.

في الختام, النتائج التي توصلنا إليها تؤكد ملائمة استخدام الزيت الاساسي لبذور الحبة السوداء كمضاد للالتهابات ومضاد الميكروبات.

مرهم-مضاد الالتهاب - الزيوت الاساسية-بذور الحبة السوداء: الكلمات المفتاحية

SUMMARY

The aim of our study is to formulate an anti-inflammatory ointment from volatile oil of nigella seed. The extraction of these oils can be made by various methods namely the extraction of fluorination by organic solvent and extraction by ultrasound....etc. Our object is to get an essential oil, so we are interested in steam distillation and hydrodistillation which are commonly used in pharmacology

The evaluation of the powers anti-inflammatory drugs essential oils of N.sativa was determined according to the model of the edema carragenan in mice to where it has confirmed the existence of the anti-inflammatory activity of the HE of N.sativa . Their antimicrobial activity was studied *in vitro* on five bacterial strains and three fungal strains

The anti-inflammatory activity of the formulated ointment is tested by causing local inflammation in the ear of mice according to the method of Manga et al., from which we have determined a percentage of inhibition of the inflammation superior to the reference anti-inflammatory drugs

The antimicrobial activity of the ointment was also evaluated *in vitro* on five bacterial strains and three fungal strains.

In conclusion, our results confirm the merits of the use ethnopharmacologique of N. sativa as anti-inflammatory and as microbial

Key words: Nigella sativa l- anti-inflammatory - HE- ointment

REMERCIEMENTS

Nous adressons en premier lieu notre reconnaissance à dieu tout puissant, de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

*Nous adressons le grand remerciement à notre promotrice **Mme Bani** qui a proposé le thème de ce mémoire, pour ses conseils, son soutien moral et ses directives du début à la fin de ce travail.*

Nous sommes conscientes de l'honneur que nous avons fait le membre du jury d'avoir accepté d'examiner notre travail.

*Nous remercions aussi, **Mme Boultime** pour son aide, encouragements et disponibilité durant les cinq mois de travail au laboratoire.*

Nous remercions aussi, Belhadji Lynda.

Nous remercions bien fort Les équipes de Saida Médéa, El-Harrach et le laboratoire d'hygiène de Blida pour leurs aides, leurs disponibilités et leurs sympathies sans eu notre travail n'aurait pu être achevé.

*Nos remerciements s'adressent également à tous nos **professeurs** pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

*Nous exprimons nos profonds remerciements à l'encontre de nos **parents** qui nous ont enseigné la patience, la politesse, le sacrifice et qui ont toujours été là pour nous.*

Nous remercions aussi monsieur BAKIR Mouhammed pour leur aide ,

Enfin, nous ne saurions terminer cette série de remerciements sans penser à tous ceux qui de près ou de loin nous ont aidé et encouragé au cours de la réalisation de ce travail, recevez nos remerciements sincères

DEDICACE

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
L'amour, le respect, la reconnaissance...
Aussi, c'est tout simplement que*

*Nous dédions ce mémoire ...
À NOS CHERS PARENTS*

Aucune dédicace ne saurait exprimer notre respects, nos amour éternel et nos considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour notre instruction et notre bien-être.

A NOS FRERES, ET SŒURS

A NOS AMIES ET NOS CAMARADES.

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

Enfin, Nous voudrons dédier ce mémoire à toutes personnes ayant participé de loin ou de près à la réalisation de cet travaille.

MADJBAR Kenza et KALAFAT Soumia

TABLE DES MATIERES :

INTRODUCTION:	1
CHAPITRE 1 EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES	
1.1.Extraction des huiles essentielle.....	4
1.1.1. Définition d’huile essentielle :	4
1.1.2. Méthodes d'obtention des huiles essentielles	4
1.1.3. Le Rendement de l’extraction:.....	6
1.4 Comment conserver les huiles essentielles :	6
1.2. Généralités sur la graine de nigelle:.....	7
1.2.1 Description botanique de la plante Nigella sativa L.	8
1.2.2. Composition biochimique des graines de Nigella sativa l	9
1.2.3. Toxicité de la nigelle :	11
1.2.4. Propriétés pharmacologiques des graines de Nigella sativa:	11
CHAPITRE 2: FORMULATION D’UNE POMMADE ANTI-INFLAMMATOIRE	
2.1. Définition de la formulation.....	14
2.2. Les systèmes dispersés :.....	14
2.2.1 Les Suspensions	15
2.2.2 Les émulsions.....	16
2.2.2.1. Les différents types d’émulsions	17
2.2.2.2. Les tensioactifs	17
2.2.2.3. Les émulsions stables.....	19
2.3 Formes galéniques des médicaments	21
2.4. Les pommades	22
2.5. La peau.....	25
2.5. Conditionnement des pommades	27
CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES	
3.1. Matériels	29
3.2. Méthodes	33
3.2.1 Extraction de l’huile essentielle des grains de nigelle.....	34

3.2.2 Caractérisation de l'huile essentielle des grains de nigelle	36
3.2.3 Activités anti-inflammatoire de l'hydrolat de graine de nigelle in vivo	38
3.2.4 Formulation de la pommade anti-inflammatoire.....	40
3.2.5 Contrôles réalisés sur la pommade.....	44
3.2.6 Les activités Pharmacologiques :	47

CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSIONS:

4.1.. Extraction et caractérisation d'huile essentielle :	57
4.1.1 Examen organoleptique	57
4.1.2 Etude de rendement	57
4.1.3 Caractéristiques physico-chimiques	59
4.1.4 Activité anti-inflammatoire de l'hydrolat de N.Sativa :	59
4.1.5 Activité microbienne de l'hydrolat de N.Sativa	61
4.2 Formulation et caractérisation de la pommade	63
4.2.1 Formulation de la pommade	63
4.2.2 Caractérisation de la pommade	64
4.2.3 Activité anti-inflammatoire de la pommade à base d'HE de N.Sativa	70
4.2.4 Effet de la pommade sur les souches microbiennes	72
4.2.5 Observation clinique et cotation des réactions cutanées	73
Conclusion	76

BIBIOLOGRAPHE

APPENDICES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Rendement en HE de quelque plantes _____	7
Tableau.1.2 : Composition biochimique de la graine de nigelle _____	9
Tableau 3.1 : Proprietes physico-chimique des produits utilises. _____	33
Tableau 3.2 : Composition chimique et role des constituants de la pommade _____	330
Tableau 3.3 : Souches bacteriennes et fongiques utilisees _____	50
Tableau 4.1 : Proprietes organoleptiques de l'HE de graine de nigelle _____	57
Tableau 4.2 : Proprietés physico-chimiques des huiles essentielles de graine de nigelle ____	59
Tableau 4.3 : Activite anti-inflammatoire de l'hydrolat de graine de nigella sativa l comparée au diclofenac de sodium _____	60
Tableau 4.4 : Résultats de l'activite anti-inflammatoire de l'hydrolat des graines de nigelle, 3 heures apres l'induction de l'œdeme _____	60
Tableau 4.5 : mesure de l'activite inhibitrice de l'hydrolat de graine de nigelle sur différents souches microbiennes _____	62
Tableau 4.6 : Les formulations representant les pommades stables _____	66
Tableau 4.7 : : Les valeurs de ph en fonction de rapport (ϕ_h / ϕ_a) _____	68
Tableau 4.8 : Valeurs des parametres rheologiques du modele de sisko de la pommade elaboré et de la référence _____	70
Tableau 4.9 : Activite anti-inflammatoire de la pommade a base d'huile essentielle de graine de nigelle versus l'indometacine _____	70
Tableau 4.10 : Réduction de l'œdeme par la pommade après 4 heures de l'application cutané _____	71
Tableau 4.11 : mesure de l'activité inhibitrice de la pommade sur différents type de souches _____	73
Tableau 4.12 : les valeurs numeriques de l'evaluation de l'erytheme et l'œdeme suivant l'echelle de draize _____	733

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.1 : Aspect morphologique et classification botanique de la plante nigella sativa l. ...	9
Figure 2.1 : Différents types classiques d'emulsion:	16
Figure 2.2 : Représentation schématique d'une molécule tensioactif.....	18
Figure 2.3 :Schémas représentant les principaux mécanismes de destabilisation des émulsions.....	20
Figure 2.4 : Origine, présentation et mode d'administration des médicaments.....	21
Figure 2.5 : Schema de la structure de la peau humaine.....	26
Figure 3.1 : Aaspect morphologique des graines de N.sativa l utilisés	29
Figure 3.2 : Huile essentielle de graine de N.sativa l	30
Figure 3.3 : EPP utilisé.....	31
Figure 3.4 :Montage d'extraction par entrainement à la vapeur d'eau	35
Figure 3.5 : Montage de l'hydrodistillation	35
Figure 3.6 :Montage de l'hydrodistillation assisté par micro-onde.....	35
Figure 3.7 : Aspect de la phase huileuse et aqueuse	333
Figure 3.8 : Processus de fabrication.....	334
Figure 3.9 : Photographie d'un rheometre de type MCR 2004.....	427
Figure 3.10 :Position des disques dans la boite de petri.....	52
Figure 3.11 :Position de la pommade dans la boite de petri.....	53
Figure 4.1 : Variation de taux d'extraction de l'HE de graine de nigella sativa l en fonction de la methode extractive.....	57
Figure 4.2 : Transfert de chaleur sous chauffage classique et sous chauffage par micro-onde	58
Figure 4.3 : Evaluation de l'oedeme en présence d'un prétraitement par voie intra-péritonéale	61
Figure 4.4 : La Pommade élaborée	64
Figure 4.5 : Structure microscopique de la pommade de référence	65
Figure 4.6 : Structure microscopique de la pommade formulée.....	65
Figure 4.7 : Les pommades formulée après centrifugation.....	67
Figure 4.8 : Valeur de ph par le papier Ph.....	67
Figure 4.9 : Ajustement des courbes d'écoulement de l'essai par le modèle de rheologique de SSKO.....	69
Figure 4.10 : Ajustement des courbes d'écoulement de reference par le modele de rheologique de SSKO.....	69
Figure 4.11 : Resultats de l'activite anti-inflammatoire de l'hydrolat versus diclofenac de sodium et de la pommade formule versus l'indometacine	72
Figure 4.12 : Effet de la pommade sur la peau brulée	75

Introduction

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences simples en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde. En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales[1].

L'utilisation des huiles essentielles remonte aux plus anciennes civilisations : tout d'abord dans l'Orient et le Moyen Orient et par la suite au nord de l'Afrique et en Europe [2].

Les hydrolats (eaux aromatiques) étaient utilisés en Inde il y a plus de 7000 ans. Les plantes aromatiques figurent dans un traité publié en Chine par Shen Nung il y a environ 4 500 ans. Entre 3 000 et 2 000 ans avant notre ère, les Égyptiens faisaient un usage important des plantes aromatiques pour soigner les malades. Les premiers à utiliser l'hydrodistillation semblent être les Perses, 1 000 ans avant notre ère. L'utilisation des huiles essentielles était une pratique courante chez les Grecs et plusieurs livres ont été publiés sur le sujet. Des exemples de cette littérature sont « Histoire naturelle » de Pline, « Les Aphorismes d'Hippocrate », « Traité des odeurs » de Théophraste et Pédanius Dioscoride a écrit un ouvrage sur la phytothérapie. Les Arabes ont apporté une amélioration significative dans la chimie et dans la distillation des huiles. Vers la fin du XVI^{ème} et le début du XVII^{ème} siècle, plus de 100 huiles essentielles sont utilisées.

Dans l'histoire moderne, les vertus thérapeutiques des huiles essentielles occupent une place de plus en plus importante. En 1928, le chimiste français René-Maurice Gattefosse a utilisé le terme aromathérapie pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles lorsqu'il a découvert par accident que la lavande a guéri une brûlure à sa main. En 1964, le docteur français Jean Valunet a connu un certain succès en traitant des patients en médecine et en psychiatrie. Aujourd'hui, nous reconnaissons que les huiles essentielles ont des effets pharmacologiques, psychologiques et physiologiques sur l'homme.

La distillation peut être définie comme étant la séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux (ébullition ou sublimation); suite à cette définition, la distillation des plantes aromatiques reposerait sur l'évaporation des constituants de l'huile. Or, la réalité est bien différente ; les huiles essentielles se trouvant à l'intérieur du tissu du végétal doivent d'abord passer à la surface de ce dernier avant une éventuelle évaporation et distillation ; ce passage de l'intérieur du tissu vers la surface du matériel végétal (feuille par exemple) est supposé se faire essentiellement par diffusion.

Il est par ailleurs connu qu'au cours de l'hydrodistillation, la vitesse de vaporisation des huiles volatiles du matériel végétal est influencée, non seulement, par la résistance à la diffusion de l'huile essentielle à travers les tissus cellulaires, mais aussi par le degré de solubilité de ces constituants volatiles dans l'eau [3].

La matière végétale à distiller se trouve en contact direct avec l'eau bouillante. Il peut flotter ou être complètement immergé selon sa densité et la quantité de la matière manipulée. L'évaporation de l'eau dans l'alambic peut être réalisée par chauffage direct (alambic à feu nu) ou par injection de vapeur surchauffée.

Cette méthode est conseillée pour les matières premières qui, par nature, s'agglutinent facilement et donc empêchent la pénétration de la vapeur dans la masse végétale, telles que les pétales de roses, les fleurs d'orangers, etc. ; elle est encore à conseiller dans les cas où des produits indésirables ont une importante solubilité dans l'eau ; ils sont alors retenus et n'apparaissent pas dans l'huile recueillie.

Parmi les plantes médicinales existante nous nous sommes intéressés à la graine de nigelle en Algérie.

La nigelle nous offre des petites graines aromatiques menées d'un noire intense communément connues sous le nom de cumin noire, black seed en anglais, Habbat el baraka ou El Haba sauda en Arabe, En Algérie connue sous le nom vernaculaire Sinoudj[4].

Les graines nigelle cultivée, sont largement utilisées en médecine traditionnelle pour le traitement et la prévention de nombreuses maladies. Elles contiennent principalement une huile fixe et une huile essentielle, des protéines, des alcaloïdes et une saponine.

L'huile essentielle de nigelle possède de nombreuses propriétés. Elle est riche en acides gras insaturés et polyinsaturés, de vitamines et de minéraux. ses **propriétés**

semblent donc bien résumées par cette phrase de prophète **Mohammed** extraite des **recueils de hadith** : « **L'huile de cumin noir guérit toutes les maladies sauf la mort** »[5].

L'objectif général de ce travail est d'étudier la composition chimique et les propriétés anti-inflammatoire et antibactériennes des huiles essentielles de graine de nigelle à fin de formuler une pommade de propriété principale anti-inflammatoire et de procéder au contrôle de qualité des pommades obtenues .

Dans une première partie, une revue bibliographique sera présentée sur la description de la plante utilisée dans ce travail. , les huiles essentielles Les différentes techniques extractives et des notions générales sur la formulation seront également présentées dans cette partie.

La deuxième partie du manuscrit présentera le matériel et les méthodes utilisés, notamment l'extraction des huiles essentielles et l'analyse de leur composition chimique ; l'étude de l'activité antibactérienne et anti-inflammatoire de l'huile essentielle et de la pommade formulée terminera cette deuxième partie.

Les résultats obtenus, suivis de la discussion puis la conclusion et les perspectives feront l'objet de la troisième et quatrième partie, respectivement. Les références bibliographiques constitueront la dernière partie du manuscrit.

Chapitre 1

Extraction des huiles essentielle

1.1. Extraction des huiles essentielles :

1.1.1. Définition d'huile essentielle :

Une huile essentielle est la fraction odorante volatile extraite des végétaux. C'est le parfum concrétisé de la plante, un véritable concentré. Elle peut être extraite de différentes parties d'un végétal : les feuilles (ex : l'eucalyptus), les fleurs (ex : la camomille), l'écorce (ex : la cannelle), le bois (ex : le cèdre), le zeste (ex : le citron) et bien d'autres encore : les graines, les baies, les fruits, le bulbe... [6].

La norme ISO 9235 définit l'huile essentielle comme un « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. » [6].

1.1.2. Méthodes d'obtention des huiles essentielles :

Il existe plusieurs modes d'extraction comme l'hydrodistillation, l'expression à froid, l'enfleurage, l'extraction par solvants organiques, l'extraction par ultra-sons etc. Deux procédés sont principalement employés et font l'objet d'une monographie à la Pharmacopée : l'hydro- distillation/distillation à la vapeur d'eau et l'expression à froid[6].

□ L'hydro-distillation et la distillation à la vapeur d'eau

La matière végétale est immergée dans un bain d'eau, puis l'ensemble est porté à ébullition sous pression atmosphérique. Le chauffage de l'ensemble est effectué à la base de l'alambic, à l'aide d'un combustible : bois (alambic à feu nu) ou par la vapeur injectée dans la double enveloppe entourant l'alambic. La montée de la chaleur permet l'éclatement des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Le mélange est ensuite refroidi dans un vase florentin ou essencier. La différence de densité entre la phase aqueuse (eau florale) et la phase organique (huile essentielle) permet la séparation des deux entités. Dans la distillation à la vapeur d'eau, la matière première est déposée sur une grille (à sec). Selon l'épaisseur des tissus du matériel végétal, cette technique peut prendre plus ou moins

de temps selon la polarité des constituants. La présence de l'eau dans l'hydrodistillation peut entraîner des phénomènes d'hydrolyse, phénomènes limités par l'absence de contact entre le végétal et l'eau dans la distillation à la vapeur d'eau. Ceci explique la moindre utilisation de l'hydrodistillation[6].

L'entraînement à la vapeur est une technique largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. L'avantage de cette technique réside en l'abaissement de la température de distillation ; les composés sont donc entraînés à des températures beaucoup plus basses que leur température d'ébullition, ce qui évite leur décomposition[6].

□ **L'expression à froid**

Cette technique sans chauffage est réservée à l'extraction des zestes des agrumes. Le principe est mécanique. Il est fondé sur la rupture des péricarpes, réservoirs d'essences olfactives, en passant les agrumes sur des récipients dont les parois sont recouvertes de pics en métal. L'essence est libérée par un courant d'eau, puis décantée. La présence de l'eau peut entraîner des phénomènes d'hydrolyse, de contamination par des pesticides résiduels ou des micro-organismes. Une nouvelle technique physique basée sur l'ouverture des sacs oléifères par éclatement sous l'effet soit d'une dépression, soit par abrasion de l'écorce fraîche, éliminerait l'eau et diminuerait les effets d'oxydation des composés de ces essences [6].

□ **Autres techniques :**

Enfleurage :

La technique de l'enfleurage (ou macération à saturation) est ancienne, et n'est plus guère usitée. Elle concerne les plantes ou parties de plantes dont l'arôme est trop fragile pour supporter la chaleur d'une distillation. Elle consiste à étendre une couche de ces substances végétales fragiles entre deux couches épaisses de matière grasse. On renouvelle les matières végétales fraîche jusqu'à saturation de la graisse en fragrance. On débarrasse alors le parfum de l'excédent gras et l'on obtient une essence absolue (ou absolu), une huile essentielle de très haute qualité olfactive [7].

Extraction par solvant :

La technique de l'extraction par solvants remplace aujourd'hui celle de l'enfleurage. Elle aboutit également à l'obtention d'absolus très recherchés par les parfumeurs pour la pureté de leur puissante odeur [7].

Hydro-distillation assistée par micro-ondes :

Ce procédé basé entièrement sur le principe de l'hydro-distillation classique consiste à placer une partie du montage d'hydro-distillation dans le four à micro-ondes. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités par ces auteurs sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydro-distillation classique[8].

1.1.3. Le Rendement de l'extraction:

La teneur en HE varie en fonction des drogues, mais elle reste en général très faible, inférieure à 1%. Le rendement de la distillation est donc limité de plusieurs kilogrammes à plusieurs tonnes d'organes producteurs sont nécessaires pour obtenir un kilogramme d'HE (voir tableaux 1.1). Le volume de matériel à récolter est souvent important, ce qui explique les coûts élevés de certaines HE, notamment la rose de Damas ou le néroli bigaradier [6].

La méthode d'obtention des huiles essentielles intervient de façon déterminante dans le rendement en huile et dans la composition de cette dernière. Les différentes parties de l'appareil de distillation peuvent être à l'origine de modifications, plus ou moins importantes, de leur composition chimique. La distillation des petites charges au laboratoire ou dans des installations pilotes donne un produit pouvant être sensiblement différent de celui que l'on obtient à l'échelle industrielle [9]. Il faut donc être prudent quand on établit, à partir de ce type de données expérimentales, des prévisions pour des productions commerciales.

1.1.4 Comment conserver les huiles essentielles :

Les HE de bonne qualité se conservent 5 ans mis à part les essences de zeste de Citrus (pamplemousse, citron, orange, bergamote) qui se conservent 3 ans. Ce temps de conservation n'est réel que si l'HE est conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité : le flacon doit être opaque, composé de verre teinté ou d'aluminium (estagnon) et il faut veiller à toujours refermer le flacon après son utilisation [10].

Il est préférable de conserver les flacons d'HE à une température comprise entre 5 et 35 degrés[10].

Des normes spécifiques fixent les règles d'emballage, de conditionnement et de stockage des huiles essentielles[10].

Selon la norme NF T 75-002, l'étiquetage doit comporter «la désignation commerciale de l'huile essentielle, le nom latin de la plante, la partie de la plante dont elle est extraite, la technique de production ou le traitement spécifique qu'elle a subi : distillation ou pression»[10].

Tableau 1.1 : rendement en HE de quelque plantes [6] [11].

Plante	Organe producteur distillé	Poids de matériel nécessaire à l'obtention de 1Kg
Clou de Girofle	Boutons floraux séchés	7 Kg
Badiane de Chine	Fruits	20 Kg
Ylang-ylang	Fleurs	50 Kg
Lavandin	Sommités fleuries	50 Kg
Lavande vraie	Sommités fleuries	150 Kg
Menthe poivrée	Feuilles	1000 Kg
Thym vulgaire	Partie aérienne	1200 Kg
Rose de Damas	Pétale	4000 Kg
Nigella sativa.l	graine	5 Kg

1.2. Généralités sur la graine de nigelle:

La Nigelle est une plante de grande notoriété, surtout à l'échelle du monde Arabe, où elle est souvent mentionnée comme étant une panacée. Sa renommée en tant que plante médicinale et condimentaire dans les pays allant du Proche au Moyen Orient remonte à plusieurs siècles. Durant ces vingt dernières années, de nombreuses équipes de chercheurs

se sont intéressées à la *N. sativa*. De nombreuses publications scientifiques paraissent régulièrement que ce soit pour étudier la composition des graines de Nigelle et de ses extraits, ou pour explorer le champ de son potentiel thérapeutique. La plupart des indications revendiquées en médecine traditionnelle ont été confirmées et d'autres propriétés sont venues se greffer [11].

N. sativa est une plante appartenant à la famille des Renonculacées C'est une herbe originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie. Elle est cultivée dans les régions tropicales et semi arides. Les pays producteurs de la nigelle sont principalement la Syrie, l'Égypte, l'Arabie Saoudite, la Turquie, l'Iran, le Pakistan et l'Inde [11].

La nigelle possède trois noms latins *Cuminum nigrum*, *Nigella indica* et *Nigella sativa*, ce dernier étant le plus employé. Ce sont des noms dérivés du latin "Niger " qui signifie noir.

Le *Nigella. sativa* possède aussi une multitude de noms à travers le monde (voir appendice B), En Algérie, elle est connue sous le nom vernaculaire de Sinoudj [11].

1.2.1. Description botanique de la plante *Nigella sativa* L.

Le *Nigella sativa* L. (Renonculacée) est une plante annuelle herbacée, atteignant 30 à 60 cm de haut. Ses fleurs sont petites, à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle.

Les feuilles, pennatiséquées, divisées en lobes étroits, sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères. Les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues.

La plante est hermaphrodite à reproduction autonome et forme des capsules qui contiennent des graines blanches.

À maturité, les capsules s'ouvrent par une fente interne et exposent les graines à l'air, ce qui les rend noires.

Les graines du *Nigella sativa* L sont ovoïdes de 2 à 3.5 mm qui présentent 03 à 04 ongles et la face supérieure est finement granuleuse et réticulée [12].

- Sous règne : *cormophyte*
- Supra embranchement : *Rhizophyte*
- Embranchement : *Spermatophyte*
- Sous embranchement : *Angiospermes*
- Ordre : *Ranunculales*
- Famille : *Ranunculcée*
- Sous famille : *Helloboroidées*
- Genre : *Nigella*
- Espèce : *Nigella sativa*



Figure 1.1: Aspect morphologique et classification botanique de la plante N.sativa l [13].

1.2.2. Composition biochimique des graines de Nigella sativa l

La graine de nigelle contient plus de cent composants dont beaucoup restent à découvrir le tableau 1.2 regroupe la composition biochimique de la graine de nigelle cultivée dans différents pays[14].

Tableau 1.2 : Composition biochimique de la graine de nigelle d'après [14].

Constituant	Egypte	Tunisie	Iran
Humidité (%)	6.4	Nd	Nd
Protéine (%)	20.6	26.7	22.6
Lipides totaux (%)	37.4	28.48	40.35
Cendres	4.8	4.86	4.41
Sucres totaux	30.8	40.0	32.7

Nd : non définie.

Les graines de nigelle sont de bonne source de protéines et d'huile les valeurs comme présentées dans le tableau 1.2. Ce dernier montre que le composé majeur de graine de nigelle est les lipides avec un taux qui varie entre 28.48 et 40.35 % d'une région à l'autre.

Les graines de *Nigella sativa* L. contiennent principalement une huile fixe et une huile essentielle, des protéines, des alcaloïdes et une saponine.

Les huiles fixes représentent 37,9-39,2% du poids de la graine. Elle est constituée principalement de lipides neutres 96,1%-97,2%, de lipides polaires 3% et de phospholipides 0,32-1,05% [11].

Les stérols représentent environ 2% de l'huile fixe. On y trouve aussi des stérols libres et estérifiés. L'analyse des stérols libres montre que le β -sitostérol représente le composant majeur soit 60% des stérols, puis arrive le stigmastérol avec environ 20%. On peut rencontrer le cholestérol à l'état de traces, environ 1% [11].

Dans ces huiles, les principaux acides gras saturés sont essentiellement l'acide palmitique, l'acide stéarique et l'acide myristique, tandis que les acides gras insaturés majoritaires sont l'acide linoléique et l'acide oléique. L'analyse des phospholipides par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis d'identifier principalement sept constituants où le phosphatidyl choline représente le composant majoritaire [11].

La composition chimique des huiles essentielles des graines de *Nigella sativa* dépend de plusieurs facteurs, comme par exemple les conditions environnementales et climatiques, la saison de la cueillette des plantes, les conditions de stockage, la méthode utilisée pour l'extraction des huiles essentielles et les conditions d'analyses (type de colonne, température programmée ...) employées pour l'identification des constituants de ces huiles.

L'analyse de cette huile par GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy) réalisée par l'équipe de Bucar [15] a permis d'identifier 32 composants, dont la majorité d'entre eux sont ; la thymoquinone (27,8%-57 %), le p-cymène (7,07-15,83 %) et le carvacrol (5,8-11,6 %) (Burits et Bucar., 2000). Contrairement à l'étude précédente, Moretti et ses collaborateurs ont trouvé que le composant majeur est le p-cymène suivi du thymol alors que la thymoquinone présente un taux faible [15].

La particularité de l'huile de *Nigella sativa* est la présence de quinones : **thymoquinone** et thymohydroquinone ; et d'un composé phénolique : thymol. Ces quinones sont les composés actifs de l'huile de Nigelle qui lui confèrent d'importantes propriétés pharmacologiques. La photodimérisation de la thymoquinone aboutit à la dithymoquinone anciennement citée sous le nom de nigellone [11].

L'huile essentielle des graines de *Nigella sativa* contient également des alcaloïdes;

- Nigellicine[11];
- Nigellimine N-oxyde[11] ;
- Nigellidine, ayant un noyau indazol[11] ;
- L'isoquinone nigellimine[11] ;
- les alcaloïdes diterpènes Dollabllane-types nigellamines A1, A2, A3, A4, A5, B1, B2 et C [11].

Ce qui est très intéressant dans la graine de Nigelle c'est cette présence concomitante de 12 alcaloïdes de trois structures de base différentes, ces alcaloïdes est une caractéristique rarement observée dans d'autres plantes[11].

1.2.3. Toxicité de la nigelle :

Les graines de nigelle sont largement consommées comme épice et comme plante médicinale, il importe donc de savoir que :

- La toxicité de la nigelle est pratiquement nulle en ce qui concerne la consommation des graines, de l'huile ou de l'extrait aqueux[15].
- Seules la thymoquinone (La TQ avec une DL50 à 10 mg/kg de poids corporel), et l'huile essentielle possèdent une toxicité chez la souris en injection intrapéritonéale[15].

Cependant, il manque encore des études sur la tolérance cutanée de l'huile, la mutagénicité et la toxicité de l'huile essentielle par voie orale.

1.2.4. Propriétés pharmacologiques des graines de *Nigella sativa*:

Les huiles essentielles ont de nombreuses propriétés médicinales en commun, elles sont efficaces pour de nombreux germes et virus ainsi que les mycoses. Chaque huile essentielle à sa spécificité thérapeutique, il est nécessaire de suivre les conseils de la fiche technique du fabricant ou de lire de la bibliographie très spécialisé, de préférence écrit par des médecins ou des pharmaciens [16].

□ Effets sur le système immunitaire :

Une étude a montré que des rats vaccinés par un antigène typhoïdique ont eu une baisse de 2 fois de la production d'anticorps après administration d'huile essentielle de *Nigella sativa*. Sur la réponse antigénique spécifique, *Nigella sativa* L. diminuerait donc la réponse humorale et au contraire elle stimulerait la réponse cellulaire [17].

□ **Activités anti-oxydantes :**

Plusieurs études *in vitro* se sont intéressées à l'activité antioxydante de l'huile essentielle de nigelle. Ses monoterpènes (thymoquinone, carvacrol, t-anéthol et 4-terpinéol) possèdent une activité anti-radicalaire qui peut être mise en évidence par divers procédés [16].

□ **Effets anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique**

L'huile essentielle de nigelle et la TQ ont été utilisées pour déterminer leurs effets sur la douleur ressentie par des rats soumis à différents tests nociceptifs [17].

Les polyphénols de la graine de nigelle ont été testés; leur administration par voie orale diminue les effets nociceptifs, alors que l'administration par voie orale et intrapéritoneale supprime de façon (dose-dépendante la réponse) douloureuse [17].

En plus de ces études de nombreux travaux ont confirmé et expliqué l'effet anti-inflammatoire et analgésique des graines de nigelle [17].

Trois types de mécanismes anti-inflammatoires ont été mis en évidence dans les différentes études, l'inhibition de la production d'eicosanoïdes, l'inhibition de la synthèse de prostaglandines et la diminution de la production de monoxyde d'azote [17].

Chez le rat, l'extrait aqueux de graines de Nigelle par voie orale (500 mg/kg) administré après injection sous cutanée d'une solution de levures (afin de provoquer une fièvre) n'a pas permis de réduire la température rectale contrairement au témoin positif représenté par l'aspirine [18]. Par contre, les extraits aqueux et méthanolique injectés par voie intrapéritonéale chez la souris faisaient significativement chuter la température rectale après 30 minutes de l'injection ($-3,15 \pm 0,35^{\circ}\text{C}$ et $-2,18 \pm 0,41^{\circ}\text{C}$, respectivement)[19].

□ **Activité antibactérienne et antifongique**

L'activité antibactérienne des huiles volatiles de *N. sativa* a été démontrée sur 37 souches de *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* et *Shigella boydii* ainsi que 10 souches de *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* [17].

Bourgou et collaborateurs [17] ont montré l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle obtenue à partir des graines de *Nigella Sativa* tunisiennes contre *Staphylococcus aureus* (Gram positif) et *Escherichia coli* (Gram négatif). L'évaluation des activités des composés volatils présents dans l'huile a suggéré que la TQ et le longifolène aient été en grande partie responsable de l'activité d'huile contre *Staphylococcus aureus*, alors que la TQ possède une bonne activité contre *Escherichia coli*.

□ **Activité antitumorale**

L'huile essentielle, isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées cellulaires tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération de métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé une tumeur[20].

En effet, la TQ exerce, *in vitro* et *in vivo*, un effet inhibiteur de la carcinogenèse de l'estomac et du fibrosarcome induit par le 2ométhylocholanthrène chez la souris [17].

□ **Activité antidiabétique**

Des études démontre que l'huile essentielle de la graine administrée par voie intrapéritoneale, à raison de 50 mg/kg, abaisse de façon significative, de 15 à 23% la glycémie à jeun chez les animaux normo et hyperglycémiques [17].

□ **Activités hypocholestérolémiante et hypolipémiante**

Une étude sur des rats montra que la thymoquinone administrée par voie intragastrique réduit les taux sanguins de cholestérol, TG et LDL au bout de quatre jours seulement [17].

A côté de ces propriétés pharmacologiques, d'autres effets ont été aussi rapporté, notamment des effets antiathérogènes, et, anti-hypertensifs et antitussifs[21].

Chapitre 2 :
Formulation d'une pommade
anti-inflammatoire

2.1. Définition de la formulation :

La formulation recouvre l'ensemble du savoir-faire nécessaires au développement et à la fabrication d'un produit commercial caractérisé par sa valeur d'usage et répondant à un cahier des charges préétabli.

Un produit formulé est obtenu par association et mélange de diverses matières premières d'origine synthétique ou naturelle parmi lesquelles on distingue généralement les matières actives qui remplissent la fonction principale recherchée et les auxiliaires de formulation qui assurent les fonctions secondaires, facilitent la préparation ou la mise en œuvre du produit commercial, ou prolongent sa durée de vie.

La formulation est autrement la science des mélanges, elle est à la croisée de beaucoup de domaines industriels et omniprésente au quotidien dans les différents secteurs de l'industrie à savoir :

- Cosmétique, galénique, pharmacie ;
- Engrais, insecticides, produits phytosanitaires ;
- Peintures, encres, vernis, colles ;
- Détergence, produits d'entretien ;
- Bitumes, bétons, ciments, matériaux de construction ;
- Lubrifiants, combustibles, produits pétroliers ;
- Polymères, plastiques, caoutchouc ;
- Agro-alimentaire : produits frais, gâteaux, bonbons ;
- Papier, carton ;
- Textiles techniques ;

2.2. Les systèmes dispersés

On appelle matériaux dispersés tous systèmes formés de petits domaines d'une phase, dispersés dans une autre phase. Ces phases peuvent être des liquides homogènes, des solides ou des gaz.[22].

Une dispersion est composée essentiellement de deux phases différentes, pourtant elle est généralement classifiée dans la catégorie des systèmes complexes. Ceci est due au

fait qu'il est nécessaire d'ajouter de nombreux aditifs en faibles proportions tels que les polymères, tensioactifs, sels, alcool, particules [22].

D'un point de vue physicochimique, nous parlons d'émulsions, de mousses, de gels, de suspensions, de poudres et de solutions aqueuses et huileuses[23].

2.2.1. Les Suspensions :

Les dispersions solide-liquide sont des systèmes formés d'un liquide dans lequel sont immergées de petites particules solides. Typiquement, la phase continue liquide est une phase aqueuse ou huileuse et les particules solides des oxydes métallique ou des polymères organique .La plupart des dispersions sont utilisés comme intermédiaire de fabrication, d'autre sont utilisées telles quelles, comme vecteur de molécules actives (en pharmacie ou dans les produits de soins corporels) ou comme agent de capture de molécule cibles dans les testes de diagnostique médical [24].

La dispersion de poudres fines en milieu liquide est un procédé mis en œuvre quotidiennement. Pour les industriels, elle est souvent une étape de la fabrication d'un produit [25].

Dans l'industrie pharmaceutique, avant d'intégrer leur forme galénique définitive, nombres de préparations subissent une étape de dispersion en milieu liquide (majorité des antibiotiques).

En industrie cosmétique les poudres doivent être réparties uniformément dans les crèmes qu'elles soient nettoyantes, solaires ou autres. Il en est de même pour l'industrie des pigments, peinture[25].

On peut citer de nombreux exemples aussi bien dans le domaine industriel (peintures, encres, pâtes à papiers, pâtes de ciments, les boues, les barbotines céramiques, fluides de forage pétrolier, barbotines céramiques, bains de traitements de surfaces des métaux et alliages, membranes filtrantes, procédés sol-gel...), naturel (sédiments, traitements des eaux...) que biologique (gélatine, lait, sang...)[26].

Dans la formulation des suspensions chaque principe actif a ses caractéristiques physicochimiques propres (solubilité, pH, point de fusion, état cristallin, sensibilité à la lumière, stabilité, taille des particules, etc.) qui vont guider le choix des autres substances (excipients) constituant la suspension. L'objectif est que la suspension ait une vitesse de sédimentation relativement lente (après agitation, elle doit rester homogène toute la durée du prélèvement). Il faut que le sédiment formé ait un aspect floconneux et qu'il soit facile à remettre en suspension par simple agitation du flacon [27].

2.2.1.1 Stabilité des suspensions:

Une des caractéristiques communes des suspensions est qu'elles sont Thermodynamiquement instables. Pour certaines applications (cosmétique, pharmacie, peinture, céramique, ...), un des verrous scientifiques et technologiques à lever est de stabiliser ces milieux au moins pour la durée d'utilisation souhaitée. Cette durée peut être des heures, des jours, des mois ou des années [27].

Deux conditions doivent être remplies pour obtenir une suspension stable : la taille des particules doit être telle que les effets de la pesanteur sont négligeables, parmi les différentes forces interparticulaires, les interactions répulsives doivent être dominantes. Ce résultat peut être obtenu en modifiant l'interphase particules/milieu dispersant par ajout d'électrolytes ou de macromolécules (stabilité et comment stabiliser les suspensions) [27].

2.2.2. Les émulsions :

Une émulsion se définit comme un « système hétérogène thermodynamiquement instable, comportant au moins deux phases liquides non miscibles dont l'une est dispersée dans l'autre sous forme de gouttelettes dont le diamètre est en général supérieur à 0,1 micromètre.

La phase huileuse (ou phase grasse) contient les ingrédients type huiles, cires, graisses ainsi que des actifs liposolubles ; la phase aqueuse est quant à elle constituée d'eau et des composants hydrosolubles [28].

Le liquide sous forme de gouttelettes est qualifié de phase dispersée (ou phase discontinue), tandis que l'autre liquide est appelé phase dispersante (ou phase continue). On peut alors obtenir des émulsions huile-dans-eau (H/E) ou eau-dans-huile (E/H), comme l'indique la Figure.2.1 [28].

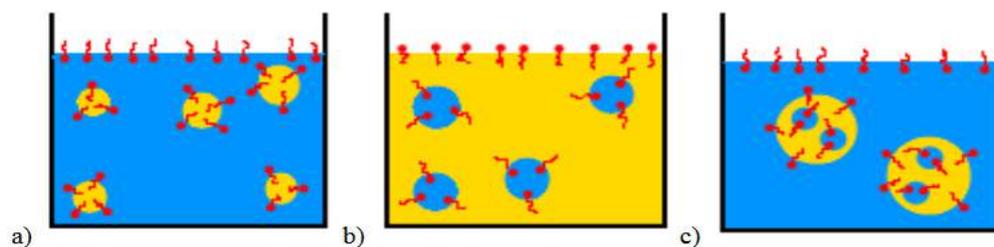


Figure 2.1: Les différents types classiques d'émulsion: a) émulsion huile dans eau (H/E).

b) émulsion eau dans huile E/H; c) émulsion double eau dans huile dans eau E/H/E.

Le tensioactif est représenté en rouge.

En général, la fraction volumique de la phase continue est plus importante, mais lorsque celle-ci est inférieure à 30%, on parle d'émulsions concentrées (Solans, Esquena & Azemar 2003).

Les émulsions sont constamment présentes dans notre vie quotidienne. Elles interviennent à l'état naturel (lait), comme résultat non désiré d'un procédé (extraction du pétrole et dégraissage), comme étape d'un procédé (fabrication de certains thermoplastiques) ou comme produit fini [29]. Dans ce dernier cas, le but est de stabiliser au maximum les émulsions afin de les commercialiser. Ces émulsions peuvent être produites dans les industries cosmétique (crèmes hydratantes, crèmes solaires), agroalimentaire (vinaigrette, mayonnaise), pharmaceutique (encapsulation de principes actifs), biologique (cellules) ou autres (peintures, bitumes)[30].

2.2.2.1. Les différents types d'émulsions :

Il existe différents types d'émulsions.

- Les émulsions simples parmi lesquelles on distingue les macro-émulsions et les nano-émulsions, différant par la taille des gouttelettes (respectivement supérieures et inférieures au micromètre) ;
- Les émulsions multiples, qui consistent en une émulsion simple dispersée à son tour dans une phase continue externe ;
- Les microémulsions, qui sont des systèmes monophasiques particuliers et dont la taille des gouttelettes varie entre 10 et 100 nm[31].

2.2.2.2. Les tensioactifs :

❖ Définition :

Les tensioactifs (également appelés surfactants ou agents de surface) sont les molécules émulsifiantes les plus utilisées. Elles sont classées par leurs propriétés chimiques ou physicochimiques [32].

Les tensioactifs sont de petites molécules amphiphiles ayant des propriétés émulsifiantes. De par la présence d'un pôle hydrophile et d'un pôle lipophile, ces molécules se placent à l'interface entre les phases de l'émulsion. Du côté hydrophile de l'interface, le tensioactif établit des liaisons hydrogènes et des liaisons ioniques avec la phase aqueuse. Du côté lipophile, la molécule établit des liaisons de Van der Waals et des interactions hydrophobes avec la phase grasse. Cette disposition permet de diminuer la

tension interfaciale du système, ce qui favorise l'émulsification (diminution de l'énergie à apporter) et stabilise l'émulsion [32, 33] .

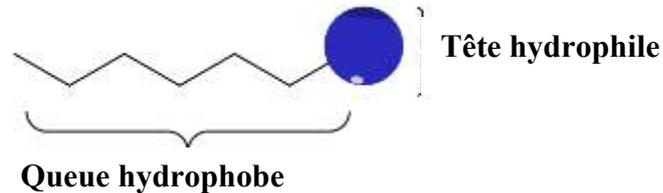


Figure 2.2 : Représentation schématique d'une molécule de tensioactif.

❖ Classification des tensioactifs :

Il existe différentes classifications possibles des tensioactifs. Ils peuvent être classés en fonction :

- De la longueur de la partie lipophile qui permet de classer les tensioactifs en agents mouillants (C8-C10), détergents (C12-C16), émulsionnants ou adoucissants (C18-C22) ;
- De leur origine, naturelle ou synthétique ;
- De la nature de leur tête polaire (non ionique, anionique, cationique ou amphotère) [34].
 - ✓ Les tensioactifs anioniques ;
 - ✓ Les tensioactifs cationiques ;
 - ✓ Les tensioactifs ;
 - ✓ Les tensioactifs non ioniques.

❖ Rôle des tensioactifs :

Les agents tensioactifs jouent des rôles très variés dans le processus d'émulsification. Certains rôles sont bien identifiés, d'autres restent sujets à controverse.

Abaissement de la tension interfaciale

C'est évidemment la première fonction qui vient à l'esprit.

La tension interfaciale entre la plupart des huiles et l'eau est de l'ordre de 30 à 50 mN/m. L'addition de polymères tensioactifs peut faire descendre cette valeur à 10 mN/m. De bons émulsifiants permettent d'atteindre 1 mN/m, et certains mélanges tensioactif-

cotensioactif utilisés à forte concentration donnent des tensions interfaciales de quelques mN/m [35].

2.2.2.3 . Les émulsions stables :

Une émulsion est instable thermodynamiquement. La stabilité des émulsions ne peut être atteinte que si le formulateur est capable de ralentir ou d'inhiber les mécanismes physiques qui conduisent normalement à la démixtion des phases non miscibles [29].

❖ Mécanismes de déstabilisation :

Au cours du temps, une émulsion évolue généralement vers l'équilibre thermodynamique, c'est-à-dire vers une séparation appelée "démixtion" des phases, correspondant à une surface de contact minimale entre la phase aqueuse et la phase huileuse [36].

On peut identifier 5 phénomènes distincts dans la perte de stabilité d'une émulsion (Figure 2.3), sachant que la déstabilisation est un concept cinétique dans un état thermodynamique métastable [37].

Ces cinq facteurs de déstabilisations sont :

- ✓ La floculation ou agrégation de gouttelettes,
- ✓ Le crémage et la sédimentation,
- ✓ La coalescence,
- ✓ Le phénomène de maturation d'Ostwald,
- ✓ L'inversion de phase.

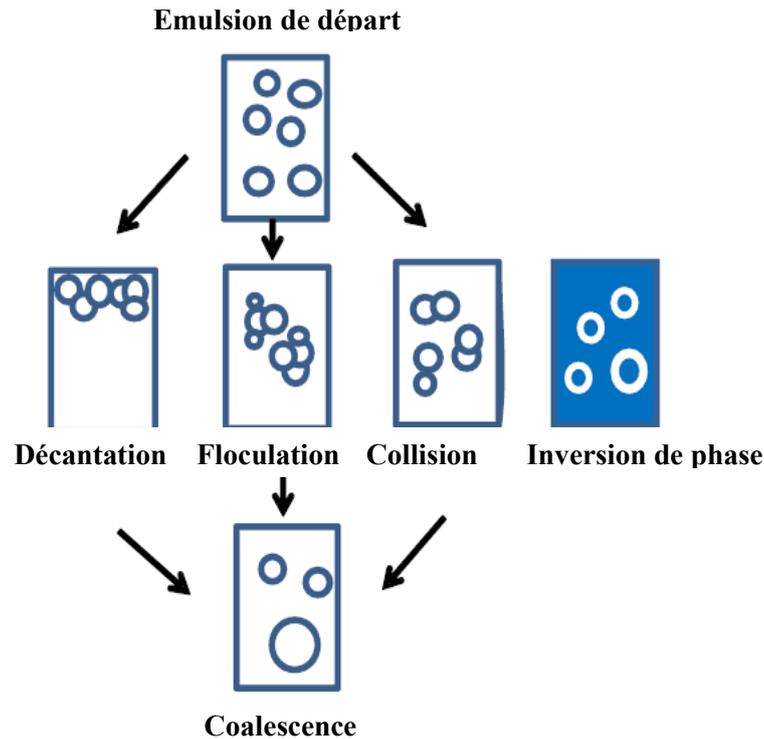


Figure 2.3: Schémas représentant les principaux mécanismes de déstabilisation des émulsions.

❖ **Stabilisation des émulsions :**

Il est possible de stabiliser les émulsions sur une durée qui peut aller de quelques heures à quelques années.

La stabilité des émulsions peut être assurée par :

✓ **Stabilisation électrostatique :**

Des répulsions électrostatiques apparaissent lorsque, en solution aqueuse, les gouttes sont stabilisées par un tensioactif ionique. Les gouttes sont alors chargées en raison de l'ionisation partielle des fonctions polaires des agents de surface. La présence de cette charge de surface crée une organisation spatiale des ions (présente dans la phase continue) au voisinage de la surface. Les ions de même signe que la surface (Co-ions) sont écartés tandis que les ions de signe contraire (contre ions) sont attirés [34].

✓ **Stabilisation stérique :**

Les polymères présents à l'interface stabilisent des systèmes colloïdaux en développant des interactions stériques. Ces forces répulsives sont d'origine entropique et

dépendent du degré de couverture de la surface et des caractéristiques de la phase continue. Pour un taux de couverture assez faible, les chaînes polymériques sont isolées les unes des autres et prennent une conformation de type (champignon) .lorsque la densité en chaîne est élevées, les interactions latérale modifient l'extension des chaînes, elles s'interpénètrent et prennent une conformation de type (brosse). L'état d'étirement des chaînes a une influence sur l'amplitude et la portée des répulsions stérique (portée plus longue dans le cas de chaîne étirées que dans le cas de polymères en pelote [38].

2.3 Formes galéniques des médicaments :

2.3.1 Définition :

La galénique est l'art de la formulation (pharmaceutique, bien entendu),.La forme galénique correspond à la forme selon laquelle on prend un médicament (gélule, comprimé, sirop, pommade, etc.)[39].

Le terme de « galénique » provient du nom de Claudius Galenus (Galien), médecin ayant vécu au IIème siècle av. J. -C à Rome. Il s'intéressa tout particulièrement à la formulation et à la préparation des médicaments. La « pharmacie galénique » est maintenant la science et l'art de préparer, conserver et présenter les médicaments.

Avant la mise sur le marché, chaque médicament doit faire l'objet d'une étude de composition, de forme et de présentation qui conviennent le mieux à son administration, permettant ainsi de garantir la précision du dosage, une stabilité satisfaisante pendant une durée déterminée et d'en rendre l'administration la plus facile possible.

Schématiquement, un médicament se compose de principe(s) actif(s), d'excipient(s), l'ensemble étant contenu dans un récipient [40, 41].

Principe(s) actif(s) + excipient

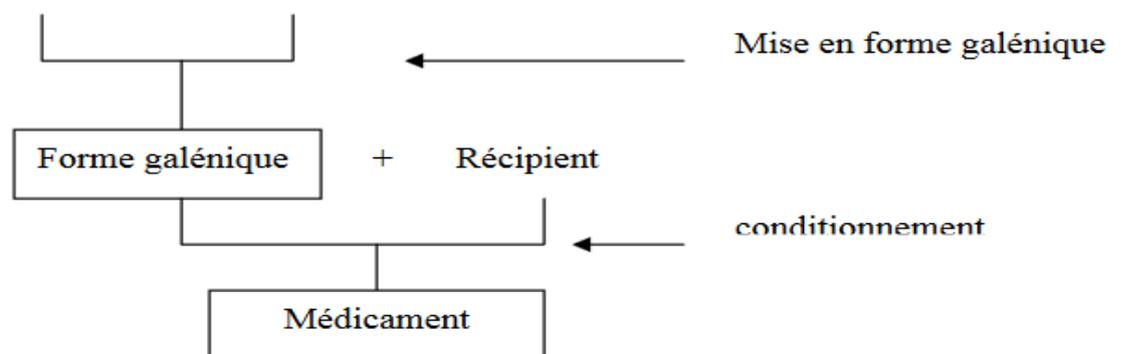


Figure 2.4 : Origine, présentation et mode d'administration des médicaments.

Le choix de la forme galénique découle de celui de la voie d'administration. Bien que l'éventail des possibilités ne cesse d'augmenter du fait des succès de la recherche galénique en ce domaine, on aura presque toujours recours à un nombre limité de formes courantes ; dans la majorité des cas, on se limite à une ou deux alternatives [42].

2.3.2 Caractéristiques des principales formes galéniques :

✓ Crème dermique : pommade de consistance molle, peu grasseuse et peu épaisse, constituée d'une émulsion H /E ou E/H ; cette composition favorise la pénétration dans les tissus cutanés. Conditionnement en pot ou en tube.

✓ Pâte dermique : pommade renfermant de fortes proportions de poudres dispersées dans l'excipient.

✓ Pommade : préparation de consistance molle, onctueuse et épaisse, d'aspect homogène, destinée à être appliquée sur la peau ou sur certaines muqueuses, en vue d'une action locale ou parfois générale après pénétration percutanée.

Contrairement aux crèmes, les pommades présentent une phase aqueuse en quantité limitée.

✓ Solution et lotion à usage externe : forme liquide obtenue par dissolution ou dispersion de principes actifs dans un véhicule aqueux ou légèrement alcoolisé, destinée à l'application sur la peau sans friction [42].

2.4. Les pommade :

2.4.1. Définition de la pommade :

Les pommades sont des préparations de consistance molle destinées à être appliquées sur la peau, Elles sont généralement constituées de plusieurs principes actifs dissous dans un excipient. Aujourd'hui, cet excipient est de nature grasse. Mais avant les premières pommades étaient préparées à partir de pulpe de pomme... d'où leur nom.

On distingue les pommades dermiques (pour la peau), ophtalmiques (pour les yeux) et anales (pour l'anus). Elles peuvent être employées pour leur action locale protectrice ou thérapeutique, ou une action plus générale.

Les pommades se composent d'une base monophasique dans laquelle peuvent être dispersées des substances liquides ou solides.

❖ Les pommades hydrophobes : Les pommades hydrophobes (lipophiles) ne peuvent absorber normalement que de petites quantités d'eau. Les substances les plus

communément employées pour la formulation de telles pommades sont la vaseline, la paraffine, la paraffine liquide, les huiles végétales ou les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides.

❖ Les pommades absorbant l'eau : Ces pommades peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau. Leurs excipients sont ceux d'une pommade hydrophobe dans lesquels sont incorporés des émulsifiants du type eau- dans- huile tels que la graisse de laine, des alcools de graisse de laine, des esters de sorbitanne, des mono glycérides, des alcools gras.

❖ Les pommades hydrophiles : Les pommades hydrophiles sont des préparations dont les excipients sont miscibles à l'eau. Ces derniers sont constitués habituellement par des mélanges de polyéthylène glycols (macro gels) liquides et solides. Ils peuvent contenir des quantités appropriées d'eau.

2.4.2. Les pommades anti-inflammatoires :

La pommade anti-inflammatoire est un produit médical utilisé en application locale sur la peau. Elle est obtenue en mélangeant des substances grasses dans une solution aqueuse, à des principes actifs destinés à combattre les inflammations. La pommade anti-inflammatoire peut être utilisée pour soigner diverses douleurs musculaires et articulaires d'origine inflammatoire comme dans des traumatismes de type entorses, tendinites, ou dans certaines maladies chroniques des articulations comme les spondylarthropathies ou l'arthrose. Il est généralement indiqué de masser la zone atteinte jusqu'à pénétration complète de la pommade, plusieurs fois par jour.

2.4.3. Formulation d'une pommade :

La formulation d'un médicament correspond à l'ensemble des substances qui entrent dans sa composition [43].

Dans la formulation on distingue deux sortes de composés : le principe actif et les excipients [44] .

EXCIPIENTS + des PRINCIPES ACTIFS + des ADDITIFS

✓ **Principe actif :** La substance active, ou le principe actif d'un médicament désigne chacun des composants de ce médicament qui possède un effet thérapeutique. Cette substance est souvent en très faible proportion dans le médicament par rapport aux excipients. Cela peut être une substance pure chimiquement définie (plus ou moins abusivement qualifiée de «molécule») ou un mélange de plusieurs substances

chimiquement proches (isomères, par exemple) ou encore une substance définie par son mode d'obtention.

✓ **Excipient** : Un excipient désigne toute substance autre que le principe actif dans un médicament, un cosmétique ou un aliment. Son addition est destinée à conférer une consistance donnée, ou d'autres caractéristiques physiques ou gustatives particulières, au produit final, tout en évitant toute interaction, particulièrement chimique, avec le principe actif.

Un excipient n'est donc pas défini par une composition chimique particulière mais par son utilisation, qui découle de ses propriétés physico-chimiques qui le rendent aptes à remplir son rôle d'excipient [45].

Choix des excipients

Un bon excipient doit contribuer à donner à la pommade une consistance convenable qui permette un étalement facile.

- Il doit être bien toléré et son pouvoir allergisant doit être faible ;
- Il doit présenter le moins d'incompatibilités possible avec les autres constituants de la pommade et le conditionnement ;
- Il doit en général faciliter la pénétration des principes actifs dans les tissus ;
- Il doit être suffisamment stable pour permettre une bonne conservation ;
- Enfin on peut lui demander d'être stérilisable .

Choix des Additifs

a. Les conservateurs :

Les conservateurs se définissent comme des substances naturelles ou synthétiques qui protègent un produit de la contamination microbienne (bactéries, moisissures et levures) et de l'oxydation (rancissement des graisses).

Il est nécessaire d'ajouter un conservateur à chaque produit afin de lutter contre les proliférations bactériennes et fongiques. Leur action consistant à éliminer les microorganismes, n'est pas inoffensive au contact de notre peau. Ils entraînent des irritations cutanées, des allergies voire des toxicités.

b. Les humectants:

Ils maintiennent le taux d'humidité des produits cosmétiques constant (glycérol, sorbitol, propylène glycol).

2.4.4. Préparation d'une pommade anti-inflammatoire :

A condition de respecter les bonnes pratiques de fabrication, les différentes étapes pour la préparation officinale des pommades sont:

- Préparation de la phase aqueuse (40% dans la formulation).
 - Dissoudre le tensioactif dans l'eau (Préparation de solution tensioactif) ;
 - Ajouter les solides finement râpés (Préparation de solution tension actif +viscosifiant) ;
 - Agiter le mélange jusqu'à dissolution totale ;
 - Ajouter l'humectant (solution tension actif +viscosifiant+ humectant) ;
- Préparation de la phase organique (60% dans la formulation) ;
 - Faire chauffer (toujours au bain-marie) la vaseline jusqu'à la fusion totale à une température inférieure à 60°C ;
- Ajouter la phase aqueuse à la phase organique, tout en agitation pendant quelque minute ;
- Ajouter en dernier le principe actif (l'huile essentielle) et le conservateur ;
- Homogénéiser la pommade ;

Avant d'aborder la Pénétration de la pommade à travers la peau, il est essentiel de faire un bref rappel de la structure de la peau.

2.5. La peau :

La peau est assurément un organe vivant à l'interface entre les organismes vivants et l'environnement. Ses propriétés Quantitatives qui varient selon les sites anatomiques du corps humain et dépendent de l'âge et du sexe. La connaissance du comportement mécanique de la peau présente un intérêt pour le diagnostic des maladies cutanées et pour tester l'efficacité des produits cosmétiques sur la peau [46] .

La peau contient des structures qui confèrent la sensibilité au toucher (cellules de Merkel et nocirécepteurs), l'immunité (cellules de Langerhans), la protection contre les radiations UV (mélanocytes), la réparation et le métabolisme. Enfin, la peau est un organe vivant en continuelle régénération et réparation. Son renouvellement dure 28 jours. Il est continu et peut être accéléré en cas de blessures [47].

2.5.1. Structure de la peau :

La peau, ou membrane cutanée, recouvre la surface externe du corps. Elle constitue l'organe le plus lourd (masse) et le plus étendu (superficie) du corps humain.

Chez l'adulte, elle couvre plus ou moins 2 m² et pèse de 4,5 à 5 kg, soit environ 16 % de la masse corporelle totale. Son épaisseur varie de 0,5 mm sur les paupières à 4 mm sur les talons. Sur le plan structural, la peau comprend deux couches principales. La partie superficielle, la plus mince, se compose de tissu épithélial et est appelée épiderme. La partie la plus profonde, et la plus épaisse se compose de tissu conjonctif et est nommée derme [48].

En dessous du derme se trouve la couche sous-cutanée, qui n'appartient pas à la peau proprement dite ; elle est appelée fascia superficiel ou encore hypoderme, et se compose de tissu aréolaire et de tissu adipeux. La complexité anatomique et physiologique de la peau humaine lui confère des propriétés complexes [46].

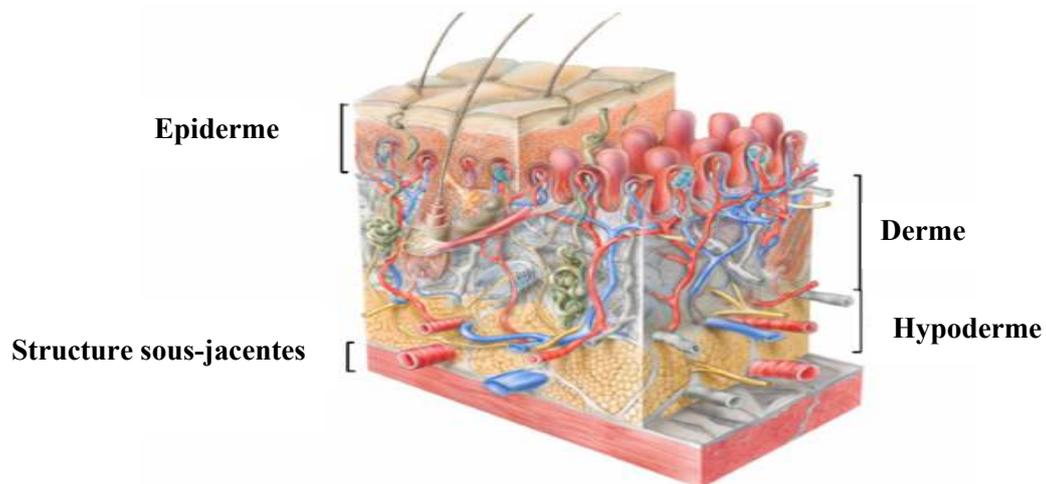


Figure 2.5 : Schéma de la structure de la peau humaine [49].

2.5.2. Le pH de la peau :

Le pH de la peau est plus important qu'on ne puisse le croire, puisqu'il conditionne l'ionisation et la capacité d'absorption des principes actifs. Ce pH est variable sur les divers endroits divers du corps, mais aussi en fonction de la sueur, de sécrétions séborrhéiques, ou d'états pathologiques de la peau. voisin d'un pH 5, il peut être facilement influencé par le pH du véhiculeur.

2.5.3. Pénétration à travers la peau:

La pommade appliquée sur la peau se trouve au contact de l'épiderme. Celui-ci est formé de cellules qui, en progressant vers l'extérieur, subissent des modifications importantes de leur constitution chimique ; elles se chargent en kératine, scléroprotéine riche en ponts di-sulfures et difficilement attaquables par les agents d'hydrolyse : acides, alcalins dilués et enzymes.

La peau constitue une barrière très efficace mais elle peut cependant être traversée par de petites quantités de substances lipophiles capables de pénétrer dans les couches cornées. Si ces substances possèdent aussi une certaine hydrophilie, elles pourront avoir une diffusion plus profonde et même parfois une absorption systémique.

La couche cornée a la propriété de retenir dans sa structure des substances actives « effet réservoir ». La libération progressive de cette réserve conduit à des effets prolongés. Les substances qui la traversent, peuvent se concentrer dans les parties profondes de la peau et les régions sous-cutanées, ce qui est favorable aux actions locales [50] .

2.6. Conditionnement des pommades

Les pommades peuvent être conditionnées en pots mais cela est assez exceptionnel. En tubes, les risques de souillures entre deux applications sont moins grands.

- Pots →dermocosmétique ;
 - Tubes →matière plastique ;
 - Flacons pressurisés: mousse à raser, protecteurs solaires ;
- Avantage pour prod appliqués sur plaies: pas de contact
- Conditionnement unitaire: capsules molles (→pommades ophtalmiques) ;

Chapitre 3 :

Matériels et méthodes

Dans cette étude, nous avons cherché à optimiser une formulation d'une pommade anti-inflammatoire BIO de type eau dans l'huile (eau /huile), renfermant essentiellement deux phases. Une phase grasse (vaseline blanche), une phase aqueuse (eau distillé et lécithine de soja).

L'huile essentielle (HE) de graines de nigelle est ensuite rajoutée autant que principe actif. L'extraction de l'huile essentielle s'est effectuée par plusieurs méthodes (entraînement à la vapeur d'eau, hydro-distillation, hydro-distillation assistée par micro-onde).

La période de l'étude s'est étalée sur cinq mois (comprenant les essais préliminaires effectués pour résoudre les obstacles rencontrés).

L'étude a eu lieu au sein du laboratoire de chimie organique au sein du Département du Génie des procédés à l'université de BLIDA. L'activité anti-inflammatoire de la pommade a été réalisée au sein de Laboratoire de toxicologie de SAIDAL implanté à Media et l'activité antibactérienne a été effectuée au laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Blida.

En fin l'effet toxique de la pommade formulée à été déterminé au laboratoire de la recherche de SAIDAL d'El-Harrach.

3.1. Matériels

a) Les graines de *Nigella sativa l* :

Les graines de *Nigella sativa l* sont locales, cultivées dans les régions Sahariennes Les graines sont nettoyées des débris végétaux et conservées à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.



Figure 3.1 : Aspect morphologique des graines de N.sativa utilisées.

b) Huile essentielle de graines de nigelle :

Extraite à partir de graines de nigelle. (Voir extraction de l'huile essentielle).



Figure 3.2 : Huile essentielle de graines de nigelle.

c) Hydrolat de graines de nigelle :

L'eau d'évaporation condensée durant l'extraction de l'huile essentielle constitue l'hydrolat. Cet hydrolat contient les mêmes composés volatils présents dans l'huile essentielle mais en quantité moindre (moins de 5%), en plus des composés hydrosolubles.

Ce distillat constitue fréquemment la partie aqueuse des bases de produits bio mais peuvent également s'appliquer directement sur le visage comme tonique.

d) Lécithine de soja :

La lécithine est un émulsifiant végétal très intéressant pour ses propriétés émoullientes et son excellente affinité avec la peau. De plus de sa tolérance par les peaux sensibles [51].

Les lécithines sont des émulsifiants naturels présents notamment dans les fèves de soja, les graines de tournesol et de colza, mais aussi dans le jaune d'œuf. Les lécithines couvrent une large gamme de HLB variant de 2 à 12, ce qui permet de choisir celle qui sera la plus adaptée au type d'émulsion choisie [51].

La lécithine que nous avons utilisée est une lécithine de soja déshuilée contenant 95% de phospholipide avec une HLB=8, soluble dans l'eau. Incorporée dans les émulsions, elle en augmentera la stabilité tout en conservant une texture plutôt fluide, au toucher très soyeux.

e) HEC :

L'hydroxyéthylcellulose est un dérivé non ionique de la cellulose, obtenu par action de l'oxyde d'éthylène sur la cellulose en milieu alcalin[52].

Le Natrosol 250 HHBR se présente sous forme d'une poudre blanche et est utilisé comme épaississant. L'absence de groupes hydrophobes le rend facilement dispersible dans l'eau, le polymère gonfle dans les solvants aqueux sans former de réseau tridimensionnel. Une solution aqueuse à 1% a une viscosité comprise entre 3400 et 5500 mPa.s à 25°C. L'hydroxyethyl cellulose est utilisé comme épaississant[52]. Les solutions aqueuses d'hydroxyethyl cellulose sont des liquides non newtoniens à comportement rhéofluidifiant. Pour obtenir des solutions visqueuses homogènes, il est conseillé de saupoudrer lentement l'hydroxyethyl cellulose dans la phase aqueuse maintenue sous agitation vigoureuse. L'ajout peut être effectué à température ambiante ou modérée (40°C). L'agitation est maintenue jusqu'à ce que toutes les particules soient hydratées, soit environ 10 à 15 minutes [52].

f) Conservateur BIO (Extrait de Pépin de pamplemousse) :

Souvent désigné par l'abréviation EPP, ce conservateur d'origine naturelle permet de prolonger la durée de vie des produits. C'est antibactérien et antifongique, qui empêche le développement de bactéries, levures et moisissures dans les produits cosmétiques contenant de l'eau (type émulsion). Il permet la conservation de produits lavant (shampooings, gels douche, démaquillants).



Figure 3.3 : EPP utilisé.

g) Glycérol

Le glycérol, ou glycérine, est un composé chimique de formule $\text{HOH}_2\text{C}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$. C'est un liquide incolore, visqueux et inodore au goût sucré et faiblement toxique, miscible dans l'eau en toutes proportions et dans les alcools en proportions variables. Il est utilisé dans de nombreuses compositions pharmaceutiques. Sa molécule possède trois

hydroxyles correspondant à trois fonctions alcool responsables de sa solubilité dans l'eau et de sa nature hygroscopique [53].

Dans la formulation préparée (pommade) le glycérol sert à améliorer l'onctuosité et la lubrification de la pommade.

h) Vaseline :

Du point de vue chimique, la vaseline est un mélange purifié d'hydrocarbures saturés à longues chaînes, solides et liquides. Son inertie chimique et physiologique en fait un véhicule idéal pour protéger les ingrédients actifs délicats, pour créer des pommades pour les peaux les plus sensibles, ou pour formuler les produits avec un pH acide ou alcalin. Sa nature chimique et sa microstructure colloïdale définissent ses qualités multiples. Grâce à sa consistance semi-solide, la vaseline peut être employée seule comme un agent structurant idéal pour les pommades hydrophobes. En fonction de ses propriétés telle que la viscosité, le point de goutte ou la capacité d'absorber l'huile, elle peut être utilisée comme régulateur de consistance ou stabilisateur d'émulsion.

Ainsi toute les lectures effectuées sur les matières premières utilisées nous ont permet de regroupés les propriétés physico-chimique des produits utilisés sur. Tableau 3.1 [51, 53].

Tableau 3.1. Propriétés Physico-chimique des produits utilisés

	Eau distillé	Vaseline blanche	HEC	Glycérol	EPP
Viscosité (mPa.s)	1mPa.s	25 à 80 110 à 230	3400 à 5000	1.49 à 20°C	
Indice de réfraction	1,3330 à 20°C		1.51	1,4730	
pH	7		6~8.5 (2%solution)		
T°fusion (°C)	0 à 1.01325 bar	36 à 60	140	18,2	
T° ébullition (°C)	100	302	Sans objet	290	
Masse molaire (g/mol)	18.06	11	Variable	92,0938 ± 0,0039	Non disponible.
Masse volumique (g·cm ⁻³)	1	0.830~0.9	0.6 à 25 °C	1.2604 (17,5°C)	
Composition	Molécule de H ₂ O	mélange purifié d'hydrocarbure semi-solide obtenu à partir du pétrole.	Hydroxyéthyl cellulose 80~100%	Glycérol 77-90% Produit organique 0,1-13,5 Humidité 0,1-13,5 Potassium 0,003-4 Calcium <0,065	contient essentiellement des flavonoïdes (400mg pour 100ml), de l'acide ascorbique (vitamine c), des tocophérols, de l'acide citrique, des limonoïdes, des stérols. Le composant actif est un chlorure d'ammonium quaternaire, l'hydrobenzène diphénol.
Comportement rhéologique	Newtonien	–	Non newtonien	Newtonien	–

3.2. Méthodes :

Avant le démarrage de l'expérimentation il faut d'abord stériliser toutes la verrerie pour éliminer tous les risques de contamination de nous produit selon la méthode suivante :

La verrerie a été incubée dans l'eau contenant l'eau de javel et un détergent ordinaire pendant une heure, bien rincée à l'eau de robinet puis à l'eau distillée et finalement stérilisée dans l'étuve de type *WST 3020* à 250°C pendant 30 minutes.

3.2.1. Extraction de l'huile essentielle des grains de nigelle

La détermination quantitative de l'huile essentielle à partir de la matière végétale est réalisée par différentes méthodes d'extraction.

L'extraction de l'huile essentielle de graines de nigelle est réalisée au sein de laboratoire de chimie organique, au niveau de département Génie des procédés, situé à l'université de Blida-1.

a) Entraînement à la vapeur d'eau :

Elle consiste à récupérer HE contenue dans les cellules végétales au moyen de la vapeur d'eau, les graines de nigelle sont mises dans un ballon dans lequel est injectée de la vapeur d'eau formée par un générateur de courant électrique. Cette vapeur d'eau détruit la structure des cellules végétales pour libérer les molécules odorantes. La vapeur chargée d'EH est condensée par refroidissement dans un condenseur avant d'être récupérée dans un essencier. L'hydrolat et l'huile essentielle, de densités différentes, ces derniers se séparent naturellement (voir Fig 3.4).

b) Extraction par Hydro-distillation :

L'hydro-distillation de 100 grammes de graines de nigelle à été menée, pendant 4 h, selon le protocole opératoire suivant:

Le matériel végétal, baignant dans l'eau bouillante, est disposé dans un ballon à deux cols et relié à un réfrigérant. La vapeur d'eau produite entraîne les constituants volatils, qui après condensation dans le réfrigérant, sont recueillis dans le récipient de recette. L'huile est ensuite séparée du distillat par une simple décantation sous l'influence de la différence de densité.

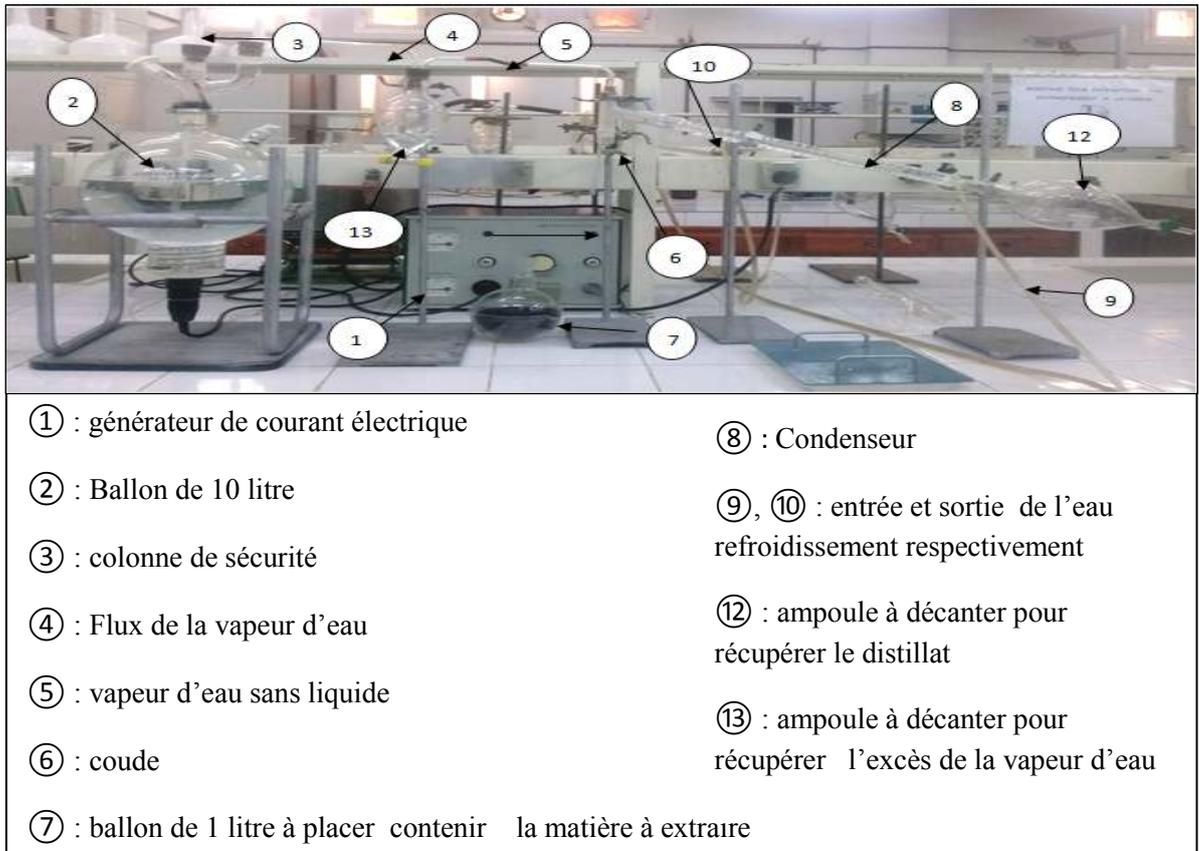


Figure 3.4 : Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau

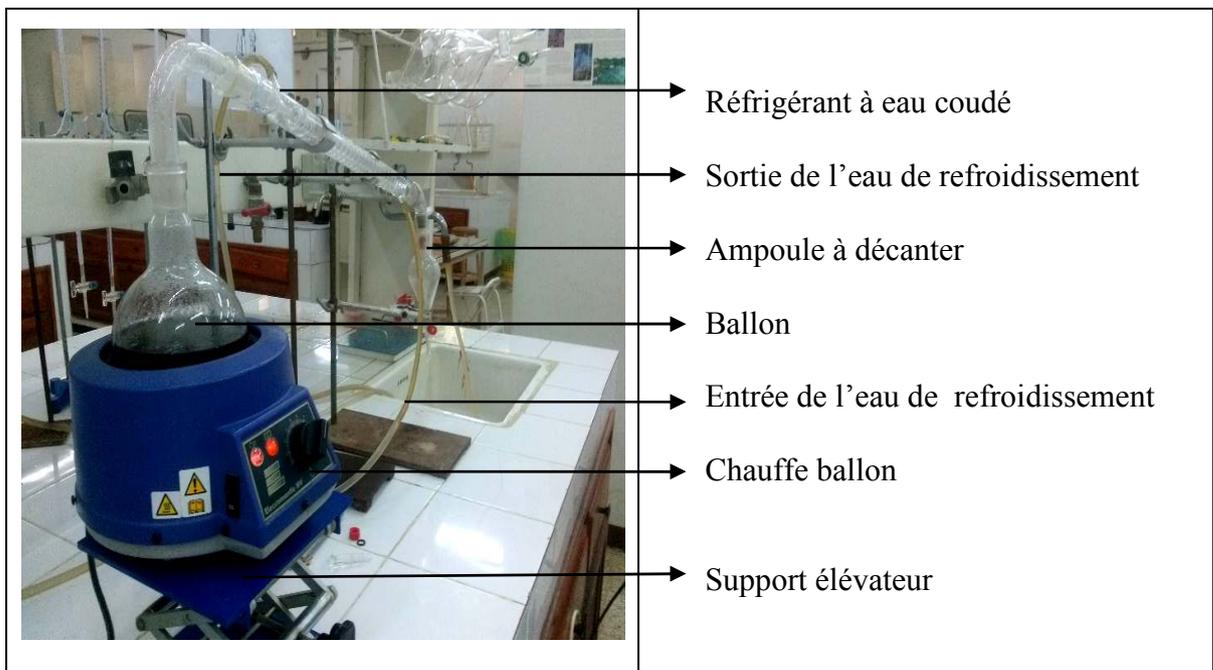


Figure 3 5 : Montage de l'hydro-distillation réalisé au labo 131.

c) L'hydro-distillation assistée par micro-onde (MAHD) :

Ce procédé basé entièrement sur le principe de l'hydro-distillation classique, consiste à placer une partie du montage d'hydro-distillation dans le four à micro-ondes. Le montage utilisé est présenté sur la figure 3.6.

Le procédé consiste à mettre 100 g de la matière végétale baignant dans l'eau bouillante, est placé dans un réacteur (ballon) de 500 ml disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes à une puissance de 800 W. la vapeur d'eau produite entraîne les constituants volatiles; qui après condensation dans le réfrigérant sont recueillis dans un récipient, la phase huileuse se trouve dans la partie supérieure. On recueille cette phase dans un tube en verre.

Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four.

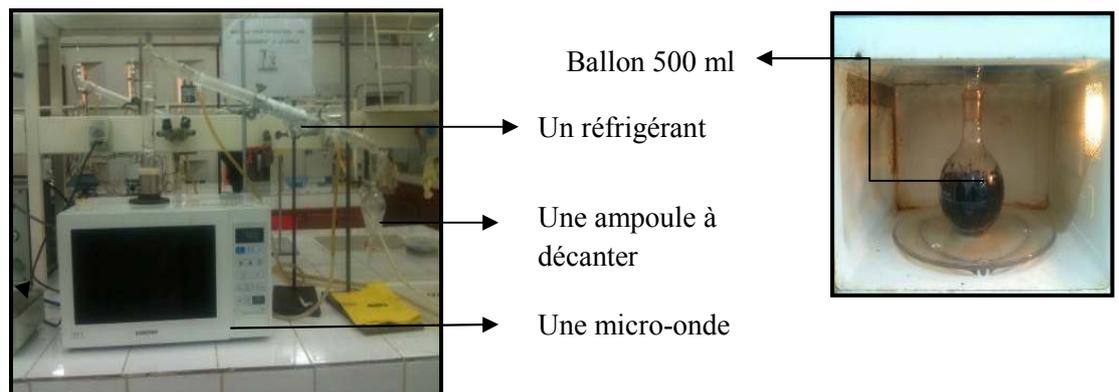


Figure 3.6 Montage de l'hydro-distillation assistée par micro-onde.

3.2.3 Caractérisation de l'huile essentielle des grains de nigelle :

a) Calcul du rendement :

L'huile essentielle extrait à partir des graines de nigelle représente entre 1,4 à 1,9 % du poids de l'huile fixe et 0,18 à 0,50 % du poids des graines d'après [11].

Le rendement de notre huile essentielle se calcule en divisant la masse de l'huile essentielle obtenue sur la masse de la matière végétale utilisée suivant la relation :

$$\text{RHE} = \frac{\text{mass d'HE obtenu}}{\text{masse de la matière végétale utilisée}} \times 100$$

b) Caractères organoleptiques :

Les seuls critères d'applications d'une huile essentielle étaient ses propriétés organoleptiques telles que le goût, la couleur et l'odeur, ces propriétés ne donnent qu'une information très limitée sur cette essence [54].

La qualité d'une essence et sa valeur commerciale sont définies par des normes fixant les indices physico-chimiques.

Ces normes ont été établies par plusieurs organisations connues à l'échelle mondiale (AFNOR, ISO ...) en précisant les conditions opératoires des analyses, et en mettant au point des monographies pour la caractérisation des huiles essentielles les plus courantes.

c) Caractéristiques physicochimiques :

Les indices physicochimique telle que l'indice de réfraction, le pouvoir rotatoire, l'indice de saponification, l'indice d'ester...etc. constituant un moyen de vérification et de contrôle de qualité de huile essentielle .Dans le cadre de notre études on a calculé deux paramètres physicochimique l'indice de réfraction et l'indice d'acide.

□ Indice de réfraction :

C'est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante ; Cet indice peut être mesuré par un réfractomètre.

L'indice de réfraction IR, à la température de référence t, est donné par l'équation suivante [55].

$$IR = nt' + 0,0004 \times (20 - T')$$

Où :

- n_t' : valeur de lecture obtenue à la température t' ;
- T' : température en °C de l'échantillon.

□ **Indice d'acide :**

C'est l'indice d'acide évalué l'acidité libre de l'huile [53], pour le déterminer on introduit 0,5g d'huile essentielle dans un ballon, on ajoute 25 ml d'éthanol et 5 gouttes de solution de phénophtaléine, comme indicateur et on neutralise la solution avec l'hydroxyde de potassium contenue dans la burette.

L'indice d'acide est calculé par la relation suivante [51].

Où

$$IA = 5,61 \times \frac{V}{m}$$

V : est le volume en millilitre de la solution d'hydroxyde de potassium utilisé. ;

m : est la masse en grammes de la prise d'essai (0,5 g).

3.2.3. Activités pharmacologique de l'HE (Activité anti-inflammatoire in vivo) :

Les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème à la carragénine, (Winter, 1962). d'après [56].

Principe : Réduire, par des substances anti-inflammatoires, l'œdème provoqué chez les souris par l'injection intra-plantaire de la carragénine. c'est cette technique que nous avons utilisée dans notre méthodologie pour déterminer l'activité anti-inflammatoire [56].

Animaux utilisés : Le test a porté sur 15 souris mâles de masse variant entre 20 et 25 g, réparties en 3 lots aussi homogènes que possible en fonction de leur masse.

- Le premier lot a été traité par l'hydrolat de graine de nigelle ;
- Le deuxième lot a été traité par Diclofénac de sodium à raison de 12.5 mg ;
- Le troisième lot témoin a reçu uniquement de solution physiologique à 0.9% ;

Réactif :

- Solution de carragénine à 1% dissoute dans le liquide physiologique ;
- L'hydrolat de graine de nigelle ;
- Solution aqueuse de Diclofénac.

Matériel :

- Balance analytique ;
- Sonde gastrique ;
- Seringues graduées et aiguilles ;
- Gants ;
- Cage ;
- Ciseaux.

Méthode :

- Nous avons mis les souris à jeun 18 heures avant le test.
 - 1 heure avant de provoquer l'inflammation, nous avons administré par voie orale l'hydrolat de graine de nigelle au premier lot de souris.
 - Les deuxième et troisième lots ont reçu respectivement, par la même voie, de solution physiologique et diclofénac sodique.
 - L'inflammation est produite en injectant sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche des souris 50 μ l de la solution de carragénine à 1%: il se produit un œdème de la région métatarsienne.
 - Les souris ont été remises en cage.
 - Nous avons sacrifié les souris, par rupture de la nuque, 3 heures après l'injection de la carragénine.

- Nous avons ensuite coupé rapidement les pattes postérieures à la hauteur de l'articulation tarso-crurale et pesé sur une balance analytique.

Nous avons calculé pour chaque souris, l'augmentation de la patte enflammée (patte postérieure gauche : PPG), qui a reçue la carragénine par rapport au poids de la patte saine (patte postérieure droite: PPD) selon la formule : PPG – PPD.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée grâce au calcul du pourcentage d'inhibition de l'œdème (% Inhibition) selon la formule de Saenz et al (1998) [56] :

$$\%inhibition = \frac{M(PPG - PPD) \text{ groupe témoin} - M(PPG - PPD) \text{ groupe traité}}{M(PPG - PPD) \text{ groupe témoin}} \times 100$$

3.2.4. Formulation de la pommade anti-inflammatoire :

Les propriétés d'un mélange dépendent généralement de sa composition, et il est fréquent que l'on veuille traduire les variations d'une propriété en fonction de la concentration des divers constituants.

Notre travail a pour objectif la recherche d'une composition optimale pour formuler une pommade anti-inflammatoire avec les propriétés suivantes :

- Aspect : Opaque blanche ;
- Consistance : Crémeuse ;
- Homogénéité : Bonne ;
- Odeur : conforme à celle du odeur de l'essence végétale
- Toucher : collant, étalement facile ;
- Sens de l'émulsion : E/H.

Matériels :

- Agitateur magnétique, barreaux aimantés ;
- Plaque chauffante ;
- Homogénéisateur de type ULTRATURAX,
- Matériel courant de laboratoire : fioles Erlenmeyer, béchers, spatules, sondes de température, Cristallisoir.

Matières Premières :

Les matières premières utilisées lors de la formulation sont :

- Vaseline ;
- Lécithine de soja ;
- HEC ;
- Glycérol ;
- Hydrolat des graines de nigelles;;
- Huile essentielle des graines de nigelles ;
- Conservateur BIO : Extrait de Pépins de pamplemousse.

La formulation doit être effectuée en mélangeant deux phases une dite aqueuse ou polaire (phase A) et l'autre dite organique (huileuse) ou apolaire (phase B), les quantités en masse ainsi que les rapports de phase sont regroupés sur le tableau 3.2

Tableau 3.2. Composition chimique et rôle des constituants de la pommade

	Ingrédient	Domaine de variation en % (m/m)	Fonction
Phase A	Hydrolat	QS100	Base aqueuse de l'émulsion
	Lécithine de sauge	0.3~0.8	Tensioactif
	HEC	0.3~2.4	Stabilisant
	Glycérol	0~0.8	Agent humectant
Phase B	Vaseline	50~70	Base huileuse de l'émulsion (gélifiant)
Phase C	Extrait de pépins de pamplemousse	1	Agent Conservateur

- Phase A : Phase aqueuse
- Phase B : Phase huileuse

▪ **Optimisation des paramètres :**

Nous avons effectué plusieurs essais pour la formulation de la pommade en faisant varier les proportions des composants (TA, HEC et glycérol.)

Le balayage pour 25g de pommade effectué est représenté dans les tableaux Appendice E.

La phase aqueuse n'est d'autres que l'hydrolat des graines de nigelle dans lequel on a dissout du tensioactif (TA) qui est la lécithine de soja (pendants une heure d'agitation) et HEC (six heures) et glycérol. Jusqu'à fusion complète des composants.

La phase huileuse est une vaseline vierge, cette dernière a été mise dans un bain marie ou directement sur la plaque chauffante à 40°C, jusqu'à fusion complète de vaseline (voir fig.3.6).



Figure 3.7 : A gauche. Aspect de la phase huileuse à droite Aspect de la phase aqueuse.

La phase aqueuse a été versée dans la phase grasse par petites fractions en mélangeant toujours. Une agitation mécanique peut assurer la bonne homogénéisation des deux phases.

A température ambiante (25-30°C), nous avons introduit l'HE des graines de nigelle à raison de 1%, sous une homogénéisation continue. À la fin nous avons ajouté de l'extrait de pépin de pamplemousse comme conservateur

▪ **Stockage et conservation :**

L'emballage utilisé pour le conditionnement doit être inerte vis-à-vis du produit fini et doit assurer une bonne conservation. Ceci est particulièrement important lorsqu'il y a une phase aqueuse qui risque soit de s'évaporer, soit d'être contaminée.

Le processus de formulation de la pommade est représentée sur la figure 3.7

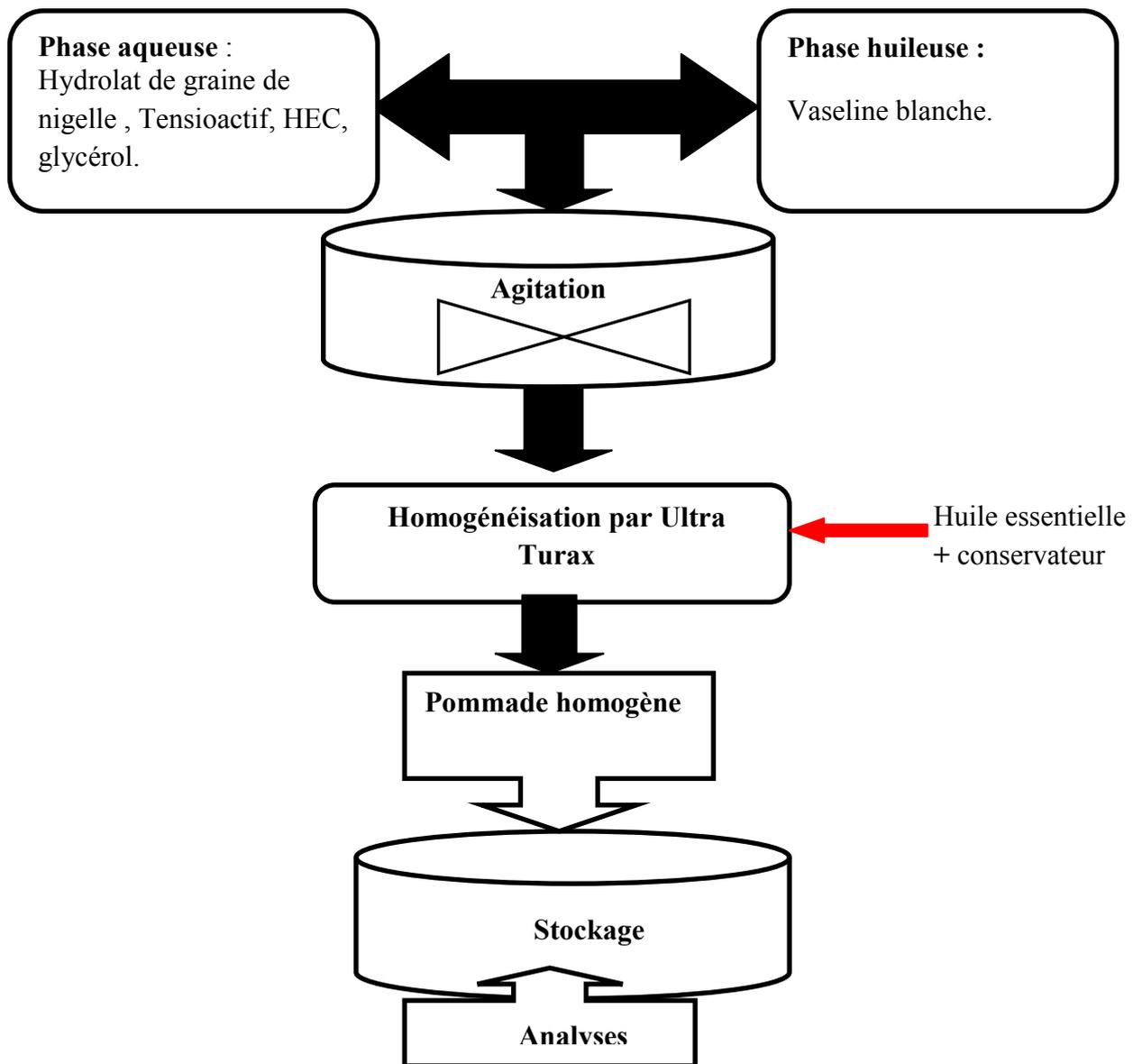


Figure 3.8: Organigramme de Processus de formulation de la pommade.

3.2.5 Contrôles réalisés sur la pommade

a) Les analyses organoleptiques :

Les contrôles organoleptiques consistent à faire une évaluation sensorielle de la pommade (L'appréciation de l'odeur, la couleur et l'aspect de la pommade).

- **Aspect** : C'est un examen visuel de la fluidité, et l'homogénéité de la pommade.
- **La couleur** : On examine la couleur de la pommade.

– **L'odeur** : C'est un examen olfactif, car chaque produit présente sa propre odeur caractéristique.

b) Les analyses physico-chimiques

□ **Essai d'homogénéité :**

a) Examen macroscopique :

L'homogénéité est vérifiée par l'étalement de la pommade en couche mince. On vérifie visuellement l'absence d'agrégats et la bonne répartition des poudres.

b) Examen microscopique

Il permet de confirmer la bonne dispersion et de vérifier la taille des particules lorsque celle-ci a une influence sur l'activité thérapeutique.

La pommade est déposée en fine couche entre lame et lamelle puis observée au microscope muni d'un vernier gradué. Une observation d'ensemble au grossissement est faite pour mettre en évidence l'homogénéité de la répartition des globules.

□ **Contrôles de stabilité(Centrifugation) :**

Cet essai a été effectué sur un ensemble d'échantillon dans une centrifugeuse type (EBA20) pendant 10 minutes à une vitesse de 5000 tours/minute et une température ambiante. Si les essais montrent qu'il n'y a pas de séparation de phase, là on peut dire que notre émulsion est stable.

□ **Potentiel hydrogène :**

Le potentiel hydrogène, noté **pH**, est une mesure de l'activité chimique des ions hydrogène H^+ en solution.

Il existe de nombreuses façons de mesurer le pH d'une solution aqueuse.

On peut tout d'abord le mesurer par électrochimie à l'aide d'un appareil appelé pH-mètre. On peut aussi utiliser le papier pH pour mesurer l'acidité, c'est un papier imbibé

d'un indicateur universel. Quand on le trempe dans une solution, il prend instantanément la couleur correspondant à un certain pH.

Le pH de notre pommade a été déterminé à partir de deux méthodes :

- ✓ pH-mètre pour les produits visqueux;
- ✓ le papier pH.

□ Etude du Comportement rhéologique :

La plupart des produits formulés (produits alimentaires, produits de soins ou cosmétiques, peintures et vernis...) exhibent un comportement rhéologique complexe, en ce sens qu'ils ne peuvent être caractérisés par une mesure unique de viscosité [57]. Pour cela il faut utiliser un rhéomètre à fin de préciser la viscosité de telle produit [54].

L'étude du comportement rhéologique consiste à mesurer la vitesse de déformation d'un corps sous l'influence d'une force extérieure. La sollicitation appliquée est généralement un cisaillement. Comme résultat, on obtient alors une valeur de contrainte en fonction du gradient de vitesse (ou vitesse de déformation) appliqué. Cette fonction caractérise les propriétés d'écoulement du matériau [50].

La viscosité η (Pa.s) est exprimée par le rapport de la contrainte sur le gradient de vitesse

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Le gradient de vitesse ou vitesse de déformation (*shear rate*) est :

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$$

Le comportement rhéologique est représenté soit sous la forme d'une relation entre la contrainte et la vitesse de cisaillement, soit sous la forme d'une relation entre la viscosité et la vitesse de cisaillement.

Il existe plusieurs comportement rhéologique qui exprime le caractère d'un fluide donné on site alors :

-le comportement **Newtonien**, qui est celui des liquides simples. La viscosité est constante en fonction de la force appliquée, et elle ne dépend pas du gradient de vitesse. La courbe contrainte en fonction du gradient de vitesse est alors une droite.

-le comportement **Rhéoépaississant**, où la viscosité augmente en fonction de la vitesse d'écoulement. Ce comportement est très rare. On l'obtient avec certaines formulations de suspensions de particules anisotropes (argiles) où quand l'écoulement provoque la floculation des suspensions.

- le comportement **Rhéofluidifiant** (ou pseudo-plastique), où la viscosité diminue quand le gradient de vitesse augmente. L'écoulement est donc plus facile avec l'augmentation du cisaillement. Le comportement rhéofluidifiant est le plus fréquent dans le domaine des émulsions [50].

Description de l'appareillage de mesure :

Un **rhéomètre** est un appareil de laboratoire capable de faire des mesures relatives à la rhéologie fluide, qui est l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière sous l'effet d'une contrainte extérieure. Il applique un cisaillement à l'échantillon. Généralement de faible dimension caractéristique (très faible inertie mécanique du rotor), il permet d'étudier fondamentalement les propriétés d'écoulement d'un liquide, d'une suspension d'une pâte, etc., en réponse à une force appliquée.



Figure 3.9 Photographie d'un rhéomètre de type MCR 2004

3.2.6 Les activités Pharmacologiques :

a) Détermination de l'activité anti-inflammatoire in vivo :

L'activité anti-inflammatoire est testée, en provoquant une inflammation locale au niveau de l'oreille de souris selon la méthode de Manga et ses collaborateurs [58].

Principe :

Cette technique repose sur la détermination de l'action inhibitrice de la pommade formulée à base de huile essentielle de graine de nigelle sur une inflammation provoquée par l'application locale sur l'oreille d'une souris d'un produit à base d'huile de croton

Lors de notre étude on a provoqué l'inflammation par l'application d'une solution de xylène au lieu d'huile de croton selon la méthode de Rotelli et ses collaborateurs (2003) [58].

Mode opératoire :

Ce teste a été réalisé sur 20 souris maintenues à jeun pendant 18h avant le début de l'expérience.

Préparation des solutions utilisées

–Préparation de la solution irritante à 5% de xylène, 1 ml de xylène est dissous dans 19 ml d'acétone pour préparation injectable

–Préparation du produit de référence (témoin positif) à base de l'indométacine à une concentration de 0.5mg/ml d'acétone.

Répartition les 20 souris en 4 lots :

- ✓ Un lot essais (E) : Traité par la pommade ;
- ✓ Un lot témoin positif(T+) : Traité par le produit de référence ;
- ✓ Un lot placebo : traité par l'eau distillée ;
- ✓ Un lot témoin négatif : ne reçoit aucun traitement

Au temps T_0 :

En appliquant la solution irritante de façon suivante :

–Prélèvement de 10 μ l de la solution irritante à l'aide d'une micropipette.

– Application de la solution irritante sur l'oreille droite et gauche de chaque souris (on frotte de bas en haut à l'aide d'un coton). Pour le lot témoin négatif, on applique la solution irritante uniquement sur l'oreille droite

–Application d'une manière respective 20 µl de la pommade, produit de référence et l'eau distillée sur l'oreille droite de chaque souris du lot E, T+et placebo. l'oreille gauche de chaque souris sert de contrôle

Au temps T2

–Scarification des souris (à l'aide de l'éther), puis on sélectionne l'oreille droite et gauche de chaque souris suivant l'arête cartilagineuse.

–Couper à l'aide d'une profondeur de papier de 6 mm de diamètre un disque de chaque oreille.

–Peser les disques.

–Mettez les disques de chaque lot dans une boîte à part contient formol à 10% (les disques d'oreille du lot essais dans une boîte, les disques du lot test dans une autre boîte...etc. sans oublier de mentionner le nom de chaque lot sur la boîte cette étape est très important.

Lecture :

–Calculer les moyennes arithmétiques massiques des disques des oreilles droites O_D et gauche O_G pour chaque lot

–Calculer le pourcentage de réduction de l'œdème de l'oreille traité O_D par rapport au contrôle O_G .

$$\% \text{ Réduction de l'œdème} = [(O_G - O_D) / O_G] \times 100$$

O_D : poids de l'oreille droite.

O_G : poids de l'oreille droite.

b) Les tests micro biologiques :

L'objectif de ce travail est de tester notre produit, en déterminant son efficacité bactéricide et fongicide, et ceci par la méthode de diffusion sur plaque de gélose en utilisant des disques absorbants.

Les activités antibactérienne et antifongique ont été réalisées au sein du laboratoire d'hygiène de la Wilaya de Blida.

Un produit est dit bactéricide lorsqu'il possède la propriété de tuer les bactéries dans des conditions définies.

Un produit est dit fongicide lorsqu'il possède la propriété de tuer les champignons dans des conditions définies.

- Les tests antifongiques ont été effectués dans milieu de culture type Sabouraud (OXOID).
- Les tests antibactériens : la gélose Mueller Hinton (MH), a été utilisé comme milieu nutritif pour les bactéries.

Les souches bactériennes et les souches des champignons ont été isolées au niveau du laboratoire d'hygiène de l'hôpital Faroudja de Blida.

Principe :

Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boite de pétrie. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier. La technique consiste à utilisé des disques de papier imprégnés par les différents extrais à tester. Les disques sont déposés à la surface d'une gélose uniformémentensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier .chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose. Après incubation, on observe autour des disques une zone circulaire et claire indemne de colonies, appelée une zone d'inhibition.

Tableau 3.3 : Souches bactériennes et fongiques utilisées.

Souches	Bactéries	Klebsiella pneumoniae
		Escherichia coli
		Pseudomonas aeruginosa
		Bacillus subtilis
		Staphylococcus aureus
	Champignons	Candida albicans
		Aspergillus braziliensis
		Aspergillus flavus

La lecture des résultats après incubation, est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibitions obtenus pour chacune des souches à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle.

Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique, plus il est petit, plus la bactérie est résistante.

Protocole expérimental :

Préparation du milieu de culture

On fait fondre les milieux Muller –Hinton (M-H) et Sabouraud dans un bain marie à 95 C ; en suite on verse aseptiquement une couche des deux milieux dans des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte ; on laisse refroidir et solidifier sur paillasse.

Préparation de l'inoculum

- A partir de culture jeune des bactéries (18 h) ou des champignons (48h) on réalise une suspension microbienne dans 5ml d'eau physiologique avec deux ou trois colonies bien isolées et identiques ;
- On agite manuellement jusqu'à dissolution totale des colonies dans l'eau physiologique ;
- On fait une première lecture de la densité optique à une longueur d'onde de la 620nm en estimant la transmittance comprise entre 22% et 32% pour les bactéries et entre 2%et 3% pour les champignons ;
- Après, on trompe un écouvillon stérile dans une suspension, puis on étale en stries serrées sur une boîte de pétrie stérile (coulée précédemment par le milieu de culture approprié) en la tournant horizontalement trois fois pour couvrir toute la surface. On fait le même avec les autres suspensions.

Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, on prélève à chaque fois un disque stérile de 9 mm, et on l'imbibe avec l'hydrolat de grain de nigelle en mettant seulement en contact le bout du disque avec l'hydrolat, celle-ci va être absorbée progressivement jusqu' à imprégnation totale de toute le disque, on les dépose sur la surface de gélose.

On laisse diffuser les boîtes de Pétri sur paillasse pendant 30 minutes, puis on incube les bactéries à 37 C pendant 24 heures et à 25 C pendant 48 heures les champignons.

Dans notre expérimentation, pour chaque souche, quatre disques ont été déposés dans chaque boîte de pétri, deux chargé d'hydrolat, les deux autres servant de témoin positive et négative, cela est montré par la figure 3.9.

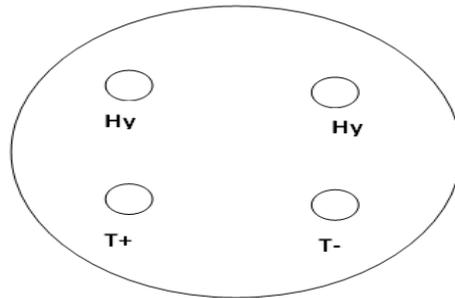


Figure 3.10 Position des disques dans la boîte de pétri (Hy : hydrolat, T+ : témoin positive, T- : témoin négative (l'eau distillé)).

La mesure du diamètre des zones d'inhibition se fait à l'aide d'une règle.

▪ **Effet de la pommade sur les souches bactériennes et fongiques :**

Des boîtes de Pétri de 9mm contenant du milieu Sabouraud (pour les champignons) et Mueller Hinton (pour les bactéries) sontensemencées aseptiquement par une suspension qui provient d'une culture jeune de champignons ou de bactéries respectivement. L'ensemencement se fait par écouvillonnage pour rendre la couche de suspension sur le milieu de culture mince et homogène (technique de râteau).

Après le séchage des boîtes, la gélose est perforée à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur (trois puits pour les boîtes de M-H et deux pour les boîtes Sabouraud). Les deux cavités ainsi formées sont remplies de volume du 40 µl de pommade à tester. et la troisième par un même volume de témoin positive (pour les bactéries).

Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 30°C pendant 48h pour les champignons, et à 37°C pendant 24h pour les bactéries.

L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm.

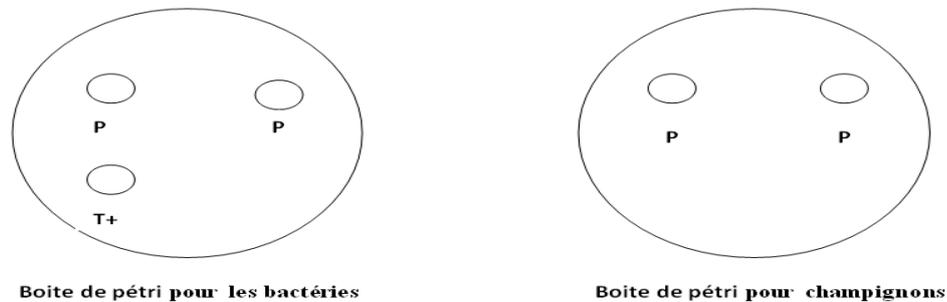


Figure 3.11: Position de la pommade dans la boîte de pétri (P: pommade, T+: témoin positive).

c) Effet irritant/corrosif de la pommade aigu sur la peau :

Notre étude a été réalisée au sein de laboratoire de pharmaco-toxicologie située au groupe Sidal-CRD d'Alger.

Principe de l'essai *in vivo* [59]

Une seule dose du produit testé est appliquée sur la peau de l'animal choisi pour l'expérience, les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. L'expérimentateur observe et note selon une échelle de valeurs le degré d'irritation ou de corrosion à intervalles déterminés, et le décrit de façon plus détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets observés.

Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleurs aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation du produit testé.

Préparation de l'essai *in vivo*

Sélection de l'espèce animale :

On choisira de préférence de jeunes adultes sains parmi les lapins albinos. L'utilisation d'une autre espèce sera justifiée, le cas échéant.

Préparation des animaux :

Environ 24 heures avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux sera tondue à ras. On prendra soin de ne pas égratigner leur peau et seuls des animaux présentant une peau saine et intacte seront utilisés.

Conditions d'hébergement et d'alimentation :

Les animaux sont placés dans des cages individuelles. La température du local expérimental est réglée à 20°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) pour les lapins. Si l'humidité relative doit atteindre au moins 30 pour cent sans excéder de préférence 70 pour cent, en dehors des heures de nettoyage du local, on s'efforcera de maintenir le taux d'humidité autour de 50 à 60 pour cent. On appliquera un éclairage artificiel, alternant 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les lapins seront nourris avec un mélange classique pour animaux de laboratoire et boiront de l'eau potable à volonté [59].

Mode opératoire

Application de la substance d'essai

Le produit testé est appliqué sur une petite zone (environ 6 cm²) de la peau et recouverte par une compresse de gaze, assujettie au moyen d'un sparadrap non irritant. La compresse doit être maintenue en contact souple avec la peau à l'aide d'un pansement semi-occlusif durant la période d'exposition. On fera en sorte que l'animal n'ait pas accès à la compresse et ne puisse ingérer ou inhaler le produit testé.

À la fin de la période d'exposition, qui dure normalement 4 heures, on enlève ce qui peut l'être du produit testé restant, avec de l'eau ou un solvant approprié sans interférer avec la réaction ni altérer l'intégrité de l'épiderme [59].

Dose

Une dose de 0,5 g de pommade est appliquée sur la plage à tester.

Essai initial (essai d'irritation/corrosion cutanée *in vivo* sur un seul animal) :

Dès lors qu'un produit testé est jugé corrosif, irritant ou non classé d'après l'analyse des données existantes ou d'essais *in vitro* préalables, tout essai sur animal s'avère superflu. Toutefois, si l'on estime que des données supplémentaires sont nécessaires, le test *in vivo* est conduit initialement en utilisant un seul animal et en respectant la procédure suivante. Jusqu'à trois timbres d'essai sont appliqués successivement sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après trois minutes. Si aucune réaction cutanée grave n'est constatée, un deuxième timbre est appliqué à un endroit différent et retiré après une heure. Si les observations effectuées à ce stade indiquent que l'exposition peut être étendue à quatre heures sans que cela fasse trop souffrir l'animal, l'expérimentateur appliquera un troisième timbre durant quatre heures et attribuera une cote à la réaction [59].

Si un effet corrosif est détecté à l'issue d'une des trois expositions séquentielles, l'essai s'achève immédiatement. Si aucun effet corrosif n'est relevé après l'enlèvement du troisième timbre, l'animal est gardé en observation durant 14 jours, à moins qu'un effet corrosif se déclare avant.

Dans les cas où l'on s'attend à ce que le produit testé soit peut-être irritant, mais pas corrosif, un seul timbre sera appliqué sur un animal durant quatre heures.

Essai confirmatoire (essai d'irritation cutanée sur des animaux supplémentaires)

Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur deux animaux supplémentaires, traités chacun avec un timbre maintenu durant quatre heures. Si l'essai initial produit un effet irritant, l'essai confirmatoire peut être conduit en mode séquentiel ou par l'exposition simultanée de deux animaux supplémentaires. Au cas exceptionnel où l'essai initial ne serait pas pratiqué, deux ou trois animaux peuvent être traités au moyen d'un seul timbre appliqué durant quatre heures. Si l'on utilise deux animaux et qu'ils expriment la même réaction, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Dans le cas contraire, le troisième animal est également

testé. L'utilisation d'animaux supplémentaires pourra être requise si les réactions sont équivoques.

Période d'observation :

La durée de la période d'observation devrait être suffisante pour permettre d'évaluer complètement la réversibilité des effets observés. Il faudra cependant mettre fin à l'expérience dès que l'animal montre des signes persistants de douleur ou de détresse aiguës. La réversibilité des effets est déterminée par l'observation des animaux sur une période s'étendant jusqu'à 14 jours après l'enlèvement des timbres. Si la réaction s'avère réversible avant le quatorzième jour, l'expérience s'achève à ce moment-là.

Chapitre 4

Résultats et discussions

4.1 Extraction et caractérisation de l'huile essentielle :

4.1.1 Examen organoleptique :

Les caractères organoleptiques de l'huile essentielle, de graine de nigelle obtenue par entrainement à la vapeur d'eau (E-V), l'hydrodistillation (HD) et hydrodistillation assisté par micro-ondes (HD-MO) sont représentés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 Propriétés organoleptiques de l'HE de graine de nigelle

Caractères organoleptiques	Aspect	Couleur	Odeur
HE obtenus par E-V	Solide, (graisse concrète)	Blanche	Donnât une forte odeur rappelant l'odeur des grains
HE obtenus par HD		Blanche	
HE obtenus par HD-MO		Jaunâtre	

4.1.2 Etude de rendement :

Lors de ce travail, nous avons étudié la variation du rendement de l'HE en fonction de la méthode d'extraction utilisée, les résultats sont illustrés sur la figure 4.1.

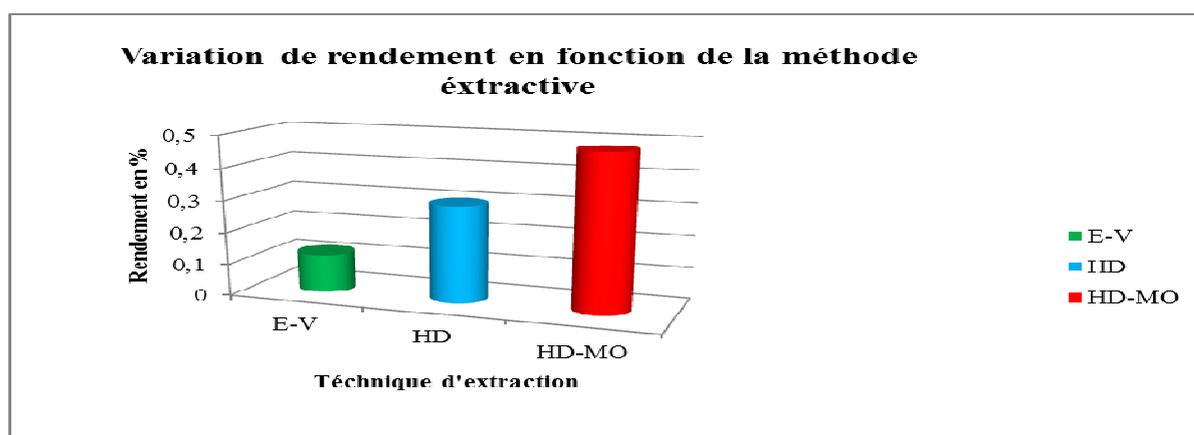


Figure 4.1 : Variation de taux d'extraction de l'HE de graine de nigella sativa 1 en fonction de la méthode extractive.

L'extraction se déroule en deux étapes de duré inégale : l'étape de chauffage dans la quelle la température de la matière à extraire augment jusqu'à la température de distillation (apparition de premier goutte de distillat) cette température est sensiblement égale à la température d'ébullition de l'eau. Cette période de chauffage est pratiquement égale 30 minutes pour entrainement à la vapeur, 20 minutes pour hydro-distillation classique et 2 minutes concernant l'hydrodistillation assisté par micro-onde. En revanche l'étape d'extraction proprement dite durant laquelle les différents composés sont effectivement distillés est nettement plus longue (de l'ordre seulement de 30 min pour l' hydro-distillation assistée par micro-ondes ,de 3 heures pour l'hydro-distillation classique et de quatre heures de distillation par entrainement à la vapeur d'eau).

Dans ce contexte nous avons montré que le rendement est variable selon la technique d'extraction, Le rendement de l'HE de graine de nigelle obtenus par entrainement à la vapeur d'eau est 0.12%, le rendement de l'HE obtenus par hydrodistillation a donnée 0.3%, alors que le rendement de l'HE obtenus par hydrodistillation assisté par micro-onde est 0,48 %. Cette dernière est la meilleur non seulement du point de vu rendement mais aussi c'est une technique qui minimise la consommation énergétique et donc la plus adéquat à projeter à l'échelle industrielle.

Ainsi le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel Le transfert de chaleur classique se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient. Sous chauffage micro-onde, le volume traité devient lui-même source de chaleur. On parle de dégagement de chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du matériel végétal traité. C'est un mode de chauffage instantané en volume et non en surface [60],voir figure 4.2

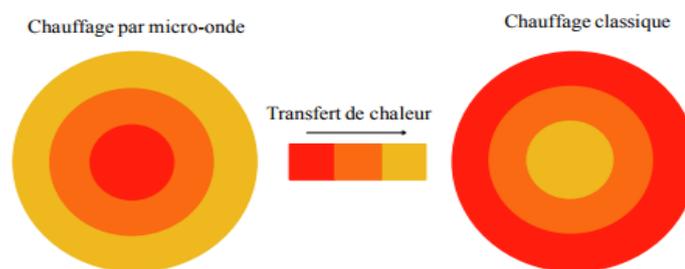


Figure 4.2 : Transfert de chaleur sous chauffage classique et sous chauffage par micro-onde [60].

4.1.3 Caractéristiques physico-chimiques :

Ces essais sont déterminés selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'Organisation Internationale de Normalisation (I.S.O). Ainsi, nous avons reporté dans le tableau 4.2, indice de réfraction et l'indice d'acide mesuré de notre huile essentielle.

Tableau 4.2 : Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de graine de nigelle

	RI	Indice d'acide(%)
HE obtenus par HD-MO	1.4604	1.4676
Les normes I.S.O	1.472± 0.0002	1.468~1.472

Nous remarquons que l'indice de réfraction et l'indice d'acide et de HE de graine de N saliva l sont en accord avec les normes I.S.O.

Dans notre cas, l'indice de réfraction mesurée de l'HE de graine de nigelle est IR=1.4604 et la valeur mesurée de l'indice d'acide égale à 1.4676%.donc on peut dire que notre huile essentielle est de bon qualité lorsque les valeurs mesurées sont dans les normes mais la mesure de deux paramètres n'est pas suffisante pour assurer cette qualité

En revanche La détermination des propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle de graine de nigella sativa l (densité, indice d'ester, de réfraction...) est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques CG/SM et CG/FID, ces deux derniers, souvent utilisées comme moyens analytiques complémentaires pour l'analyse structurale des substances volatiles

4.1.4 Activité anti-inflammatoire de l'hydrolat de graine de nigelle :

Les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème de la patte de souris induit par le formol à 1%. Il est testé sur ce modèle l'hydrolat des graines de N.sativa l en administration par intra-péritonéale. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'un médicament le Diclofénac qui est un anti-inflammatoires non stéroïdiens et à ceux du contrôle physiologique

Les résultats sont cosignés dans les tableaux 4.3 et4.4.

Tableau 4.3 : Activité anti-inflammatoire de l'hydrolat de graine de nigella sativa l comparée au Diclofénac de sodium

	PPG	PPD	PPG – PPD
Lot hydrolat			
Souris 1	0.1895	0.1413	0,0482
Souris 2	0.1655	0.1349	0,0306
Souris 3	0.1817	0.1331	0,0486
Souris 4	0.1543	0.1162	0,0381
Souris 5	0.1229	0.0992	0,0237
Lot de solution physiologique 0.9%			
Souris 1	0.2088	0,1893	0,0195
Souris 2	0,2102	0,1705	0,0397
Souris 3	0,2197	0,1683	0,0514
Souris 4	0,2474	0,187	0,0604
Souris 5	0,2248	0,182	0,0428
Diclofénac du sodium 12,5 mg			
Souris 1	0,1852	0,1729	0,0123
Souris 2	0,195	0,1611	0,0339
Souris 3	0,215	0,1701	0,0449
Souris 4	0,196	0,1622	0,0338
Souris 5	0,1768	0,1540	0,0228

Tableau 4.4. : Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'hydrolat des graines de nigelle, 3 heures après l'induction de l'œdème :

Produit	PPG-PPD M±SD	% d'inhibition
Solution physiologique à 0.9%	0,04072± 0.0154**	-
Hydrolat	0,03784 ±0.0109**	7.07%
Diclofénac du sodium 12.5mg	0,02954±0.011**	27.45%

M = Moyenne de 5 souris; résultats exprimés en M ± DS (Déviation standard); *p<0,05
**p<0,01; test t Student.

Après l'injection de l'eau physiologique, la carragénine entraîne une augmentation significative du poids de la patte de souris de $0,04072 \pm 0,0154$ après 30 mn. L'injection de Diclofénac à la dose de 12,5 mg par voie i-p prévient de façon significative l'augmentation du poids de la patte de souris. Elle est de $0,02954 \pm 0,011$ 30mn après l'injection du formol. En ce qui concerne l'hydrolat, elle est de $0,03784 \pm 0,011$ 30 mn après l'injection de formol (fig. 4.3).

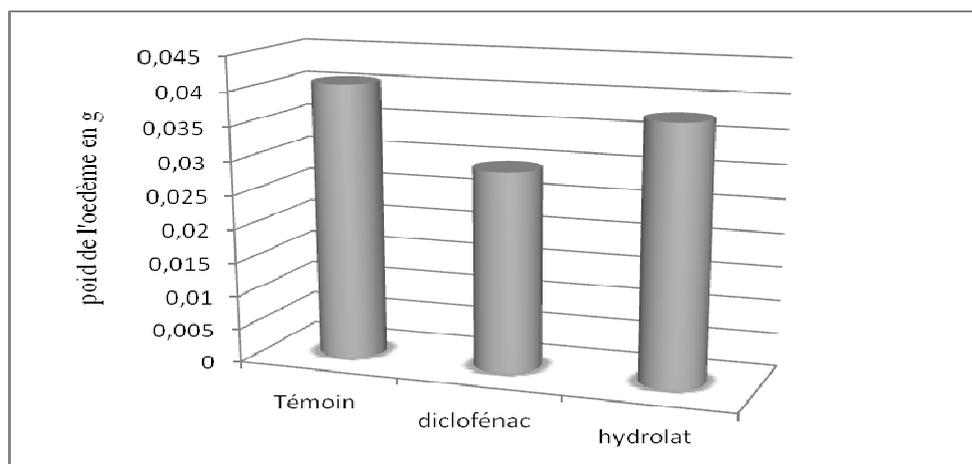


Figure 4.3 : Evolution de l'œdème ($m \pm E.T$) en présence d'un prétraitement par voie intra-péritonéale, après l'injection du formol (0,025 ml; 1%), Chaque barre représente une moyenne de 5 souris

L'analyse du tableau 4.4 montre l'existence d'un effet anti-inflammatoire de l'hydrolat de graine de *N.sativa* l'obtenus par HD-MO mais à des degrés très inférieure à celle de diclofénac de sodium.

On remarque que l'activité anti-inflammatoire de l'hydrolat de graine de nigelle est peu marquée par ce que HE se trouve à l'état de trace dans l'hydrolat et par conséquent on retrouve des traces des substances à activité anti-inflammatoire principalement la thymoquinon le composé actif contre l'inflammation

Finalement, nos résultats nous permettent de confirmer l'activité anti-inflammatoire in vivo de diclofénac de sodium à concentration de 12.5 mg avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème 27.45% et nous permettent aussi de déterminer l'existence de l'activité anti-inflammatoire d'huile essentielle de graine de nigelle

4.1.5 : Activité microbienne de l'hydrolat de N.Sativa :

Ce travail a pour but de démontrer si l'huile essentielle de nigelle a un pouvoir antimicrobien et antifongique sur les souches bactériennes et champignons pathogènes.

La méthode utilisée consiste à mesurer la sensibilité des bactéries et des champignons dans l'extrait pure de gains de nigelle sans émulsifiant. Après l'incubation des disques pendant 24h à 37°C pour les bactéries et 48h à 25°C pour les champignons, on remarque les zones d'inhibitions qui sont sous forme d'un cercle clair autour des disques.

Cette zone d'inhibition, mesurée en millimètres, y compris le diamètre du disque de papier, a été utilisée comme critère pour mesurer l'activité antibactérienne et antifongique de graine de nigelle.

Les activités antibactérienne et antifongique sont estimées comme suit :

- Fort pour des diamètres de zone d'inhibitions supérieur à 18 mm ;
- Moyenne pour des valeurs comprises entre 13 et 17 mm ;
- Faible pour des valeurs qui n'excèdent pas 10 mm ;
- Nulle dans le cas d'un développement des colonies en contact du disque.

Nous avons organisé les résultats obtenus envers les souches testées dans ce tableau

Tableau 4.5: Mesure de l'activité inhibitrice de l'hydrolat de graine de nigelle sur différents souches microbiennes.

Echantillon	Hydrolat	T+de l'hydrolat
Bactéries		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+ (13mm)	+ (27mm)
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+ (14 mm)	+ (29mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
Champignons		
<i>Candida albicans</i>	+ (20mm)	+ (22mm)
<i>Aspergillus braziliensis</i>	-	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	+

T : témoin ; - : inhibitrice ; + croissance. et Chiffres indiquent les diamètres d'inhibition par mm.

Les résultats obtenus avec cette expérience montrent que l'hydrolat de graines de nigelle a un effet différent sur la résistance des bactéries et champignons, on remarque une large sensibilité des souches de *Klebsiella pneumoniae* (13mm) et *Bacillus subtilis*

(14mm) *vis-à-vis* de l'hydrolat de nigelle et une résistance pour *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*,

Concernant l'activité antifongique, on remarque une large sensibilité des souches de *Candida albicans* (20mm).

Donc la méthode des disques ne fournit que des informations qualitatives sur la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes et fongique *vis-à-vis* du produit à tester (Hart, 1999; Rey, 2010).

4.2 Formulation et caractérisation de la pommade

4.2.1 Formulation de la pommade

Le balayage de formulation va permettre de choisir parmi une vaste palette de variables de formulation celle sur laquelle on va jouer pour fabriquer une émulsion de type donné. Nous pouvons le faire en changeant une seule variable et maintenu toutes autres constantes (balayage unidimensionnelle). Afin d'avoir une émulsion de type E/H dans le rapport phase organique (ϕ_H) /phase aqueuse (ϕ_A) doit être égale ou supérieur à 1. Nous avons proposé de prendre trois rapports, $\phi_H / \phi_A = 70/30$, $\phi_H / \phi_A = 60/40$ et $\phi_H / \phi_A = 50/50$. Le but de notre travail dans un premier temps été alors d'obtenir une pommade stable contenant le moins possible de proportion de tensioactif et le maximum de phase aqueuse.

Les résultats de ce balayage sont résumés sur les tableaux d'appendice E.

Pour la série d'essais réalisé à 70% de vaseline on obtient qu'une seule formule stable d'où on a remarqué la déstabilité des formules réalisés avant centrifugation. La formule stable (E6) contient des quantités identiques de TA et de HEC estimés à 0.96% et une quantité de glycérol égale à 0.12%.

Lorsque on a mesuré le PH de cette formule on a marqué une valeur égale à 7.3 et donc cette valeur de PH est supérieure à 6.5 par conséquent on aura des risques d'irritation cutanés.

Puis, on garde la dernière formule stable et on fait des autres essais à 60% de vaseline

Pour cette série d'essai toutes les formules élaborées sont stables après centrifugation avec une vitesse de 3000 r/mn

Et en fin, dans le but de minimiser la quantité de vaseline pour des raisons économique on a réalisé trois essais à 50% de matière grasse mais on n'obtient pas des formules stables

4.2.2 Caractérisation de la pommade

a) Les analyses organoleptiques

Les résultats des analyses organoleptiques de notre pommade sont :

- Couleur: blanche,
- Odeur: agréable inspiré par les graines de nigelle
- Aspect: onctueux sans présence de grumeaux à l'étalement



Figure.4.4 : Pommade élaboré.

b) Homogénéité

- Macroscopiquement

Après l'étalement d'une couche mince de notre pommade sur une surface plane d'une feuille qu'on plie et qu'on étalier pour la deuxième fois .On vérifie à l'œil et on ne voit aucun présence de grumeaux ou de gouttes d'huile ou d'eau, de ce fait notre pommade est parfaitement homogène.

- Microscopiquement :

Analyse microscopique du produit de référence

A l'issue de l'observation microscopique, il apparaît clairement que la structure est biphasique, donc, présence de deux phases :

une phase hydrophile (phase aqueuse) et l'autre phase lipophile (phase huileuse).

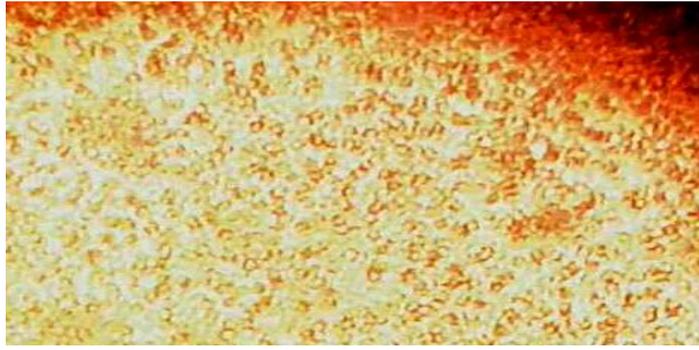


Figure 4.5 : Structure microscopique de la pommade de référence

Analyse microscopique de la pommade formulée

Toutes les observations microscopiques montrent que ce sont des systèmes diphasiques (des émulsions) qui contiennent deux phases : une phase hydrophile (hydrolat de graines de nigelle, TA, HEC, glycérol) et une phase lipophile (vaseline) l'une sous forme de gouttelettes aqueuses dispersées dans une phase huileuse (Voir Figure 4.6).

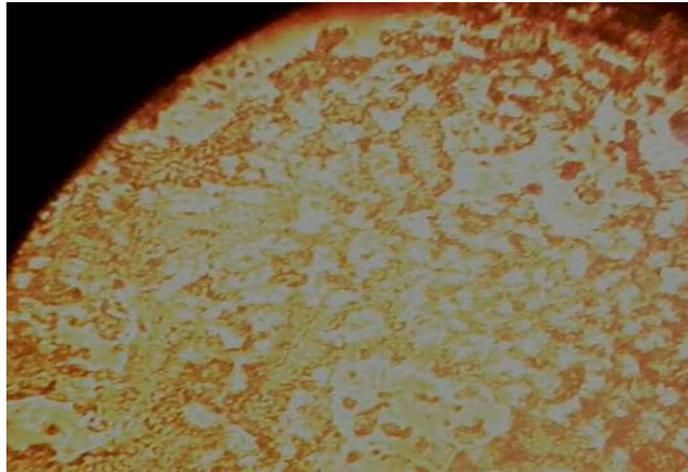


Figure 4.6 : Structure microscopique de la pommade formulée.

c) Contrôles de stabilité

Les tests de stabilité ont été effectués avec une centrifugeuse afin d'accélérer la séparation des deux phases, les essais qui présentent une bonne stabilité sont repris sur le tableau 4.6

Tableau 4.6: Les formulations représentant les pommades stables

Essais	Phase Organique (%)	Phase aqueuse (%)	TA(%)	HEC(%)	Glycérol(%)	Vaseline(%)
Rapport 60/40						
E6	70	30	0.96	0.96	0	60
E7	60	30	0.96	0.96	0	60
E8	60	30	0.32	0.96	0	60
E9	60	30	0.8	0.96	0	60
E10	60	30	0.48	0.96	0	60
E11	60	30	1	2.4	0	60
E12	60	30	1.2	2.4	0	60
E13	60	30	1.4	2.4	0	60
E14	60	30	1.6	2.4	0	60
Rapport 50/50						
E16	50	50	0.48	2.4	0	50
E17	50	50	0.54	0.72	0.09	50

On remarque que des pommades stables ont été obtenue même à une concentration de 0,32% et 0,48% en tensioactif (essai 8 et 10 respectivement), il a été noté que la formulation E16 a permis l'obtention d'une pommade stable avec une diminution de la quantité de la phase huileuse et celle du tensioactif, si on tient compte de l'aspect économique (reconduction à l'échelle industrielle).

Après la centrifugation on ne voit aucune séparation de phase, et notre pommade reste la même, de ce fait notre pommade est vraiment stable.

La figure 4.7 montre la stabilité de cinq formulations (E8, E10, E16, E11et E17) après la centrifugation.



Figure 4.7 : les pommades formulées après centrifugation.

d) Le potentiel Hydrogène

Le paramètre le plus important après l'étude de la stabilité est la teneur en pH de ces pommades étant donné que le produit va être mis en contact direct avec la peau.

Pour cela, nous avons procédé à un test à l'aide d'un pH mètre et papier pH

Les valeurs du pH mesurées par le papier pH sont comprises entre 5,5 et 6, cela est montré par la couleur de papier pH sur la figure 4.8

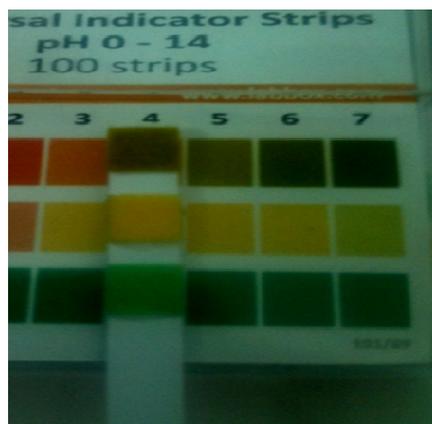


Figure 4.8 : la valeur de pH sur le papier pH.

- Les valeurs de pH mesurées par le pH mètre en fonction du rapport (ϕ_H / ϕ_A) sont regroupés sur le tableau 4.7

Tableau 4.7 : les valeurs de pH en fonction de rapport (ϕ_H / ϕ_A)

pH	Rapport (ϕ_H / ϕ_A)
5,3	50/50
5,58	60/40
6,68	70/30

D'après les résultats du pH en fonction du Rapport (ϕ_H / ϕ_A) nous avons remarqué que le pH a tendance à montrer une augmentation lorsque le rapport ϕ_H / ϕ_A est supérieure à 1 (lorsque la quantité de vaseline augmente), et pour une proportion de 70% de vaseline le pH rapproche de la neutralité cela peut être expliqué par le fait que la vaseline est de caractère basique et a tendance à faire augmenter le pH de la formulation (pommade).

Les valeurs du pH obtenus par les deux méthodes pour les formulations stables (E8, E10, et E11) sont proches de pH cutané (entre 5,5 et 6) donc nous pouvons dire que nous avons pu obtenir le pH voulu.

e) Etude du Comportement rhéologique et détermination de la viscosité

On se propose dans cette partie d'étude de caractériser le comportement rhéologique de notre pommade .Notre analyse est réalisé au sein du laboratoire de recherche universitaire de BLIDA 1.

A partir de l'analyse rhéologique, les courbe d'écoulement enregistrées des pommades formulées ainsi que la pommade de référence présentent une variation non linéaire ce qui dénote un comportement rhéologique non newtonien rhéofluidifiant (car en effet la viscosité apparente diminue lorsque le taux de cisaillement augmente).

Dans notre cas de fluide non newtonien, rhéofluidifiant, c'est le modèle rhéologique de SSKO qui réponde à cette situation, d'écriture [61]:

$$\mu = \mu_{\infty} + K\dot{\gamma}^{(n-1)} .$$

Qui a donné un coefficient d'explication de la variance le plus satisfaisant, $R^2 > 99\%$ ($R=0,99853$). Par ailleurs, au vu de courbe d'écoulements de viscosités de l'essai ; il apparait clairement la bonne représentation de l'ajustement de ce modèle.

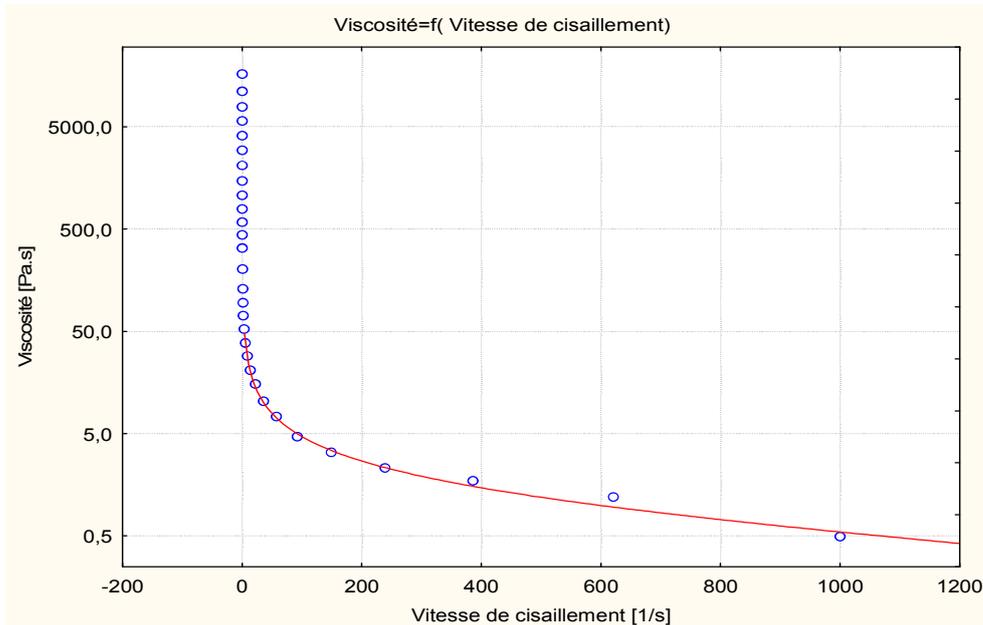


Figure 4.9: Ajustement des courbes d'écoulement de l'essai par le modèle de rhéologique de SSKO.

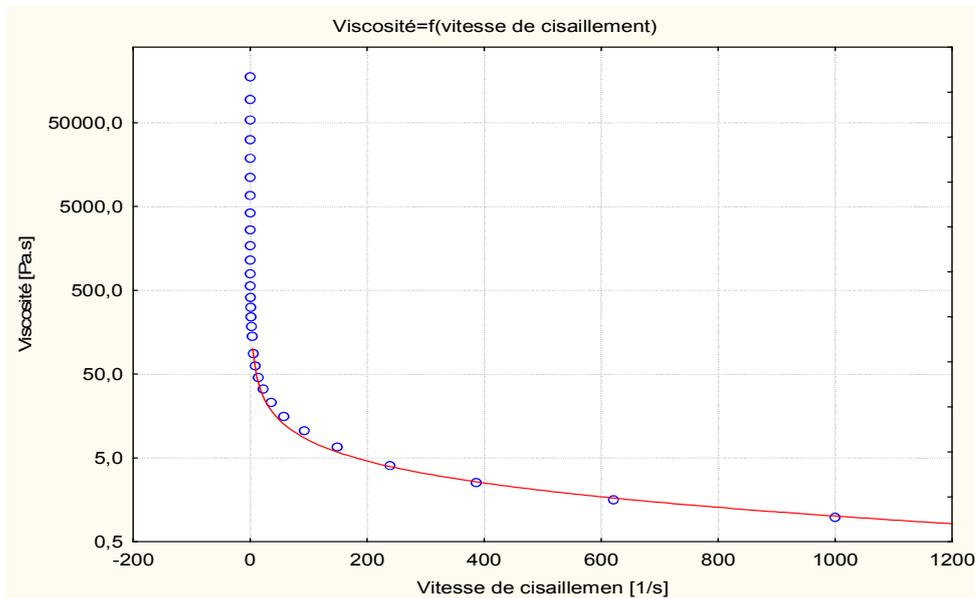


Figure 4.10 : Ajustement des courbes d'écoulement de référence par le modèle de rhéologique de SSKO

Les valeurs des paramètres rhéologiques du modèle de SSKO sont présentées dans le tableau 4.8.

Ainsi, la viscosité infinie de la pomma formulé est plus proche de la référence, de même pour l'indice de structure N.

Tableau 4.8 : Valeurs des paramètres rhéologiques du modèle de SISCO de la pommade élaboré et de la référence.

Essai	Viscosité infinie μ_{∞} (Pa.s)	Indice de consistance K	Indice de structure N
Référence	0,45830	294,85692	0,23276
Pommade élaboré	0,50148	126,62834	0,30593

4.2.3 Etude de l'activité anti-inflammatoire de la pommade à base d'HE de *N.Sativa* :

Les résultats de l'inhibition de l'œdème provoqué par le xylène sont consignés dans les tableaux 4.9 et 4.10.

Tableau 4.9 Activité anti-inflammatoire de la pommade à base d'huile essentielle de graine de nigelle versus l'indométacine :

	POG en (g)	POD en (g)
Lot E (pommade)		
Souris 1	0,0076	0,0081
Souris 2	0,0115	0,0079
Souris 3	0,0100	0,0070
Souris 4	0,0115	0,0121
Souris 5	0,0144	0,0107
Lot T+ (indométacine)%		
Souris 1	0,0114	0,0170
Souris 2	0,0137	0,0127
Souris 3	0,0130	0,0097
Souris 4	0,0134	0,0075
Souris 5	0,0122	0,0104
Lot T-(aucun traitement)		
Souris 1	0,0114	0,0118
Souris 2	0,0050	0,0062
Souris 3	0,0076	0,0042
Souris 4	0,0068	0,0075
Souris 5	0,0057	0,0092

Lot placebo		
Souris 1	0,0113	0,0099
Souris 2	0,0105	0,0092
Souris 3	0,0108	0,0070
Souris 4	0,0123	0,0139
Souris 5	0,0110	0,0123

Tab 4.10 : Réduction de l'œdème par la pommade après 4 heures de l'application cutané :

	OG	OD	% Réduction de l'œdème
Lot E	0,0110	0,0090	22.22
Lot T+	0.0127	0.0114	10,05
Lot T-	0,0073	0,00778	6.57
Lot placebo	0,01118	0,01046	6,88

Ce test nous a fourni des preuves que la pommade formulée à base de l'huile essentielle de graine de nigella sativa l extraite par HD-MO a un effet anti-inflammatoire topique supérieure à celle de l'indométacine dans ce modèle d'inflammation cutanée chez la souris.

Ainsi, des travaux ont permis de montrer que la TQ est le principe actif qui rentre dans la composition chimique de l'huile volatile extraite partir de graine de nigelle sativa l permettait de jouer un effet anti-inflammatoire par l'inhibition de certaines protéines impliquant les voies immunitaires

Finalement, nos résultats nous permettent de confirmer l'activité anti-inflammatoire in vivo de l'indométacine à concentration de 12.5 mg avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème estimé à 10.05% et nous permettent aussi de déterminer l'existence de l'activité anti-inflammatoire de notre pommade avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème doublement supérieure à celle de la référence (indométacine)

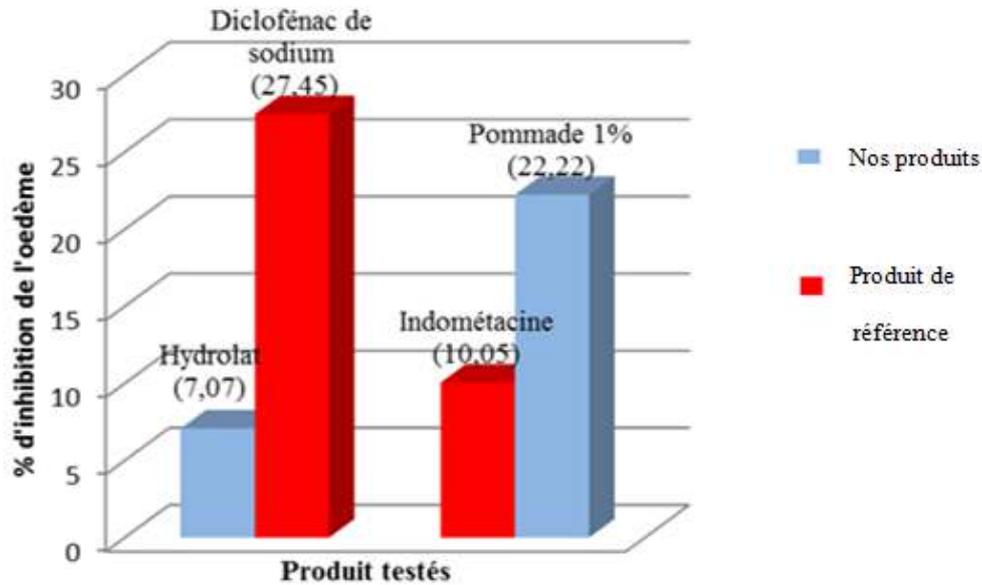


Figure 4.11 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'hydrolat versus diclofénac de sodium et de la pommade formulé versus l'indométacine.

4.2.4 Effet de la pommade sur les souches microbiennes :

Notre travail a pour but de démontrer si la pommade formulé a un pouvoir antimicrobien et antifongique sur les souches bactériennes et champignons pathogènes utilisé dans laboratoire de l'hygiène.

La méthode utilisée consiste à évaluer la résistance des bactéries et des champignons contre la pommade élaborée par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition présentée sur les boites de Pétri.

Nous avons organisé les résultats obtenus envers les souches testées dans le tableau 4.11.

Dans le cas du germe *Staphylococcus aureus*, on remarque un effet d'inhibition du développement de germe (14mm); par contre une faible sensibilité pour *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (10mm, 9mm et 9mm respectivement) et une résistance pour *Bacillus subtilis*.

Les résultats des tests microbiologiques qualitatifs sont représentés dans Appendice H.

Tableau 4.11 : Mesure de l'activité inhibitrice de la pommade sur différents type de souches.

Echantillon	Pommade	T+de la pommade
Bactéries		
:Klebsiella pneumoniae	+ (10mm)	+
Escherichia coli	+ (9mm)	+
Pseudomonas aeruginosa	+ (9mm)	+
Bacillus subtilis	-	+
Staphylococcus aureus	+ (14 mm)	+
Champignons		
Candida albicans	+	+
Aspergillus braziliensis	+	+
AF	+	+

4.2.5 Observations cliniques et cotation des réactions cutanées

L'observation des signes d'érythème et d'oedème chez les deux animaux et la cotation des réactions s'effectuent au bout de 60 minutes et ensuite 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du timbre. S'agissant de l'animal du test initial, la plage soumise à l'épreuve est aussi examinée immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant sur le tableau 4.12. Si la peau présente des lésions qui n'accusent pas l'irritation ou la corrosion après 72 heures, il pourra être nécessaire d'observer l'animal jusqu'au quatorzième jour afin de déterminer la réversibilité des effets.

La détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IP) se fait par l'addition des chiffres obtenus pour l'érythème et l'œdème à chaque temps de lecture, les chiffres ainsi obtenus sont additionnés, ce totale est divisé par 24, la moyenne ainsi obtenue représente l'IP, celui-ci permet de classer le produit en quatre type de réponse :

- Action non irritante : $IP < 0,5$;
- Action légèrement irritante : $0,5 \leq IP < 2$;
- Action moyennement irritante : $2 < IP \leq 5$. ;
- Action sévèrement irritante : $5 < IP \leq 8$.

Les résultats de l'étude sont récapitulés dans le tableau suivant:

Tableau 4.12 : les valeurs numériques de l'évaluation de l'érythème et l'œdème suivant l'échelle de Draize.

	Eryt					Œd				
	PE	ETL	EBD	EMG	EG	PO	OTL	OL	OM	OG
1 heure	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24 heures	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48 heures	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72 heures	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14 jours	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Avec :

Formation d'érythème et d'escarre

PE : Pas d'érythème.....	0
ETL : Érythème très léger (à peine perceptible).....	1
EBD : Érythème bien défini	2
EMG : Érythème modéré à grave.....	3
EG : Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème.....	4

Formation d'œdème

PO: Pas d'œdème	0
OTL : Œdème très léger (à peine perceptible)	1
OL : Œdème léger (enflure d'environ 1 mm)	2
OM : Œdème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
OG : Œdème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée).....	4

Et :

Eryt : érythème

Œd : œdème

D'après les résultats de tableau, tous les nombres sont inexistant (égale à zéro) donc 'il n'y a pas d'irritation de la zone traitée après 72 heures et c'est ce qui

nécessite une observation supplémentaire après 14 jours pour prouver qu'il n'y a aucune irritation en permanence.

La dernière lecture après 14 jours implique aussi l'absence d'irritation au niveau de la surface traité par la pommade, qui implique que notre pommade n'est pas irritante à cette dose de principe actif (1% de l'huile essentielle de graine de nigelle dans la formulation) et aussi n'est pas réversible.

L'indice d'irritation primaire est calculé selon la formule suivante :

$$IP = \frac{24h + 72h}{24}$$

AN

$$IP = \frac{0+0}{24}$$

IP=0

Notre produit présente un indice d'irritation primaire cutanée IP égale à 0. Donc selon l'échelle numérique de Draize, notre pommade est considérée comme un produit à action non irritante pour la peau.

Nous avons appliqué aussi notre pommade sur des volontaires ayant des problèmes de la peau (brûlures, plaies ...), elle a été appliquée une fois par jour pendant dix jours. Le résultat a été plutôt positif et représenté dans la figure 4.12.



Figure 4.12 : Effet de la pommade sur la peau brûlée

Conclusion et perspective:

L'emploi de l'huile essentielle de graines de nigelle dans la fabrication des préparations médicamenteuses pour le traitement des maladies liés à la peau, notamment les problèmes inflammatoires est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à son extraction.

Dans ce travail il a été question de développer une pommade BIO à base d'huile essentielle de graines de nigelle qui a pour indication de nombreuses propriétés thérapeutiques comme l'anti inflammatoire.

Le rendement de l'huile essentielle dépend non seulement de l'origine de graines, mais aussi du procédé appliqué pour l'extraction. Dans ce travail nous avons étudié l'entraînement à la vapeur d'eau, l'hydro-distillation et hydro-distillation assisté par micro-ondes.

Nous pouvons dire que l'effet sur le rendement dépend de la méthode de l'extraction, cette étude nous a permis de remarquer que la technique d'hydro-distillation assistée par micro-onde est la meilleure pour cette plante avec un rendement de 0,48 %.

L'étude rhéologique de notre pommade nous a permis de déterminer sa nature rhéologique qui consiste en un fluide non-newtonien rhéofluidifiant.

La soumission des produits finis à différents tests de qualité (homogénéité, pH, stabilité, tests micro biologique et les tests anti-inflammatoire) a montré qu'il est conforme aux normes pharmaceutiques.

Le pouvoir antibactérien de l'hydrolat de graines de nigelles contre les différents types de souches a été mis en évidence par la méthode de disques « diffusion sur gélose », cette technique nous a démontré que *Candida albicans* est sensible à l'action inhibitrice de nos graines.

Les résultats de notre travail nous a permis de confirmer l'activité anti-inflammatoire de notre pommade avec un pourcentage d'inhibition de l'œdème doublement supérieure à celle de la référence (indométacine).

En effet, Notre objectif à l'avenir est d'obtenir une quantité importante d'huiles essentielles de graine de nigelle pour identifier tous ses composants et d'étudier ses propriétés physico-chimiques, Ensuite, nous améliorons notre travail avec les analyses chromatographiques CG/SM, cette dernière, utilisée fréquemment comme moyen analytique complémentaire pour l'analyse structurale des substances volatiles.

En fin, nous espérons bien aussi d'avoir d'autres activités pharmacologiques comme l'activité antidiabétique, antiallergique et aussi l'activité antioxydant.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

1. Benkhighe, O., et al., Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Botanica Barcinonensia*, 2010. **53**: p. 191-216.
2. Franchomme, P., R. Jollois, and D. Péroël, Matière médicale aromatique fondamentale L'aromathérapie exactement. Roger Jollois éditeur, Limoges, France, 1990: p. 44-48.
3. Koedam, A., J.J. Scheffer, and A. Baerheim Svendsen, Comparison of isolation procedures for essential oils. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 1979. **168**(2): p. 106-111.
4. Ghedira, K. and R. Le Jeune, Huile de nigelle cultivée, *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae). *Phytothérapie*, 2010. **8**(2): p. 124-128.
5. Aroma-Zone, A.-Z., Huile végétale de Nigelle BIO (Cumin noir).
6. PIERRON, C., FACULTE DE PHARMACIE.
7. fr.labo-hevea.com.
8. Bousbia, N., Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agroalimentaires, 2011, Université d'Avignon; Institut national agronomique (El Harrach, Algérie).
9. Dridi, F., Extraction et analyse de l'huile essentielle de cumin formulation d'une pommade décongestionnante, 2005.
10. PIERRE, A.A.D., FACULTE DE PHARMACIE.
11. Nousseiba, A., Effets de *Nigella sativa* L. dans la maladie cœliaque de l'adulte et potentiel protéolytique de la protéase des graines de Nigelle sur la gliadine. 2017.
12. Hanane, K., Etude des effets des huiles polaires et apolaires des graines de *Nigella sativa* L. sur l'activité de l'élastase: Application à la maladie pulmonaire obstructive chronique et à l'emphysème pulmonaire, 2011, Université Ferhat Abbas de Sétif 1.
13. Jean-Paul, P.B., La Nigelle, une panacée peu connue en Occident, 1987, Université de Bourgogne.
14. HADJADI, N., Optimisation des paramètres influençant le taux d'extraction de l'huile des graines de nigelle (*Nigella Sativa* L.) par pressage, 2008, INA.
15. Abed, N., Effets de *Nigella sativa* L. dans la maladie cœliaque de l'adulte et potentiel protéolytique de la protéase des graines de Nigelle sur la gliadine.
16. https://fr.wikipedia.org/wiki/Nigelle_cultiv%C3%A9e.
17. BOUDAH, P.A. and E. Constantine, Effets de *Nigella sativa* L. dans la maladie cœliaque de l'adulte et potentiel protéolytique de la protéase des graines de Nigelle sur la gliadine.

18. Al-Ghamdi, M., The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *Journal of ethnopharmacology*, 2001. **76**(1): p. 45-48.
19. Al-Naggar, T., et al., Neuropharmacological activity of *Nigella sativa* L. extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 2003. **88**(1): p. 63-68.
20. Bessah, R. and E.-H. Benyoussef, La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Revue des Energies Renouvelables*, 2015. **18**(3): p. 513-528.
21. BIOCHIMIE, E., ROUBA LAMIA, 2012, UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF.
22. M.CHABNI, ETUDE DE LA STABILITE PHYSIQUE DES SYSTEMES DISPENSES. 2012: p. 1.
23. Berthod, A., Structures physico-chimiques des milieux disperses, micelles émulsions et microémulsions. *Journal de chimie physique*, 1983. **80**: p. 407-424.
24. Cabane, B. and S. Hénon, *Liquides: solutions, dispersions, émulsions, gels* 2003: Belin Paris.
25. Goalard, C., Etude physico-chimique du procédé de dispersion des poudres libres et agglomérées en milieu liquide, 2005, Institut National Polytechnique de Toulouse.
26. POCHARD, I., DE LA PHYSICO-CHIMIE DE L'INTERFACE PARTICULE/SOLUTION A L'AGREGATION/DISPERSION COLLOIDALE.
27. Bongono, J., Caractérisation des suspensions par des méthodes optiques. modélisation par réseaux de neurones, 2010, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne.
28. Ziyani, L., Etude des phénomènes physico-chimiques à l'interface émulsion de bitume/substrat minéral-Application à la formulation de Bétons Bitumineux à l'Emulsion (BBE), 2013, Université Nantes Angers Le Mans.
29. Brochette, P., Emulsification: Elaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*, 1999. **2**: p. J2150. 1-J2150. 22.
30. Debas, H., Émulsification en systèmes microstructurés, 2009, PhD thesis, Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
31. Doumeix, O., Opérations unitaires en génie biologique: Les émulsions 2011: SCÉRÉN-CNDP-CRDP [Aquitaine].
32. STAUFFER, F., FACULTE DE PHARMACIE.
33. Giardi, C., Synthèse de surfactifs à base de polyoxazoline: propriétés physicochimiques et formulation, 2011, Ecole nationale supérieure de chimie.
34. H.SEBBACHE, formulation et caractérisation des émulsions multiples stabilisées par des biopolymère p. 5.
35. Dalmazzone, C., Génération mécanique des émulsions. *Oil & Gas Science and Technology*, 2000. **55**(3): p. 281-305.

36. Jouanny-Bouyer, E., Stabilisation d'émulsions d'intérêt pharmaceutique par des protéines et des polysaccharides: exemples de la β -lactoglobuline, de la gomme arabique et de la gomme xanthane, 2011, Paris 11.
37. Cayot, P. and D. Lorient, Structures et technofonctions des protéines du lait 1998: Arilait Recherches.
38. Arditty, S., Fabrication, stabilité et propriétés rhéologiques des émulsions stabilisées par des particules colloïdales, 2004, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I.
39. Guerrini, E. and A. Heurtematte, Jargon cosmétique. Le MiDiFABs, 2006: p. 49.
40. Dillemann, G., H. Bonnemain, and A. Boucherle, La pharmacie française: ses origines, son histoire, son évolution 1992: Tec & Doc-Lavoisier.
41. Le Hir, A. and M. Janot, Pharmacie galénique (bonnes pratiques de fabrication des médicaments). Abrégés de pharmacie, 2001.
42. F.DRIDI, EXTRACTION ET ANALYSE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE CUMIN FORMULATION D'UNE POMMADE DECONGESTIONNANTE. 2005.
43. Marti-Mestres, G. and F. Nielloud, Emulsions in health care applications—an overview. Journal of dispersion science and technology, 2002. **23**(1-3): p. 419-439.
44. www.physique-chimie-lycee.fr.
45. www.eduonline.net.
46. Tran, H., et al. Propriétés mécaniques multi-couches de la peau humaine in vivo. in Colloque National en Calcul des Structures. 2005.
47. Bourezg, F.L., Émulsions stabilisées par des particules polymériques biodégradables: études physico-chimiques et évaluation pour l'application cutanée, 2013, Université Claude Bernard-Lyon I.
48. Laplante, A., Mécanismes de réépithélialisation des plaies cutanées: expression des protéines de stress chez la souris et analyse à l'aide d'un nouveau modèle tridimensionnel humain développé par génie tissulaire, 2002, Université Laval.
49. Tran, H.-V., Caractérisation des propriétés mécaniques de la peau humaine in vivo via l'IRM, 2007, Université de Technologie de Compiègne.
50. Frelichowska, J., Émulsions stabilisées par des particules solides: études physico-chimiques et évaluation pour l'application cutanée, 2009, Université Claude Bernard-Lyon I.
51. Aroma-Zone, A.-Z., Huile végétale d'Andiroba BIO.
52. Gilbert, L., Caractérisation physico-chimique et sensorielle d'ingrédients cosmétiques: une approche méthodologique, 2012, Université du Havre.
53. Karam, A., Le glycérol, une matière première renouvelable pour la préparation catalytique de nouveaux bioproduits, 2010, Thèse de l'Université de Poitiers.

54. Traore, F., Proposition de formulation d'un sirop antipaludique a base de argemone mexicana l. papaveraceae. Médecine, de Pharmacie et d'Odonto Stomatologie du Mali, 2010. **94**.
55. A.F.N.O.R 2000, P.h.e., Densité relative :NFT 75-111,Indice de refraction :NFT 75-112,Indice d'acide : NFT 75-103;Indice d'ester NFT 75-104,Indice de saponification :NFT 75-107.
56. Yougbaré-Ziébrou, M., et al., Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de Saba senegalensis Pichon (Apocynaceae). Phytothérapie, 2016. **14**(4): p. 213-219.
57. Choplin, L. and P. Marchal, La rhéologie systémique ou une rhéologie au service d'un génie des procédés et des produits. Rhéologie, 2007. **12**: p. 9-18.
58. BOURICHE, H., R. MEHDADI, and R. BELHATTAB, Evaluation de l'effet anti-inflammatoire et antioxydant des extraits de Malva parviflora L.
59. Effet irritant/corrosif aigu sur la peau, nouvelle version de la Ligne directrice 404 Adoptée: 28 juillet 2015 ,Saidal-CRD.
60. Farhat, A., Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application, 2010, Université d'Avignon.
61. Partie, I., Fluides La rhéologie et la stabilité des pâtes.
62. Hassanien, M.F., et al., Health-promoting value and food applications of black cumin essential oil: an overview. Journal of food science and technology, 2015. **52**(10): p. 6136-6142.
63. Benhaddou Andaloussi, A., Étude des propriétés antidiabétiques de Nigella sativa: sites d'action cellulaires et moléculaires. 2010.
64. /www.informationhospitaliere.com/pharma-2627-carragenine.html.

APPENDICES

Appendice A :

Symboles et abréviations

°C : Degré celcius.	IA : Indice d'acide.
%inhibition : Pourcentage d'inhibition de l'œdème.	IE : Indice d'ester.
η : Viscosité [Pa.s].	IP : Indice d'irritation primaire cutanée
γ' :Vitesse de cisaillement [S^{-1}].	IR : Indice de réfraction IR.
τ : Contrainte de cisaillement [Pa].	ISO : International Organization for Standardization.
λ : Pouvoir rotatoire	Kg : Kilogramme.
μl : Micro litre.	KOH : Hydroxyde de potassium.
φH : phase organique.	MAHD : Hydro-distillation assistée par micro-onde
φA : phase aqueuse.	MH : Mueller Hinton.
AFNOR : Association française de normalisation	mN : Milli newton.
BIO : Biologique.	mPa : Milli pascal.
cm : Centimètre	N. sativa : Nigella sativa.
d²⁰₂₀ : Densité relative	nm : Nanomètre.
DL50 : La dose létale médiane	NF : Normes française.
DS : Deviation standard.	NFT : Nutrient Film Technique.
E/H : Emulsion Eau/ huile.	O_D : Poids de l'oreille droite.
E/H/E : Emulsion Eau/ huile/ eau.	O_G : Poids de l'oreille droite.
EPP : Pépin de pamplemousse.	œd : Œdème.
Ery : Erythème.	OXOID : Sabouraud.
E-V : Entraînement a la vapeur d'eau	PPD : Patte Postérieure Droite.
GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée a la spectrométrie de masse.	PPG : Patte Postérieure Gauche.
H/E : Emulsion Huile/ eau	R² : Coefficient d'explication de la variance.
HEC : Hydroxyéthylcellulose	RHE : Rendement de l'huile essentielle.
HD : Hydro-distilation	T : Température.
HD- MO :Hydrodistillation assiste par micro-onde	TQ : Thymoquinone.
HE : Huile Essentielle	TA : Tensioactif.
HLB : Hydrophilic lipophilic balance (Balance hydrophile lipophile).	UV : Ultra-violet.
HPLC : high performance liquid chromatography (chromatographie liquide de haute performance).	W : Watt.
pH : Potentiel hydrogène	

Appendice B

Différents noms communs de *N. sativa* dans différentes régions du monde [13].

Région : synonymes de *N. sativa*

Arabique : Sinouj, Sanouz, Shunez, Habbah sawda, Habbat al barraka, Kamun aswad

Arménienne : Shoushma

Allemande : Zwiebelsame, Schwarzkümmel

Anglaise : Black seed, Black cumin, Devil in the bush, Love in the mist, Fennel flower, Onion seed

Estonienne : Mustkõõmen

Finlandaise : Neidonkuka

Française : Cheveux de vénus, cumin noir, Nigelle, Poivrette

Hindi : Kalounji, Munga reala

Hongroise : Feketekömény, Parasztbors, Kerti katicavirág, Borzaskata mag

Italienne : Nigella, Melanzis

Norvégienne : Svartkarve

Polonaise : Czarnuszkawna

Punjabie : Kalongi

Russe : Charnushka

Singhalaise : Kaluduru

Espagnole : Niguilla, Pasionara

Suédoise : Svartkummin

Tamile : Karun jiragam

Turquie : Çörekottu siyah

Appendice C :

Structure chimique de quelque composant identifiés de HE et alcaloïdes isolés de Nsativa.

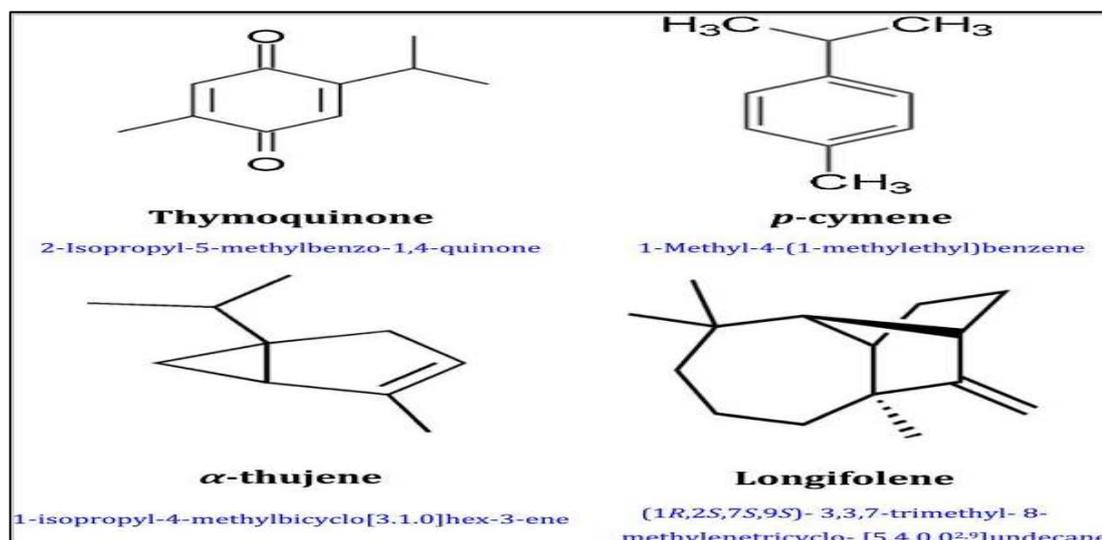


Figure 1 : Structure chimique des composant identifiés de HE de N.sativa d'après [62]

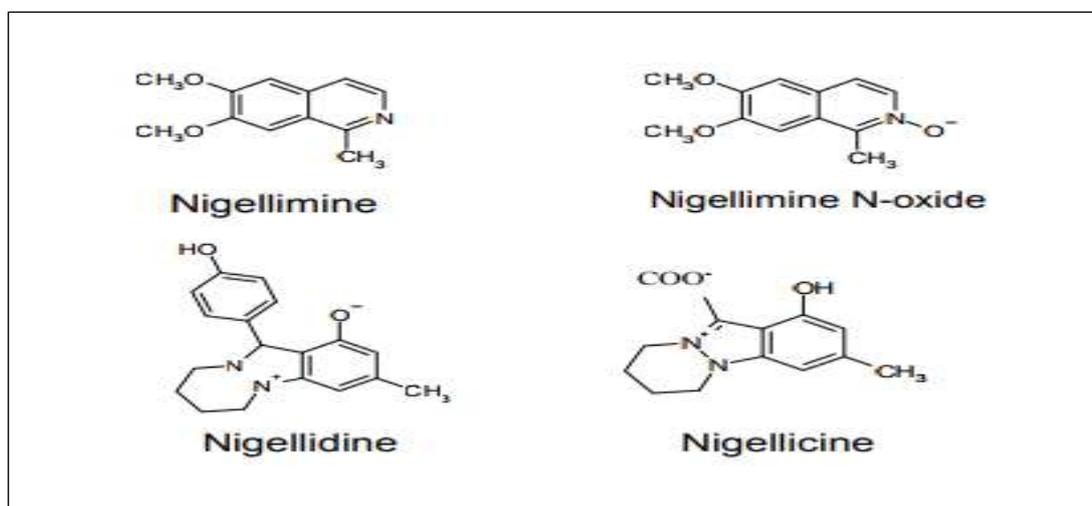


Figure 2 :Structure chimiques des plus importants alcaloïdes isolés des graines de N. sativa [63].

Appendice D:

Etude de kasemi, Iran, 2015 [37] sur la composition chimique de HE de *N.sativa* l

L'huile essentielle des graines de *N. sativa* obtenue par hydrodistillation a été isolée avec un rendement élevé (0,84%). Les résultats analysés par CPG-SM indiquent que l'huile essentielle est principalement constituée de monoterpènes

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Nigella sativa*

Composants	%	Composants	%
α -Thujène	6	γ -Terpinène	5.12
α -Pinène	1.11	Terpinolène	0.23
Camphène	11	Camphor	1
Sabinène	1	Borneol	0.43
β -pinène	7	Carvone	0.32
β -myrcène	0.21	Thymoquinone	20.32
α -phellandrène	0.45	Thymol	10.12
Limonène	0.13	Carvacrol	10
<i>p</i> -Cymène	22.05	Longicyclène	0.9

Appendice E

Série des essais réalisés au cours de la formulation de notre pommade

Tableau.1 : les essais réalisés à 70% de Vaseline

Essai	Phase aqueuse				Phase huileuse	EPP(%)	Stabilité
	TA(%)	HEC(%)	Glycérol (%)	Hydrolat (%)	Vaseline(%)		
E1	0.09	0.06	0.24	Qsp100	70	1	Non
E2	0.15	0.06	0.24	Qsp100	70	1	Non
E3	0.15	0.06	0.12	Qsp100	70	1	Non
E4	0.15	0.03	0.12	Qsp100	70	1	Non
E5	0.15	0.06	0.12	Qsp100	70	1	Non
E6	0.96	0.96	0	Qsp100	70	1	Oui

Le but est d'avoir une pommade stable contenant le minimum de tensioactif et le maximum de phase aqueuse.

Tableau 2 : les essais réalisés à 60% de vaseline

Essai	Phase aqueuse				Phase huileuse	EPP(%)	Stabilité
	TA(%)	HEC(%)	Glycérol (%)	Hydrolat (%)	Vaseline(%)		
E7	0.96	0.96	0	Qsp100	60	1	Oui
E8	0.32	0.96	0	Qsp100	60	1	Oui
E9	0.8	0.96	0	Qsp100	60	1	Oui
E10	0.48	0.96	0	Qsp100	60	1	Oui
E11	1	2.4	0	Qsp100	60	1	Oui
E12	1.2	2.4	0	Qsp100	60	1	Oui
E13	1.4	2.4	0	Qsp100	60	1	Oui
E14	1.6	2.4	0	Qsp100	60	1	Oui

Tableau 3 : les essais réalisés à 50% de vaseline

Essai	Phase aqueuse				Phase huileuse	EPP(%)	Stabilité
	<i>TA(%)</i>	HEC(%)	Glycérol (%)	Hydrolat (%)	Vaseline (%)		
E15	0.15	0.09	0.12	Qsp100	50	1	Non
E16	0.48	2.4	0	Qsp100	50	1	Oui
E17	0.54	0.72	0.09	Qsp100	50	1	Oui

Appendice F:

Protocole illustré de l'activité anti-inflammatoire de l'hydrolat in vivo réalisée à SAIDAL de Médéa.



1. Répartition des trois lots



2. Administration par voie orale de l'hydrolat, Diclofénac et l'eau physiologique pour chaque lot



3. Provocation de l'inflammation par la solution de carragénine



4. Scarification des souris après 3h de l'injection de la carragénine



5. Coupage des pattes postérieures



6. Pesée PPG et PPD pour chaque souris des trois lots pour calculer les pourcentages d'inhibition de l'œdème

Appendice G :

Activité anti-inflammatoire de la pommade in vivo réalisée à SAIDAL de Médéa



1. Répartition les quatre lots



2. Application de la solution irritante sur OD et G de chaque souris Pour le lot témoin négatif, on applique la solution irritante uniquement sur OD



3. Application de la pommade, produit de référence et l'eau distillée respectivement sur OD de chaque souris du lot E, T+et placebo.



4. Scarification des souris après 4 h de l'application de traitement, puis on sélectionne OD et G de chaque souris



5. Coupage un disque de chaque oreille de D=6mm



6. Mettez les disques de chaque lot dans une boîte à part content formol à 10% à fin de les peser



7. Calcule de % d'inhibition de l'œdème pour chaque lot

Appendice H

Les résultats des tests microbiologiques



Figure.1 : sensibilité de *Bacillus subtilis* et *Candida albicans* vis-à-vis de l'hydrolat de graines de nigelle.

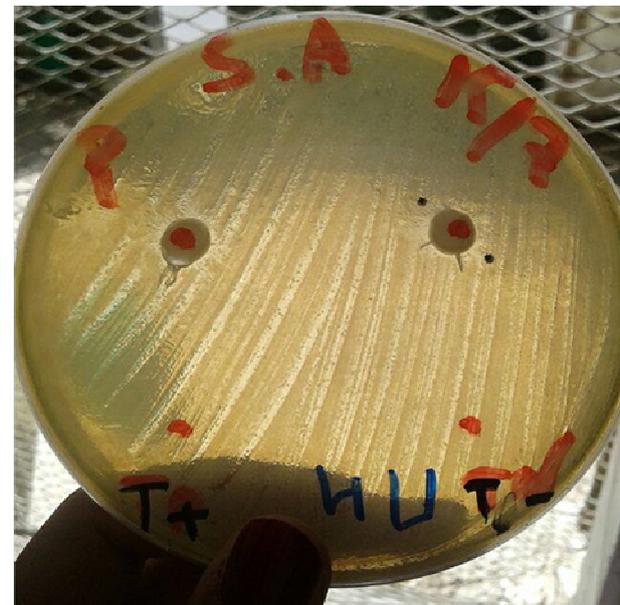
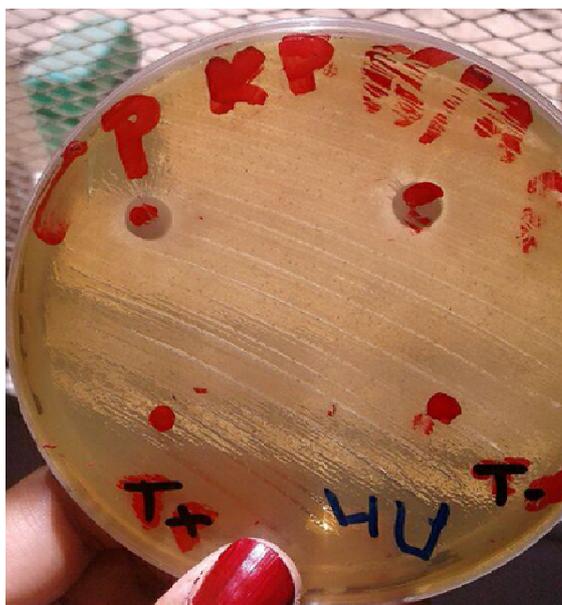


Figure 2 : la sensibilité de *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de la pommade formulé.

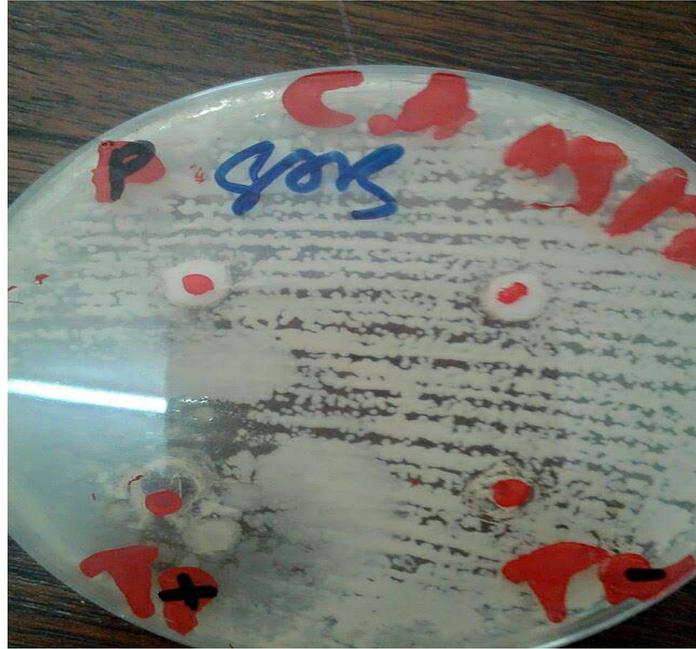


Figure 3: Sensibilité de *Candida albicans* vis-à-vis de la pommade formulé.

Appendice I



Figure.1: photos représentatifs de deux lapins utilisés.



Figure 2: la région dorsale du tronc tondue des lapins.



Figure 3 : les lapins placés dans des cages individuelles après l'application de la pommade.



Figure 4 : observation de la zone traitée après 24heurs de l'application de la pommade.



Figure 5: Observation de la zone traitée après 72 heures de l'application de la pommade.

Appendice J :

Définitions :

1. L'inflammation est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au point irrité par un agent pathogène. Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux : chaleur, douleur, rougeur et tuméfaction (quadrilatère de Celse) Ce terme désigne aussi un processus général réactionnel de tout ou une partie de l'organisme à une agression, qu'elle soit chimique, physique, bactérienne, virale, antigénique ou parasitologique[64].
2. L'irritation cutanée désigne l'apparition de lésions cutanées réversibles consécutives à l'application d'un produit chimique testé durant une période de quatre heures au maximum
3. La corrosion cutanée désigne la survenue de lésions cutanées irréversibles, et plus précisément d'une nécrose visible à travers l'épiderme et dans le derme, à la suite de l'application d'un produit chimique testé durant une période de quatre heures au maximum. La corrosion cutanée se manifeste par des ulcères, des saignements, des croûtes saignantes et, au terme de la période d'observation de 14 jours, par une décoloration due au plissement de la peau, des zones d'alopecie totale et des escarres. On envisagera un examen histopathologique s'il faut élucider des lésions douteuses
4. Carragénine s.f. [carragenan, carrageenin]. Mélange de polysaccharides sulfatés extraits d'algues rouge, gélifiant et émulsifiant alimentaire. Utilisée notamment pour induire des foyers inflammatoires (oedème à la carragénine) en expérimentation animale[65].
5. Indométacine : médicament utilisé dans le traitement de la spondylarthrite ankylosante, de la polyarthrite rhumatoïde, de la goutte, il est également actif dans l'arthrose, la coxarthrose étant une indication de choix