

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agro-vétérinaire et Biologique  
Département de Biologie

# MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Biotechnologies Végétales

## EXTRACTION, CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES DU GERANIUM ROSAT ET FORMULATION D'UNE POMMADE A EFFET CICATRISANT.

Par

**BOUKHATEM Mohamed Nadjib**

Devant le jury composé de :

Mr SNOUSSI. S-A.	Professeur, Université de Blida	Président
Mme BOUCHENAFI. N.	Maître de conférences, Université de Blida	Examineur
Mr BERBER. A.	Maître de conférences, Université de Blida	Examineur
Mr HAMAI. M-S.	Maître de conférences, Université de Blida	Rapporteur
Mme SAIDI. F.	Maître de conférences, Université de Blida	Co-promoteur

Blida, Avril 2010

## **DEDICACES**

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents

Mes frères et sœurs

Mes grands parents et El Hadja

Toute ma famille

*Qu'ils trouvent dans ce modeste travail le témoignage de ma profonde reconnaissance et mon plus grand attachement.*

## REMERCIEMENTS

Je le fais, avec humilité et ferveur, au Tout Puissant, le Miséricordieux, pour m'avoir inspiré et donné la patience et l'abnégation de mener à bien ce travail.

Je remercie profondément Monsieur HAMAIDI M-S, Maître de conférences au département de Biologie de l'université de Blida, pour avoir dirigé ce travail et pour l'intérêt constant qu'il a porté à ce sujet et m'avoir guidé tout en me laissant libre dans mes choix. Je suis très honoré d'avoir pu bénéficier de vos remarques éclairées et tiens à vous assurer de mon grand estime et de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer également toute ma gratitude à Mme SAIDI F, Maître de conférences au département de Biologie, pour les nombreuses heures investies dans la correction du présent manuscrit.

Je souhaiterais lui témoigner ici ma sincère reconnaissance pour tous les conseils et les remarques objectives qu'elle m'a apportés, de m'avoir accueilli dans l'unité de recherche « Biotechnologies végétales » avec la plus grande bienveillance. Vos encouragements et votre confiance m'ont guidé tout au long de ce travail. En témoignage de ma profonde gratitude, veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères.

A notre Président du jury, Monsieur Mr SNOUSSI S.A, professeur au département d'Agronomie.

Nous sommes particulièrement honorés de vous avoir vu assurer la Présidence de ce Jury. Veuillez recevoir ici, cher professeur, notre profonde gratitude.

A notre Jury de Thèse,

Mr BERBER A, Maître de conférences au département de Vétérinaire.

Pour nous avoir fait l'honneur de siéger à notre jury,

Sincères remerciements.

Mme BOUCHENAF A N, Maître de conférences au département de Chimie.

Qu'il nous soit ainsi permis de vous remercier très sincèrement pour avoir spontanément accepté de juger ce travail,

Hommage respectueux.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé grâce à des nombreuses collaborations. Je ne saurais oublier les personnes qui m'ont aidé et soutenue.

J'adresse également mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce projet :

- Tous le personnel technique, administratif et corps enseignant de la faculté des sciences agrovétérinaire et biologique et ceux du département de chimie industrielle et de pharmacie de l'université « SAAD Dahleb » de Blida.
- Ingénieurs de laboratoire de l'unité de recherche « Biotechnologies végétales » et des laboratoires pédagogiques du département de Biologie (Univ. Blida).
- Responsables des laboratoires Rhéologie et Chimie organique du Département Chimie Industrielle et celui de Pharmacie galénique (Univ. Blida).
- Directeur et gérant de la société Extral-Bio des huiles essentielles sise à Chiffa ainsi qu'à tous le personnel technique de l'unité.
- Responsables des unités Pharmacotoxicologie, Stérilité et Microbiologie du complexe Antibiotical de Saidal (Médéa) ainsi qu'à tous les laborantins, techniciens et administrateurs.
- Responsables et laborantins de l'Institut de Formation Professionnelle en Agro-alimentaire (Sidi Abdelkader) de Blida.
- Responsable du laboratoire Géochimie du CRD Sonatrach de Boumerdes.
- Directeur du Jardin d'Essais d'El Hamma (Alger) et à tous le personnel du conservatoire.
- Responsables et personnel de la Bibliothèque de Biologie, d'Agronomie, de bibliothèque centrale et du Centre de Calcul.

Je ne saurais oublier mes amis pour les innombrables moments forts que nous avons vécus ensemble, aux étudiants des 3 promotions de PG (biotechnologies végétales) ainsi qu'à ceux de PG épidémiologie du département vétérinaire.

Nous avons été plus que collègues et amis. Œuvrons pour maintenir cette flamme d'amitié plus vive et grande dans nos vies futures.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce document.

## RESUME

Le géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L.) est une plante à parfum largement répandue en Algérie. La valorisation de ses métabolites secondaires aromatiques offre de nouvelles perspectives dans l'industrie pharmaceutique. Cette stratégie peut contribuer au développement durable de notre pays.

L'extraction de la fraction aromatique (huile essentielle-hydrolat) de la partie aérienne fraîche du géranium rosat a été accomplie par hydrodistillation. Le rendement moyen en huile essentielle est de 0,2%. L'essence aromatique dissoute dans l'hydrolat (0,05%) a été récupérée par condensation de l'eau aromatique avec un solvant organique (éther diéthylique).

Les résultats des analyses physico-chimiques de l'huile essentielle sont en accord avec ceux des normes AFNOR en vigueur. La caractérisation chromatographique (CG-SM) a permis de classer cette huile en « chémotype Citronellol cv Chine ». Celle-ci, reconnue pour sa richesse en composés terpéniques et hydrocarbonés (Citronellol, Formate de citronellyle et Géraniol), est très appréciée en parfumerie.

L'hydrolat, de part son profil riche en composés oxygénés et hydrophiles, est totalement différent de l'huile essentielle.

L'étude antimicrobienne de l'huile essentielle a révélé une grande action inhibitrice sur la croissance des germes pathogènes aussi bien en milieu gélosé qu'en microatmosphère. La fraction aromatique, incorporée dans une crème dermique hydrophile, a présenté une bonne stabilité physico-chimique, rhéologique et microbiologique.

La crème dermique obtenue possède *in vivo* d'intéressantes propriétés pharmacologiques. Elle ne présente aucune toxicité ou irritation dermique. Cette crème est douée de remarquables propriétés cicatrisante et anti-inflammatoire. Elle conduit à des utilisations dermatologiques et ouvre la voie à des recherches qui seraient éventuellement fécondes.

**Mots clés :** *Pelargonium graveolens* L. ; Géranium rosat ; Huiles essentielles ; Hydrolats ; Aromatogramme ; Effet cicatrisant ; Crème hydrophile ; Rhéologie.

## ABSTRACT

Rose scented geranium (*Pelargonium graveolens*) is a perfume plant grown in Algeria. This study is an argument to boost this culture and to insufflate new prospects to enhance its smell secondary metabolites in the drug company. This will contribute to sustainable development of our country.

The essential oil of the plant was extracted by hydrodistillation which give an average yield of 0,2 %. Furthermore, the oil dissolved in the hydrosol, which represents 0,05 %, was recovered by organic solvent (diethyl ether).

The results of the physico-chemical analysis of essential oil are in agreement with those of standards (AFNOR) and its characterization by GC-MS has allowed to classify it with "chémotype Citronellol cv Chine" which is very rich in terpenic and hydrocarbon compounds (Citronellol, citronellyl format, Geraniol). The profile of hydrosol which is rich of oxygen and hydrophilic compounds is totally different from the essential oil.

The antimicrobial study of aromatic fraction showed high inhibitory action on the growth of pathogens as well in medium agar as volatile phase.

The same compound, embedded in hydrophilic skin cream, presented a good physico-chemical, rheological and microbiological stability and quality.

In therapy, this skin cream has interesting pharmacological properties *in vivo*. It is free on toxicity on dermal irritation and endowed with remarkable properties healing and anti-inflammatory drug leading to dermatological uses.

The future will show us the real impact of these recent acquisitions.

**Key-Words** : *Pelargonium graveolens* L. ; Rose Geranium ; Essential oils ; Hydrosols ; Aromatogramme ; Healing effect ; Hydrophilic cream ; Rheology.

## ملخص

تعتبر نبتة عطر الورد المعروفة بالعطرشة (*Pelargonium graveolens*) من بين النباتات العطرية الأكثر إنتشارا في الجزائر. تهدف هذه الدراسة إلى تعزيز و توسيع المساحة المخصصة لزراعة هذه الفصيلة العطرية بغية تحقيق التنمية المستدامة للبلاد من خلال إستخدام مركباتها العطرية في الصناعة الصيدلانية و إنتاج الأدوية الطبيعية.

تم إستخراج الزيوت الأساسية لنبتة عطر الورد بواسطة طريقة التقطير المائي حيث بلغ مردود العملية 0,2 % أما بالنسبة للماء العطري الناتج عن تلك العملية فقد تم تكثيفه بواسطة محلول عضوي من أجل إستخراج الزيوت المذابة فيه و التي قدرت نسبتها ب 0,05 %.

أما بالنسبة للتحاليل الفيزيوكيميائية للزيوت الأساسية فقد جاءت مطابقة للمعايير الدولية المعمول بها في حين أن التحليل الكروماتوغرافي قد سمح بتصنيف تلك الزيوت في خانة "chémotype Citronellol cv Chine" المتميزة بغناها بالمركبات الهيروكربونية و العطرية (*Citronellol, Formate de citronellyle, Geraniol*). كما أن هذه النتائج جاءت مختلفة تماما عن التحليل الكيميائي للماء العطري الذي يحتوي على نسبة كبيرة من المركبات الأوكسجينية و المحبة للماء.

من جهة أخرى فقد كشفت الدراسة الميكروبيولوجية للجزء العطري عن فعالية هذا الأخير في تثبيط نمو الجراثيم المعدية و ذلك من خلال إجراء طريقتين دراسيتين مختلفتين.

و من أجل التحقق من فعالية الجزء العطري المستخلص من النبتة من الناحية الطبية، فقد تم إدماجه في تركيبة صيدلية من نوع كريم البشرة و التي أجريت لها مجموعة من التحاليل الفيزيو كيميائية و الميكروبيولوجية. كما أبدت هذه التركيبة فعالية جيدة في معالجة و إلتأم الجروح الجلدية مع تخفيض من حدة الإلتهابات المحلية لدى الحيوانات المخبرية من دون التسبب في أية أضرار محلية مما يسمح ذلك في خلق آفاق جديدة بالنسبة للبحث العلمي في هذا المجال.

**الكلمات المفتاح :** *Pelargonium graveolens* ; عطر الورد ; الزيوت الأساسية ; المياه العطرية ; فعالية إلتأم الجروح; كريم الجلد، حركية السوائل.

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	
RESUME	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION.....	12
Chapitre 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
1.1. Aroma-hydrathérapie.....	14
1. Aromathérapie .....	14
2. Hydrathérapie.....	20
1.2. Etude botanique du géranium rosat.....	21
1. Classification systématique et aspects botaniques.....	21
2. Écophysiologie.....	26
3. Huile essentielle du géranium rosat.....	26
1.3. Émulsions.....	27
1. Définition, structure et caractéristiques des émulsions.....	27
2. Instabilité des émulsions.....	28
3. Notion d'HLB.....	29
4. Bases théoriques de la formulation des émulsions.....	29
5. Essais des émulsions.....	30
6. Préparations semi solides pour application cutanée.....	31
Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES.....	34
2.1. Matériel.....	34
2.2. Méthodes.....	35
2.2.1. Extraction des huiles essentielles .....	35
2.2.2. Étude analytique des huiles essentielles.....	37
2.2.2.1. Mesure des indices chimiques.....	37
2.2.2.2. Détermination des grandeurs physiques.....	38
2.2.3. Analyses chromatographiques de la fraction aromatique.....	40
2.2.3.1. Principe de la CG-SM.....	40
2.2.3.2. Elaboration des profils chromatographiques.....	40



2.2.4. Etude de l'activité antimicrobienne des HE et HA.....	41
2.2.4.1. Souches microbiennes étudiées.....	41
2.2.4.2. Milieux de culture.....	41
2.2.4.3. Protocoles d'étude.....	41
2.2.4.4. Expression des résultats.....	42
2.2.5. Préparation d'une émulsion semi solide à usage topique.....	42
2.2.5.1. Étude d'orientation.....	43
2.2.5.2. Formulation des crèmes dermiques.....	43
2.2.6. Contrôle physico-chimique des crèmes dermiques.....	46
2.2.7. Caractérisation rhéologique des crèmes dermiques.....	47
2.2.8. Contrôle de la qualité microbienne des crèmes dermiques.....	48
2.2.8.1. Détermination des germes viables totaux.....	48
2.2.8.2. Recherche des germes spécifiés.....	49
2.2.9. Contrôle de la qualité microbienne de l'hydrolat de géranium .....	50
2.2.10. Essais pharmaco-toxicologiques.....	52
2.2.10.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutané.....	52
2.2.10.2. Tolérance locale après applications cutanées itératives.....	52
2.2.10.3. Évaluation de l'activité cicatrisante de la crème dermique.....	53
2.2.10.4. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle.....	54
Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	56
3.1. Extraction de la fraction aromatique du géranium rosat.....	56
3.1.1. Extraction et rendement en huile essentielle.....	56
3.1.2. Extraction de l'huile essentielle dissoute dans l'hydrolat.....	57
3.1.3. Observation microscopique des structures sécrétrices.....	58
3.1.4. Etude de la cinétique d'extraction.....	61
3.2. Etude analytique de l'huile essentielle.....	62
3.2.1. Caractères organoleptiques.....	62
3.2.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	63
3.3. Analyses chromatographiques de la fraction aromatique.....	64
3.3.1. Composition chimique de l'huile essentielle.....	64
3.3.2. Composition chimique de l'hydrolat.....	65
3.4. Activité antimicrobienne de la fraction aromatique.....	68
3.5. Préparation et contrôle physico-chimique des crèmes dermiques.....	72
3.6. Caractérisation rhéologique des crèmes dermiques.....	74
3.6.1. Test de la contrainte seuil.....	74
3.6.2. Etude de la thixotropie.....	75
3.6.3. Test d'écoulement à l'équilibre.....	75

3.7. Contrôle de la qualité microbienne des crèmes dermiques.....	76
3.8. Contrôle de la qualité microbienne de l'hydrolat.....	77
3.9. Essais pharmaco-toxicologiques.....	78
3.9.1. Détermination de l'indice d'irritation cutanée primaire.....	78
3.9.2. Tolérance totale après applications cutanées itératives.....	78
3.9.3. Évaluation de l'activité cicatrisante <i>in vivo</i> de la crème dermique.....	78
3.9.4. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle.....	80
CONCLUSION .....	82

REFERENCES

APPENDICES

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Géraniums des jardins.	10
Figure 1.2	Aspects morphologiques de géranium rosat (Appareil reproducteur).	13
Figure 1.3	Aspects morphologiques de géranium rosat (Appareil végétatif).	14
Figure 1.4	Représentation des différents types d'émulsion.	17
Figure 2.1	Hydrodistillation du géranium rosat (dispositif Clevenger).	24
Figure 2.2	Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri.	31
Figure 2.3	Illustration de la méthode des microatmosphères.	31
Figure 2.4	Protocole d'analyse de la qualité microbienne des préparations pharmaceutiques non obligatoirement stériles (monographies Ph.Eur.).	40
Figure 3.1	Observations microscopiques des structures sécrétrices.	47
Figure 3.2	Coupe transversale au niveau de la tige.	49
Figure 3.3	Faisceau cribro-vasculaire.	49
Figure 3.4	Vue de face au niveau de la partie supérieure de la feuille.	50
Figure 3.5	Évolution du rendement en HE lors de l'hydrodistillation.	51
Figure 3.6	Comparaison entre le profil chromatographique de l'HE et l'HA.	56
Figure 3.7	Aromatogramme des HE et HA.	57
Figure 3.8	Effets de la phase volatile des HE et HA sur la croissance microbienne.	59
Figure 3.9	Crème dermique à base d'huile essentielle (0,3 %).	61
Figure 3.10	Rhéogramme type donnant l'évolution de la vitesse de cisaillement en fonction de la contrainte de cisaillement pour un échantillon de crème.	63
Figure 3.11	Évolution de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement.	64
Figure 3.12	Évolution de la viscosité et contrainte en fonction de la vitesse de cisaillement.	65
Figure 3.13	Évolution de la cicatrisation des plaies chez les lapins avec 3 crèmes.	68

Tableau 1.1	Position systématique du géranium rosat.	12
Tableau 1.2	Exemple d'une composition émulsionnée L/H non ionique.	19
Tableau 1.3	Principaux ingrédients entrant dans la formulation des crèmes dermiques.	21
Tableau 2.1	Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition des disques.	32
Tableau 2.2	Excipients de la crème dermique à base d'essence de géranium rosat.	33
Tableau 2.3	Composition de la crème dermique.	34
Tableau 2.4	Échelle de cotation de l'érythème et de l'œdème lors de l'IPC.	41
Tableau 2.5	Échelle de cotation de l'évolution de la cicatrisation des plaies.	43
Tableau 3.1	Influence de la méthode d'extraction sur le rendement en huile essentielle.	46
Tableau 3.2	Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle.	52
Tableau 3.3	Caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle.	52
Tableau 3.4	Composés majoritaires de l'huile essentielle.	53
Tableau 3.5	Classes biochimiques des composés identifiées dans l'huile essentielle.	54
Tableau 3.6	Composés caractéristiques de 3 cultivars de géranium rosat.	54
Tableau 3.7	Composition chimique de l'hydrolat.	55
Tableau 3.8	Activité antibactérienne de l'HE et HA du géranium rosat.	57
Tableau 3.9	Comparaison entre l'activité antibactérienne des HE chémotypées.	60
Tableau 3.10	Résultats du contrôle microbiologique des crèmes dermiques.	65
Tableau 3.11	Résultats de l'analyse anti-inflammatoire de l'huile essentielle.	69

## INTRODUCTION

De tout temps, le règne végétal a offert à l'Homme des ressources essentielles à son alimentation, son hygiène et sa santé. Depuis les temps les plus anciens, les parfums de ces mêmes végétaux sont associés à des rites mystiques, esthétiques et thérapeutiques.

De nos jours, un certain nombre de plantes aromatiques et médicinales (PAM) sont encore utilisées sous diverses formes. Malgré leur omniprésence, la plupart d'entre elles ont été délaissées, ignorées voire méprisées au profit de médicaments "chimiques". Ces derniers agissent d'une manière rapide en donnant les résultats escomptés. Mais cela n'est pas sans inconvénients d'où l'intérêt de revenir à la formule originale (naturelle). Les phytomédicaments connaissent un engouement considérable depuis qu'ils sont reconnus comme des solutions naturelles efficaces. Cette tendance est la raison principale du renouveau des médecines naturelles. [1]

Avec les progrès de la recherche scientifique, de nouveaux principes actifs et de nouvelles propriétés pharmacologiques ont permis de faire des plantes à parfum d'authentiques médicaments. Leurs nombreuses actions biologiques peuvent corriger et traiter de nombreuses affections cutanées ou autres. [1]

Ce travail fait apparaître des molécules « aromatiques bioactives » issues d'une plante à parfum, le géranium rosat (*Pelargonium graveolens*). Cette plante est référencée par la médecine traditionnelle. [2][3][4][5]

Le sujet de ce mémoire rejoint l'interrogation globale suivante :

« *Les pélargoniums odorants qui jonchent si abondamment les parterres recèlent-elles, en qualité et en quantité, des molécules utiles à notre lutte contre d'éventuelles maladies ?* ».

Pour y répondre, nous avons assigné comme objectif l'investigation approfondie de la fraction aromatique (Huile essentielle-Hydrolat) du géranium rosat. Au cours de notre travail, nous allons décrire les différentes étapes d'extraction, de caractérisation et de valorisation de ladite plante à travers l'usage des métabolites olfactifs dans l'aromathérapie et la dermopharmacie.

Notre étude visait un triple objectif :

- Extraction et caractérisation analytique et chromatographique de l'huile essentielle (HE) et de l'hydrolat (HA) du géranium rosat issu de l'agriculture biologique.
- Évaluation de l'efficacité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'hydrolat *in vitro* vis-à-vis des souches microbiennes de référence.
- Développement et mise au point d'une formule galénique appropriée à usage topique (émulsion semi solide). L'HE et HA seront incorporés comme « solvants actifs ». Il a été intéressant d'étudier les propriétés pharmaco-toxicologiques de la crème dermique - obtenue au cours de notre travail - sur un modèle animal.

## CHAPITRE 1 SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Aroma-hydrolathérapie

#### 1.1. Aromathérapie

##### 1.1.1 Historique

Depuis la plus haute antiquité, sous toutes les civilisations, nos ancêtres ont su utiliser les plantes médicinales et aromatiques. Le Monde Arabe a particulièrement contribué à l'amélioration de la distillation. Vers l'an 1000, IBN SINA dit « Avicenne », avait mis au point le serpentín et l'alambic et développa l'utilisation des essences. Beaucoup de savants se passionnèrent pour la science de la distillation. Avec PARACELSE se développèrent l'Alchimie et la notion de "Quintessence" des plantes qui tomba aussitôt dans l'oubli.

Il a fallu attendre 1928 pour que "l'aromathérapie moderne" soit ressuscitée grâce à un chimiste français, GATEFOSSE. Les progrès de la science et des techniques d'analyses permirent de véritables investigations de ces molécules contribuant pleinement au redéploiement de l'aromathérapie. [6]

##### 1.1.2. Définition de l'aromathérapie

La phytothérapie et l'aromathérapie sont des médecines allopathiques. Les molécules agissent en détruisant les causes du mal ou en supprimant l'expression de la maladie. La phytothérapie désigne l'utilisation à des fins thérapeutiques des plantes médicinales. [7]

Étymologiquement, l'aromathérapie se définit comme: « le traitement, à titre préventif ou curatif, des maladies physiques et psychosomatiques par les "arômes végétaux". Ces derniers sont extraits des plantes odoriférantes ». [7][8]

### 1.1.3. Définition de l'Huile Essentielle

En se référant à la norme française NF T 75-006 [9], l'HE est définie comme « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur ou par des procédés mécaniques à partir de l'épicerpe des citrus ».

Les HE sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Le terme « huile » s'explique par la propriété des HE à se solubiliser dans les graisses. Le terme « essentielle » fait référence à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante. [10]

### 1.1.4. Localisation des huiles essentielles dans la plante

Les HE sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des structures histologiques spécialisées. Elles sont alors stockées dans des cellules à HE (Lauraceae), dans des poils sécréteurs (Geraniaceae), dans des poches sécrétrices (Myrtaceae) ou dans des canaux excréteurs (Asteraceae).

Seules les parties sécrétrices ou les plus concentrées en HE de la plante qui seront récoltées durant la période où le rendement est optimal. [11][12]

### 1.1.5. Rôle des huiles essentielles

Le rôle des essences végétales dans la physiologie de la plante demeure encore mal cerné. Toutefois, les parfums émis jouent un rôle attractif pour les insectes pollinisateurs [13]. Néanmoins ils constituent un moyen de défense naturel contre les insectes prédateurs et les micro-organismes. [14][15]

### 1.1.6. Propriétés des huiles essentielles

#### 1.1.6.1. Composition chimique

La majorité des HE sont composées de 3 ou 4 molécules majoritaires et de très nombreuses molécules minoritaires [16]. Ces composants appartiennent presque tous à 2 groupes : les terpénoïdes et les composés aromatiques [17]. Parmi les terpénoïdes, on retrouve de nombreuses fonctions chimiques : carbures, alcools, aldéhydes, cétones, esters, peroxydes et phénols [6][18]. Les composants des HE sont génériquement dits « aromatiques » en raison de leur caractère odoriférant et non pour indiquer leur structure chimique. Leur masse moléculaire relativement faible leur confère un caractère volatil à la base des propriétés olfactives. [1]



#### 1.1.6.2. Profil chromatographique

Le profil correspond à la liste des constituants sélectionnés parmi ceux qui sont représentatifs et caractéristiques d'une HE. Il est accompagné, pour chacun d'eux, de limites de concentration et, éventuellement, des rapports entre concentrations.

Un constituant est dit représentatif lorsqu'il est présent dans tous les échantillons à une concentration dont la dispersion statistique est sensiblement gaussienne.

Un constituant caractéristique est un constituant dont la concentration constitue une caractéristique. La CG-SM permet d'identifier et de quantifier chacune de ces molécules et d'obtenir ainsi la composition précise des HE. [1][10][19]

#### 1.1.6.3. Notion du Chémotype

Le chémotype ou chimiotype permet de définir la ou les molécules biologiquement actives majoritairement présentes dans l'HE.

A l'intérieur d'une même espèce végétale, on observe des variations chimiques importantes. Elles ont conduit à admettre l'existence de races chimiques. [10]

#### 1.1.6.4. Propriétés physiques

Liquides à température ambiante, les HE sont volatiles et ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau. Elles sont peu solubles dans l'eau mais solubles dans les alcools et les solvants organiques. [20]

#### 1.1.6.5. Mode d'actions

On peut distinguer 2 actions différentes : une activité énergétique et une fonction informationnelle. L'activité énergétique se fait par :

- apport d'électrons (négativation) : anti-inflammatoires, antispasmodiques,
- capture d'électrons (positivation) : actions inverses,
- apport de protons (acidification) : lutte contre l'alcalose sanguine responsable de la dégénérescence organique.

La fonction informationnelle serait à la fois exogène (olfactive) et endogène. [16]

#### 1.1.6.6. Pharmacocinétique

Les HE diffusent rapidement dans tout l'organisme quelques soient les voies d'administrations. *In vivo*, les HE auraient un effet à des concentrations très faibles.

Le catabolisme des HE est très rapide et semble se réaliser de manière importante au niveau hépatique. L'élimination des métabolites formés est essentiellement urinaire. [17][21]

#### 1.1.7. Propriétés thérapeutiques

L'aromathérapie se limite à la lutte anti-infectieuse alors que plusieurs études attribuent aux HE de nombreuses propriétés thérapeutiques. Beaucoup soulageront diverses douleurs. Mais il serait dommage de restreindre l'utilisation des HE sur le plan physique et de ne voir en elles qu'une action moléculaire. C'est sur ce plan psychologique qu'il reste sans doute le plus à découvrir au sujet des HE. [22][23]

#### 1.1.8. Toxicité

Alors que de nombreux ouvrages font référence à la toxicité de nombreux produits phytopharmaceutiques, celle des HE est moins investiguée. On trouve cependant quelques informations sur les toxicités suivantes : [1][8][22][23]

Toxicité par ingestion : Les HE d'usage commun ont une toxicité par voie orale faible avec des DL50 supérieures à 5 g/kg à l'exception de la sarriette et de l'origan. [1]

Toxicité dermique : Les HE qui font un large usage dans la parfumerie peuvent présenter une éventuelle toxicité par application locale. Le thym, la sarriette et la cannelle sont connus pour leur pouvoir irritant. [3]

Toxicité selon la composition : Certaines HE sont classées selon la composition et les toxicités relatives des familles biochimiques auxquelles elles appartiennent. Une utilisation prolongée des essences à thuyones est neurotoxique. [1]

#### 1.1.9. Domaines d'utilisation des Huiles essentielles

##### 1.1.9.1. Aromathérapie

Les HE sont largement utilisées pour traiter certaines affections internes et externes. [22][24]

Actuellement, plusieurs HE et leurs composés majoritaires ont fait l'objet d'une évaluation thérapeutique *in vitro* et *in vivo*. [11][25]

#### 1.1.9.2. Médecine dentaire

Plusieurs HE ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire et les infections pharyngées. [26][27]

#### 1.1.9.3. Utilisation en aéro-ionisation et désinfection des locaux

Étant volatiles, les HE sont utilisées comme agents de préservation pour le contrôle de l'hygiène de l'air, notamment dans le milieu hospitalier. [28][29][30]

#### 1.1.9.4. Industries pharmaceutiques et agroalimentaires :

Outre leur utilisation dans la conservation des aliments, les HE sont employées pour rehausser le goût et empêcher le développement des germes. [31][32]

#### 1.1.9.5. Parfumerie et cosmétologie :

Un grand nombre d'HE est utilisé dans l'élaboration de la majorité des parfums. [33][34][35]

### 1.1.10. Procédés d'extraction des huiles essentielles

#### 1.1.10.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées avant d'être séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE). L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques, évite certains phénomènes de dégradation comme les hydrolyses. [1]

#### 1.1.10.2. Extraction par hydrodistillation

Elle consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. [1]

#### 1.1.10.3. Hydrodistillation sous pression

Elle est appliquée aux matières premières présentant des constituants non entraînés par la vapeur à la pression atmosphérique. [1]

#### 1.1.10.4. Hydrodistillation assistée par micro ondes

L'avantage de ce procédé est de réduire considérablement la durée de distillation et d'incrémenter le rendement. [1][36]

#### 1.1.10.5. Expression à froid

Elle est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes. Elle est réalisée en déchirant ces enveloppes par un traitement mécanique. [1]

#### 1.1.10.6. Extraction par solvant organique

En fonction du solvant utilisé on obtient des hydrolysats (eau comme solvant), des alcoolats (éthanol), des teintures (éthanol/eau) et des résinoïdes (extraits éthanoliques). [37]

#### 1.1.10.7. Extraction par fluide à l'état supercritique

L'extraction par gaz liquéfié met en œuvre le CO<sub>2</sub>. L'avantage de cette méthode est la possibilité d'éliminer et de recycler le solvant par simple compression détente. [1]

#### 1.1.11. Marché des huiles essentielles et des drogues à l'huile essentielle

Le volume total d'HE produit dans le monde en 1995 est estimé à 45000 tonnes environ. Les seize essences les plus importantes dont la production est supérieure à 500 tonnes/an représentent 90 % du volume total. Ce groupe renferme : [38]

- les principales sources d'arômes alimentaires (citrus et menthes),
- les essences utilisées en volume important (compositions pour détergents),
- les produits utilisés pour des hémisynthèses (eucalyptus).

La production mondiale d'HE s'évalue à environ 10 milliards de dollars par an dont 55 % proviendraient du tiers-monde [39]. Les essences aromatiques sont souvent associées à une qualité inconstante, des approvisionnements irréguliers et des prix instables. Ces facteurs sont autant de handicaps à leur utilisation dans l'industrie. [40][41][42]

## 1.2. Hydrolathérapie

L'hydrolathérapie, ou thérapie par les eaux florales, est issue de l'aromathérapie. C'est une thérapie holistique qui soigne et cherche à équilibrer l'entité Corps-Esprit.

Au cours de la distillation d'une plante, on obtient deux produits : l'huile essentielle (HE) et l'hydrolat (HA). [43]

### 1.2.1. Considérations générales

Dans la littérature scientifique anglophone, le terme *hydrosol* est le plus utilisé. Ce mot est inapproprié puisqu'il s'agit d'un terme utilisé pour désigner, en chimie, une solution colloïdale dans l'eau. Le terme *floral water* est également inadéquat puisqu'il désigne uniquement les infusions obtenues par macération de fleurs dans l'eau. Pour mettre fin à cette confusion, les anglophones utilisent de plus en plus le terme français « hydrolat ». [44]

### 1.2.3. Composition chimique des hydrolats

La composition des HA comprend les molécules oxygénées hydrophiles présentes en grandes quantités alors que les composés lipophiles comme les hydrocarbures terpéniques sont généralement quasi absents. [39][43]

### 1.2.4. Propriétés et activités pharmacologiques des hydrolats

Malgré sa faible concentration en PA, l'hydrolat présente des activités pharmacologiques intéressantes. Certains sont utilisés depuis des siècles dans des préparations cosmétiques, thérapeutiques et culinaires.

Un HA d'une plante donnée n'aura donc pas nécessairement les mêmes propriétés que l'HE. Sur le plan thérapeutique, les HA sont mieux tolérés que les HE. Leur faible toxicité en fait un produit original, intéressant à étudier. [44]

## 2. Etude botanique du géranium rosat (*Pelargonium graveolens* L.)

### 2.1. Classification systématique et aspects botaniques

#### 2.1.1. Position systématique des Géraniacées

C'est une famille de Dicotylédones Dialypétales renfermant 3 genres regroupant 750 espèces herbacées ou arbustives. [45][46]

DEMARNE [47], dans la famille des géraniacées, distingue le *Geranium* qui compte 375 espèces, le *Pelargonium* avec 220 espèces et l'*Erodium* comprenant seulement une centaine d'espèces.

Ces 3 genres possèdent une caractéristique commune au niveau du fruit dont la forme est comparable à de longs becs d'oiseau (Fig.1.2 b). Une autre différence entre ces 3 genres réside dans le nombre d'anthers : 5 pour *Erodium*, 7 pour *Pelargonium* et 10 pour *Geranium*. [48]

#### 2.1.2. Considérations générales sur les pélagoniums odorants

Originaires d'Afrique australe où ils sont indigènes, les pélagoniums ont été importés en Europe vers 1690. Ce genre comprend plus de 200 espèces. Néanmoins, une dizaine de variétés seulement sont exploitées pour la production de l'HE. Il ne faut pas confondre le géranium commun des jardins (*P. hortorum*) et l'« Herbe à Robert » (*G. robertianum*) (Fig.1.1). Ils sont différents du géranium rosat car ils ne produisent pas d'HE. [2]

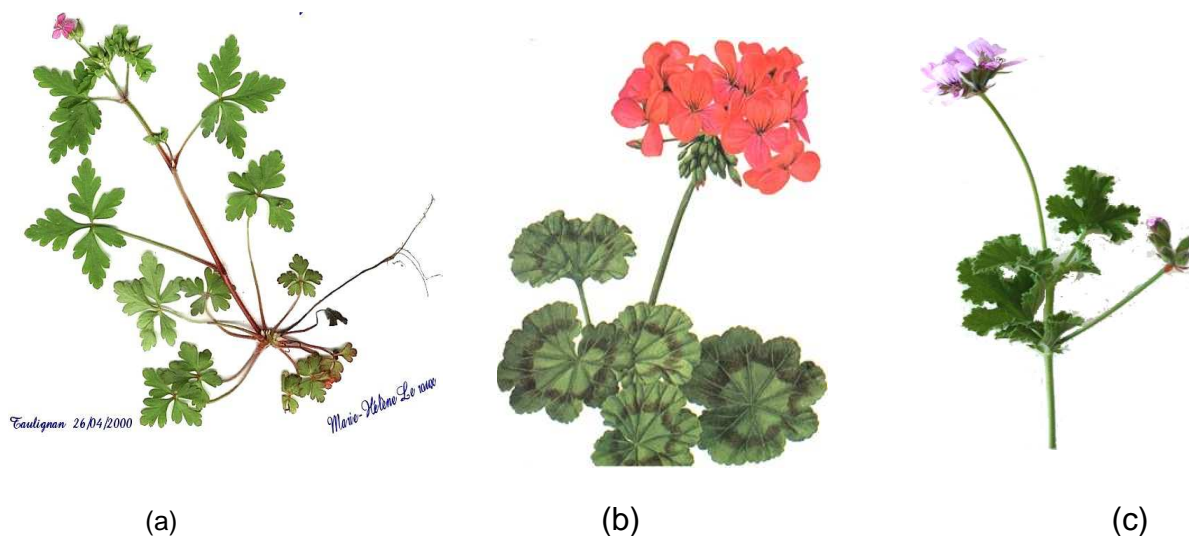


Figure 1.1: Géraniums des jardins. [49]

(a) herbe à Robert ; (b) géranium des fleuristes ; (c) géranium rosat

Sous le nom générique de « géranium rosat » on regroupe plusieurs espèces appartenant au genre *Pelargonium*. Les plus importantes sont le *Pelargonium graveolens*, *P. roseum*, *P. odoratissimum* et *P. capitatum*. [50]

L'appellation d'essence de géranium est une désignation erronée. En effet, les essences aromatiques obtenues ne dérivent point de « géranium » mais de plusieurs espèces variées qui sont des hybrides de la lignée « *Pelargonium* ». [51]

### 2.1.3. Description de la plante étudiée : *Pelargonium graveolens* L'Hérit.

#### 2.1.3.1. Données botaniques

Il s'agit d'une plante vivace à écorce brun clair, cultivée en annuelle ou en pérenne. Elle forme des buissons à port érigé pouvant atteindre 1m30 de hauteur (Fig.1.3 c). [52][53]

#### 2.1.3.2. Appareil végétatif

Les feuilles persistantes sont lobées (5 à 7 lobes) et opposées (Fig.1.3 b). Elles sont couvertes de poils glanduleux microscopiques qui libèrent un parfum au toucher ou sous l'effet de la chaleur. Les tiges sont vertes et tendres (Fig.1.3 a). Le système racinaire est pivotant. [52]

#### 2.1.3.3. Appareil reproducteur

Les fleurs sont groupées par paire. Elles sont de couleur rose et disposées en ombelles (Fig.1.2 d). Chaque fleur est constituée de :

- 5 sépales égaux présentant parfois une extrémité effilée, le mucron, (Fig.1.2 c)
- 5 pétales dont 2 différents, striés de rouge, (Fig.1.2.a)
- 7 étamines, groupées sur 2 verticilles, (Fig.1.2 f)
- 5 Carpelles réunis en une colonne centrale (Fig.1.2 e) surmontée d'un style commun. Ce dernier se divise en 5 stigmates. Chaque carpelle contient 2 ovules dont un seul donnera une graine. [2][52][54]

Selon DEMARNE et *al.*, [47], la position taxonomique du *P.graveolens* est mentionnée dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1: Position systématique du géranium rosat. [47]

Domaine	Eukaryota
Règne	Plantae (végétal)
Sous-règne	Tracheobionta (plantes vasculaires)
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotyledones
Sous-classe	Dialypétales
Ordre	Geraniales
Famille	Geraniaceae
Genre	Pelargonium
Espèce	<i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér. ex Aiton

#### 2.1.3.4. Synonymes et noms vernaculaires :

Diverses appellations sont attribuées au géranium rosat. Nous citerons quelques unes : [41][55]

En français : Géranium rosat, géranium odorant,

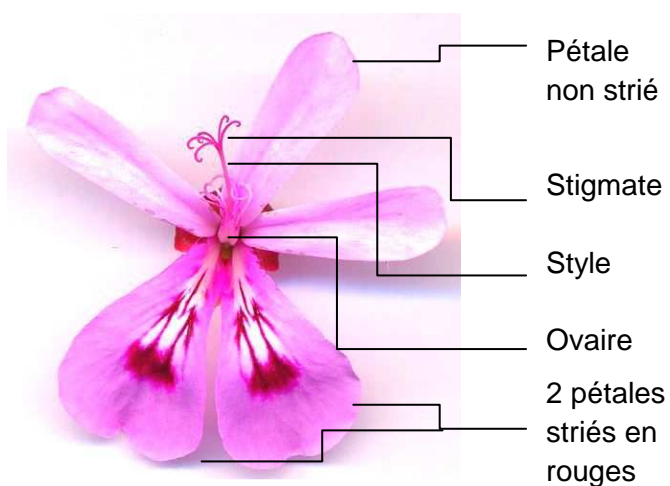
En anglais: Attar of rose, rose-scented geranium, scented pelargonium, rose geranium,

En espagnol : malva rosa, geranio de olor,

En chinois : xiang ye,

En arabe : Hachichet el itre, attercha, atre el ward, حشيشة العطر، عطر الورد، العطرشة

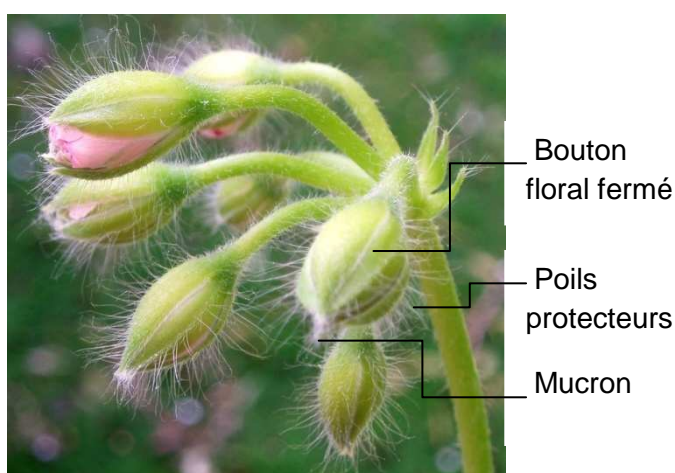




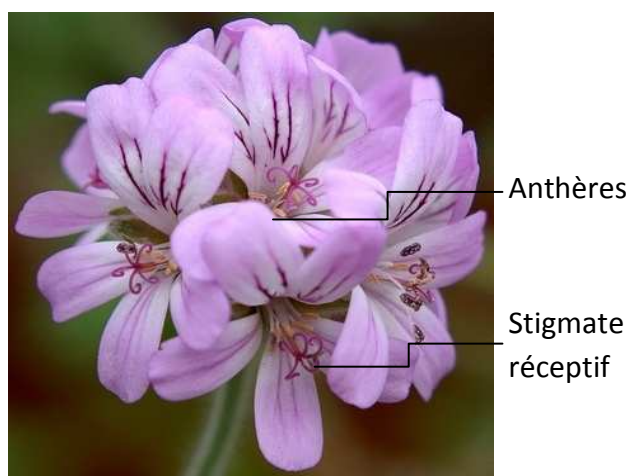
(a) Fleur isolée. [49]



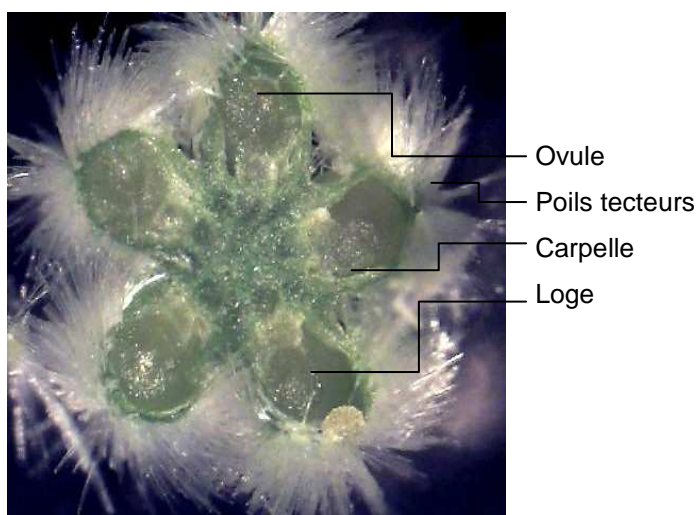
(b) Fruits murs avant la déhiscence. [49]



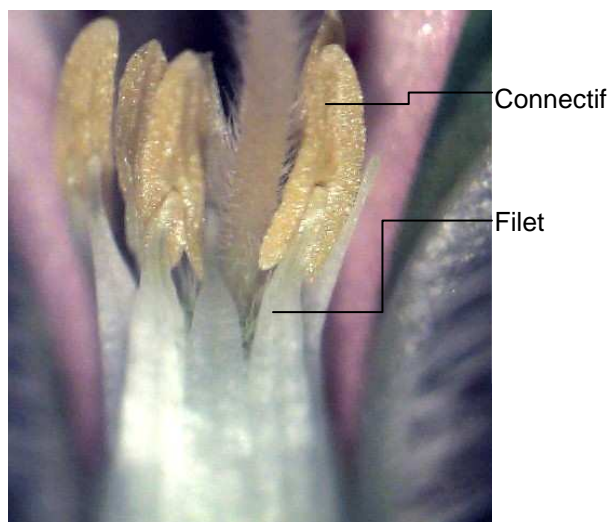
(c) Boutons floraux. [49]



(d) Inflorescence de type ombelle. [49]



(e) Coupe transversale de l'ovaire (Placentation axile) (Loupe x 4,5) (Original, 2009)

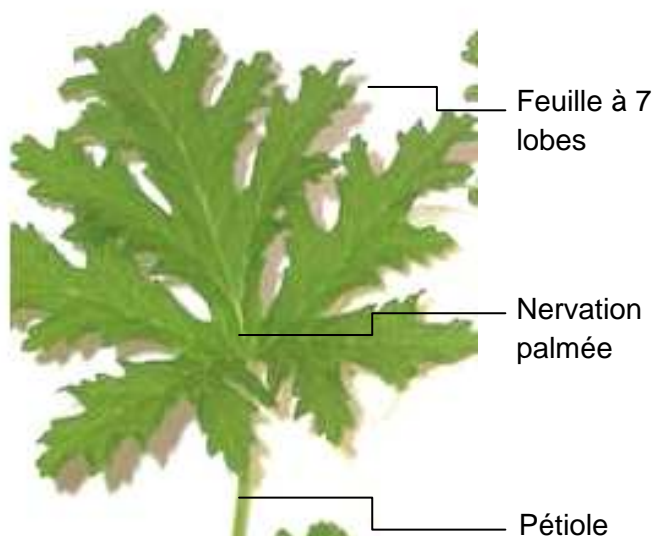


(f) Étamines (Loupe x 4,5) (Original, 2009)

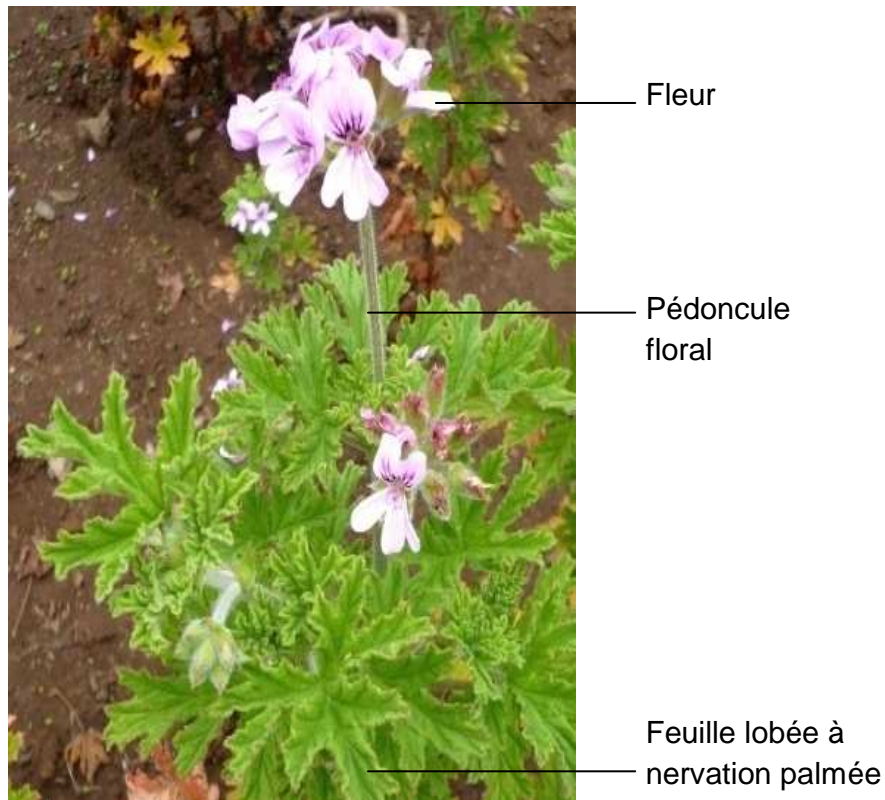
Figure 1.2 : Aspects morphologiques de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* (L.))  
- Appareil reproducteur -



(a) Partie aérienne de *P. graveolens*  
(Original, 2009)



(b) Feuille isolée. [49]



(c) Plante fleurie [49]

Figure 1.3 : Aspects morphologiques de géranium rosat (*Pelargonium graveolens* (L.))  
- Appareil végétatif -

## 2.2. Écophysiologie

Le géranium rosat supporte peu les températures inférieures à 3°C bien qu'il soit cultivé sur les hauteurs dans certaines régions (Réunion). [56]

Des précipitations de l'ordre de 1000 à 1500 mm d'eau par an sont recommandées. Exceptées les terres lourdes et asphyxiantes, cette plante à parfum s'adapte à tous les types de sols pourvus qu'ils soient friables, perméables et correctement drainés. [57][58][59][63]

## 2.3. Huile essentielle du géranium rosat :

L'HE est obtenue par hydrodistillation des parties herbacées fraîches ou légèrement fanées de *Pelargonium x asperum* et de certains hybrides cultivés. Ces derniers ont donné lieu à une formation d'écotypes selon les régions géographiques [9]. Les teneurs en HE sont très faibles, de l'ordre de 0,15 à 0,2 %. Cependant, ce taux diminue encore plus durant la saison des pluies. [9][62]

### 2.3.1. Composition chimique

Le profil chromatographique fait apparaître la présence de certains composants caractéristiques : Citronellol, Formate de citronellyle, Isomenthone, Géraniol, Linalool, Formate de géranyle, Oxyde de rose. [9][60]

L'HE de géranium se compose majoritairement de 2 alcools : le Géraniol et le Citronellol qui existent pour 2/3 à l'état libre et pour 1/3 à l'état combiné sous forme d'esters. [2][22][65]

### 2.3.2. Bienfaits de l'huile essentielle et de l'hydrolat

#### 2.3.2.1. Usages externes

L'HE du *P. graveolens* est antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire et tonique. C'est aussi un hémostatique remarquable. [2][22][61]

Grâce à son pouvoir cicatrisant, l'HE peut soulager et guérir un certain nombre d'affections (brûlures, coupures, eczéma, acné, plaies et piqûres d'insectes). [22]

En aromathérapie bucco-dentaire, l'HE est utilisée comme antihémorragique et entre dans la composition des bains de bouche pour ses propriétés analgésiques et antiseptiques. Ses indications sont multiples : gingivites, stomatites, aphtes, douleurs dentaires et suites d'extraction. [26][61][33]

En parfumerie, l'HE est très prisée et constitue une base de parfum pour des produits cosmétiques. Elle sert aussi à la formulation de bases florales ou d'arômes de fruits. [21][61][34]

D'odeur fraîche, subtile et fleurie, l'hydrolat de géranium rosat est communément employé dans les cosmétiques. Il est très parfumé et s'utilise en spray pour redonner de l'éclat à la peau. [43]

#### 2.3.2.2. Usages internes

Les usages internes de l'HE se limitent à une action Hépato-pancréato-stimulante et antidiabétique [8]. L'eau aromatique s'utilise comme un bon antiseptique particulièrement recommandée pour soigner les angines et les gorges irritées. [43]

### 3. Les émulsions

La vectorisation, ou délivrance des principes actifs (PA) vers un organe ou une cellule malade grâce à des transporteurs est un des défis majeurs de la recherche thérapeutique. De nombreux PA comme les huiles essentielles présentent des caractéristiques physico-chimiques peu favorables au passage des barrières biologiques. La distribution de ces PA vers les zones cibles malades peut donc être déficiente. [66]

Le développement de vecteurs des HE connaît un essor considérable depuis une vingtaine d'années. Ce chapitre fait un état de l'art sur les avancées dans ce domaine par la présentation d'une grande famille de vecteurs que sont les émulsions hydrophiles.

#### 3.1. Définition, structure et caractéristiques des émulsions

Ce sont des dispersions de 2 liquides non miscibles. Elles sont thermodynamiquement instables d'où un apport considérable d'énergie mécanique pour les obtenir. Elles sont constituées d'une phase dispersée ou discontinue et d'une phase dispersante ou continue. Cependant, la stabilité de ces préparations peut être améliorée par la présence de molécules amphiphiles (tensio-actifs), capables de former une mono ou une multicouche autour des gouttes de liquide dispersées. [66]

Selon la concentration des 3 composants (eau-huile-tensioactif(s)) et la méthode de préparation de l'émulsion (tailles des gouttelettes), les mélanges obtenus se présentent sous différents types [66] (Fig. 1.4) :

- émulsions simples hydrophiles-lipophiles (H/L) ou lipophiles-hydrophiles (L/H),
- émulsions multiples L/H/L ou H/L/H qui sont des dispersions d'émulsion,
- émulsions submicroniques dont la taille des particules est inférieure au 1 micromètre,
- nano émulsions dont la taille des particules ne dépasse pas quelques centaines de nanomètre.

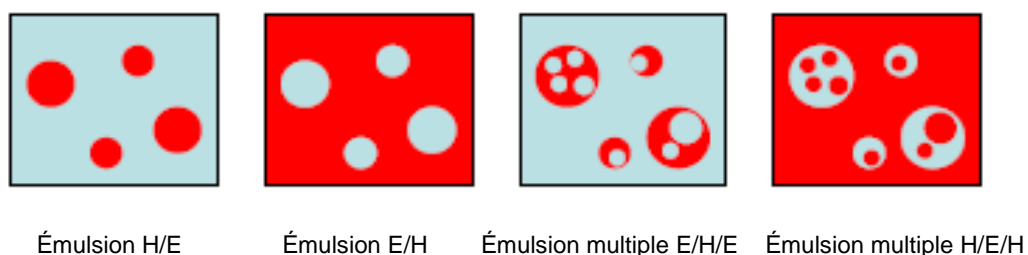


Figure 1.4: Représentation des différents types d'émulsion. [66]  
(En rouge : phase huileuse, en bleu : phase aqueuse)

### 3.2. Instabilité des émulsions

On recense quatre mécanismes de déstabilisation :

- La séparation : la phase dispersée se rassemble à la surface de la phase dispersante (crémage) ou au fond de celle-ci (sédimentation).
- La floculation : l'agrégation de la phase dispersée au sein de la phase dispersante.
- La coalescence : la fusion totale des agrégats.
- L'inversion des phases : qui peut être réalisée par agitation vigoureuse. [67]

Cette instabilité est liée à divers facteurs :

#### 3.2.1. Tension interfaciale

Elle tend à diminuer la surface de séparation et à rassembler les particules. C'est le phénomène de coalescence au cours duquel les particules dispersées grossissent pour aboutir à la séparation des phases.

### 3.2.2. Pesanteur

Elle tend à faire migrer les particules dispersées au sein de la phase dispersante en fonction de leur masse volumique ce qui aboutira au crémage ou à la sédimentation.

### 3.2.3. Potentiel électrocinétique = Potentiel Zéta

La valeur du potentiel Zéta doit être élevée pour maintenir les particules dispersées éloignées les unes des autres. Lorsque les charges des particules sont totalement neutralisées, elles se rejoignent et provoquent la floculation. [67]

### 3.3. La Balance Hydrophile Lipophile (HLB)

Pour préparer une émulsion, il faut tenir compte de sa nature et des substances qui la composent. L'échelle HLB classe différents surfactifs en fonction de l'importance de la partie hydrophile. Tous ceux dont le HLB est inférieur à 8, orientent l'émulsion dans le sens H/L. Ils sont donc plus lipophiles qu'hydrophiles. [66][68]

### 3.4. Bases théoriques de la formulation des émulsions

Les émulsions pharmaceutiques sont formées par 3 éléments de base :

- Phase lipophile qui sera choisie par rapport à différents critères qualitatif (viscosité et pénétration cutanée) et quantitatif (pourcentage des ingrédients).
- Phase hydrophile constituée principalement par de l'eau. La notion d'activité de l'eau est de plus en plus utilisée pour diminuer la quantité de conservateurs à ajouter.
- Émulsionnants qui sont extrêmement nombreux et conditionnent le sens de l'émulsion.

Dans l'ordre de fréquence d'utilisation, on trouvera en formulation les surfactants suivants :

- Les bases auto émulsionnables qui comportent une association de plusieurs surfactifs avec des épaississants. La simplicité de leur utilisation est un facteur de promotion,
- Les émulsionnants non ioniques sont longtemps utilisés en couple en associant un émulsionnant lipophile avec un hydrophile,

- Les émulsionnants gélifiants permettent de diminuer le taux des tensioactifs,
- Les émulsions ioniques contiennent le stéarate de triéthanolamine. La tendance actuelle consiste à réguler le pH à une valeur voisine de la neutralité. [3]

Seules les émulsions qui présentent une plage de stabilité pourront être, dans un 2<sup>ème</sup> temps, modifiées par l'ajout de divers additifs. Ces derniers apportent une amélioration au niveau de la viscosité, de la texture ou de l'aspect. [38]

Le tableau 1.2 illustre un exemple de formulation pour une émulsion L/H non ionique tiré du Formulaire Thérapeutique Magistral (FTM). [69]

Tableau 1.2 : Exemple d'une composition émulsionnée L/H non ionique. [69]

Émulsion L/H non ionique :	
	- Paraffine liquide : base de formulation
Phase huileuse	- Huile d'amande douce ( <i>Amygdalus communis</i> ) : surgraissant
	- Alcool de lanoline : surgraissant
	- Stéarate de sorbitane (Span 60): émulsionnant non ionique lipophile
	- Aqua : base de formulation
Phase aqueuse	- Glycérol : humectant, hydratant hygroscopique
	- Polysorbate 60 (Tween 60) : émulsionnant non ionique hydrophile
	- Gomme Xanthane : gélifiant hydrophile
	- Conservateur

### 3.5. Essais des émulsions

#### 3.5.1. Contrôle des caractères organoleptiques

L'examen macroscopique concerne l'aspect avec recherche d'une opacité ou d'une couleur éventuelle. Le contrôle de l'odeur peut également s'avérer nécessaire. [70]

#### 3.5.2. Contrôle de l'homogénéité

Il peut se faire par examen au microscope. Ce contrôle permet de mesurer, à l'aide d'une échelle micrométrique, le diamètre des globules huileux. [70]

### 3.5.3. Détermination du type de l'émulsion

Elle se fait par mesure de la conductivité électrique qui correspond à celle de la phase continue. Les émulsions L/H sont conductrices à l'électricité. [70]

### 3.5.4. Mesure de la viscosité ou étude rhéologique

La semi solidité d'un produit se définit par la mesure de la consistance. Quand la phase continue est en excès, la viscosité de l'émulsion se rapproche de la viscosité de cette phase. Pour en modifier la viscosité, on peut agir sur la proportion de la phase interne ou de la phase continue ou encore sur le HLB de l'émulsifiant.

Les appareils utilisés pour ce contrôle sont les viscosimètres à écoulement par un capillaire et à mobile tournant. [70]

### 3.5.5. Stabilité

Elle est appréciée dans une éprouvette graduée par l'observation des phénomènes d'instabilité (sédimentation, crémage, coalescence et séparation des phases). [70]

### 3.5.6. Détermination du pH

Cette valeur est importante car elle peut avoir une influence sur la stabilité de l'émulsion, sur l'activité des conservateurs et surtout sur le pH de la peau. [70]

### 3.5.7. Stérilité

Il y a intérêt que les préparations émulsionnées, appliquées sur les plaies ouvertes ou sur une peau gravement atteinte, soient stériles. [70]

## 3.6. Préparations semi solides pour application cutanée : Les crèmes

Ces préparations présentent un aspect homogène. Elles sont constituées d'un excipient dans lequel sont habituellement dissous ou dispersés une ou plusieurs substances actives. [71]



Dans ces préparations, plusieurs catégories peuvent être distinguées parmi lesquelles les crèmes. Celles-ci présentent un comportement viscoélastique et les propriétés des fluides non newtoniens. [71]

### 3.6.1. Définition et composition des crèmes dermiques

Ce sont des préparations multiphasées (lipophile et aqueuse). On en distingue 2 types :

Les crèmes hydrophiles : la phase externe est la phase aqueuse. Ces préparations contiennent des agents émulsifiants "H/E" tels que des savons de sodium ou de trolamine, des alcools gras, des polysorbates et des esters d'acides.

Les crèmes hydrophobes : la phase externe est la phase lipophile. Ces préparations contiennent des agents émulsifiants E/H tels que la graisse de laine, des esters de sorbitanes et des monoglycérides. [72]

De nombreux ingrédients sont utilisés pour la formulation des crèmes dermiques. Le tableau 1.3 en résume les principaux.

Tableau 1.3 : Principaux ingrédients entrant dans la formulation des crèmes dermiques. [72]

Composants de la phase hydrophile ou aqueuse
Eau purifiée, eaux aromatiques, alcool éthylique, solutions alcooliques, glycérine, propylène glycol, polyéthylènes glycols, tous PA hydrosolubles et thermostables.
Composants de la phase lipophile ou huileuse
Hydrocarbures minéraux (vaseline, huile de vaseline), hydrocarbures animaux (squalène et dérivés), cires (lanoline, cire palmitate de cétyle), corps gras d'origine animale (huile de vison), corps gras d'origine végétale (huile d'amande douce, de ricin, de germe de blé), alcools et acides gras, tous PA liposolubles et thermostables.

### 3.6.2. Préparation des crèmes dermiques

A condition de respecter les bonnes pratiques de fabrication (BPF), les différentes étapes pour la préparation officinale des crèmes sont ci-dessous énumérées :

- dissoudre les PA thermostables dans la phase appropriée (eau ou huile),
- ajouter les solides finement râpés (cire, stéarate de glycol),
- faire chauffer (toujours au bain-Marie) le mélange jusqu'à fusion totale des solides,
- refroidir le tout sans cesser de mélanger pour une parfaite homogénéité,
- ajouter en dernier les HE et PA thermosensibles dans l'excipient à une température de 30°C.

## CHAPITRE 2

### MATERIEL ET METHODES

#### 2.1. Matériel

La zone d'étude de notre travail se situe dans une parcelle sise à Chiffa (w. Blida) où se trouve une culture de géranium rosat. Elle s'étale sur une superficie de 1500 m<sup>2</sup> et appartient au domaine privé "producteur distillateur" (Extral bio).

Ces géraniums, dont le nombre avoisine les 600 plants, ont été bouturés en octobre 2004. Les écartements sont aléatoires. Les données pédoclimatiques du champ de culture ont été recueillies auprès de l'Institut National des Ressources Hydrauliques (INRH) de Soumâa (w. de Blida).

##### 2.1.1. Matériel biologique

###### 2.1.1.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur une plante à parfum très répandue en Algérie, le *Pelargonium graveolens* L., communément appelée géranium rosat.

Les feuilles, les fleurs et les tiges sont récoltées en début de matinée au mois de mai 2008 (début de floraison des plantes).

L'identité, la nomenclature et la systématique de la plante ont été confirmées au niveau du Jardin d'Essais d'El Hama (Alger) en comparaison avec les spécimens de l'herbier.

###### 2.1.1.2. Matériel animal

Les différentes analyses pharmaco-toxicologiques ont été effectuées sur des lapins et des souris Albinos provenant de l'animalerie du complexe Antibiotical de SAIDAL (Médéa).

## 2.2. Méthodes

Nos essais expérimentaux se sont étalés sur une durée d'un an (mai 2008 à mai 2009). Ils ont été réalisés au niveau des structures suivantes :

- Unité de recherche en biotechnologies végétales du département de biologie et laboratoire de rhéologie du département de chimie industrielle, université "Saad DAHLEB" de Blida,
- unités des contrôles microbiologique et toxicologique du complexe Antibiotical SAIDAL de Médéa,
- laboratoire de géochimie du CRD « Sonatrach » de Boumerdes.

### 2.2.1. Extraction des huiles essentielles de géranium rosat

#### 2.2.1.1. Protocole d'extraction : Hydrodistillation

Pour extraire les huiles essentielles de la plante, nous avons opté pour l'hydrodistillation. C'est la méthode préconisée par la Pharmacopée Européenne. [71]

#### 2.2.1.2. Extraction des huiles essentielles

L'hydrodistillation du géranium rosat (partie aérienne fraîche) est réalisée à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (1928) [73]. Le montage utilisé est présenté dans la figure 2.1.

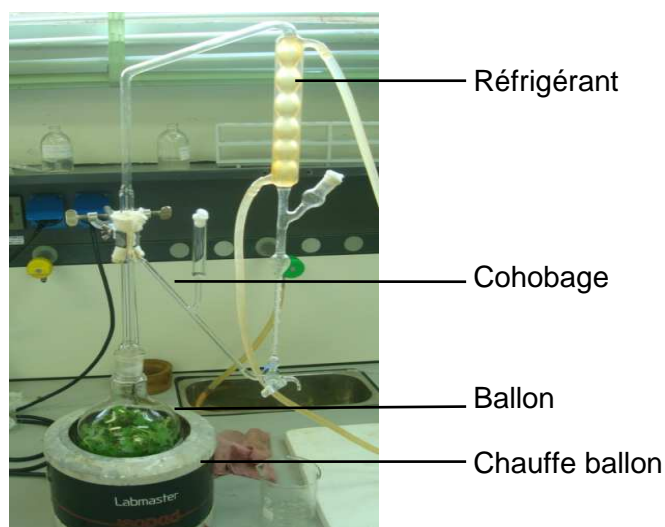


Figure 2.1: Hydrodistillation du géranium rosat :  
- Montage d'hydrodistillation (dispositif Clevenger) – (Original, 2009)

La procédure d'extraction se résume à porter à ébullition une quantité de 100 g de matériel végétal frais pendant 2 h avec 700 ml d'eau distillée dans un ballon de 1 litre (Figure 2.1). La distillation a été effectuée avec un recyclage communément appelé cohobage tel que décrit dans la Ph.Eur. [71]

#### 2.2.1.3. Isolation des huiles essentielles

La vapeur condensée obtenue conduit à deux phases :

- Une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau par simple décantation. La quantité d'HE obtenue est pesée pour le calcul du rendement.
- Une phase aqueuse (eau aromatique ou hydrolat) qui contient une quantité non négligeable d'essence sous forme solubilisée. La récupération de cette huile est réalisée par extraction liquide-liquide avec un solvant organique (éther diéthylique). L'utilisation d'un évaporateur rotatif permet d'éliminer l'éther et d'obtenir ainsi l'HE dissoute dans l'hydrolat.

#### 2.2.1.4. Calcul du rendement en huile essentielle

Le rendement en HE a été déterminé par rapport à la matière végétale fraîche [19]. Les rendements d'extraction des HE de la phase organique (HE a), de la phase aqueuse (HE b) et du total (RT) sont définis comme suit :

$$\text{RHE a} = \frac{\text{Masse HE phase organique}}{\text{Masse matière végétale fraîche}}$$

#### 2.2.1.5. Coupes histologiques

Pour localiser éventuellement les sites sécréteurs des essences aromatiques, des coupes histologiques au niveau des feuilles et des tiges ont été réalisées. La technique de la double coloration (vert de méthyle-rouge Congo) [74] a permis de reconnaître l'ensemble des tissus observés.

### 2.2.1.6. Étude de la cinétique d'extraction

La cinétique a été explorée en effectuant des prélèvements horaires à intervalles réguliers sur les phases aqueuses et organiques durant l'hydrodistillation.

### 2.2.2. Étude analytique de l'huile essentielle

#### 2.2.2.1. Propriétés organoleptiques de l'huile essentielle et de l'hydrolat

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur, odeur) de l'huile essentielle (HE) et de l'eau aromatique (HA) ont été notées.

#### 2.2.2.2. Mesure des indices chimiques

##### 2.2.2.2.1. Détermination de l'indice d'acide (I.A) (NF ISO 1242 :1999 (T 75-103)) [19]

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1g d'HE.

Mode opératoire et calcul

Après la pesée d'une quantité de 2 g d'HE et son introduction dans le ballon, nous lui additionnons 5 ml d'éthanol (EtOH) (95°) neutralisé et 5 gouttes d'indicateur (rouge de phénol). La titration de ce liquide se fera avec une solution de KOH de 0,02 mol/l (1,12 g/l) jusqu'à l'obtention d'un virage de coloration. Le volume de la solution KOH utilisé est noté. Le contenu du ballon sera mis en réserve pour les analyses ultérieures (indice d'ester). L'IA est donné par l'équation suivante :

$$IA = \frac{V \times C \times 56,11}{m}$$

où : V : volume (ml) de KOH utilisé pour le titrage

C : concentration (moles/l) de KOH

m : masse (g) de la prise d'essai

#### 2.2.2.2.2. Détermination de l'indice d'ester (I.E) (AFNOR NF T 75-104 : 1994) [19]

C'est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans 1 g d'HE.

Mode opératoire et calcul :

Cette détermination est effectuée sur la solution provenant de la détermination de l'indice d'acide. Une quantité de 25 ml de solution KOH (0,5 mol/l) est ajoutée dans le ballon. Un réfrigérant à reflux est adapté au ballon qui sera placé sur le manteau.

Après 1 heure de chauffage, le ballon est laissé à refroidir. Nous ajoutons 20 ml d'eau puis 5 gouttes de solution de rouge de phénol. La titration de l'excès de KOH est effectuée avec une solution d'acide chlorhydrique (0,5 mol/l).

En parallèle, nous effectuons un essai à blanc (eau distillée au lieu de l'HE) dans les mêmes conditions. Nous prenons soin d'ajouter 5 ml d'éthanol neutralisé avant d'ajouter les 25 ml de solution KOH. L'indice d'ester est calculé par l'équation suivante :

$$IE = 28,05 (V_0 - V_1)$$

où :  $V_0$  : volume (ml) de solution d'HCl (essai à blanc).

$V_1$  : volume (ml) de solution d'HCl (détermination de l'IE).

#### 2.2.2.2.3. Mesure de la miscibilité à l'éthanol (NF T 75-101 : 1999) [19]

La miscibilité des HE a été déterminée dans de l'éthanol à 70°.

#### 2.2.2.2.4. Mesure du potentiel d'Hydrogène (pH)

Cette mesure est effectuée à l'aide d'un pH-mètre équipé d'une électrode. [66]

#### 2.2.2.3. Mesure des grandeurs physiques

##### 2.2.2.3.1. Détermination de la densité relative à 20°C ( $d^{20}$ )

C'est le rapport de la masse d'un volume d'HE à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C.

### Mode opératoire et calcul

Par manque d'une quantité suffisante d'HE, nous étions dans l'obligation de procéder par une méthode non homologuée. Elle consiste à prélever à l'aide d'une micropipette un volume de 1 ml d'HE et de le peser avec une balance analytique de précision en prenant en considération le coefficient de correction de température :

$$d^{20} = (m \text{ HE} / m \text{ H}_2\text{O}) + (0,00073 \times (T^{\text{échant}} - 20))$$

où m : masse en gramme.

T : température en °C.

### 2.2.2.3.2. Détermination de l'indice de réfraction (I.R) (ISO 280 : 1999 (75-112)) [19]

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE.

#### Mode opératoire et calcul :

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1,333 à une température de 20°C. Après ouverture du prisme secondaire, nous déposons 2 gouttes d'HE sur la partie centrale du prisme principal. Enfin, nous fermons délicatement le prisme secondaire. La lecture de la mesure s'effectue à une température stable.

L'indice de réfraction IR, à la température de référence t, est donné par l'équation suivante :

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

où nt' : valeur de lecture obtenue à la température t'.

T' : température en °C de l'échantillon.



### 2.2.3. Analyses chromatographiques de la fraction aromatique (HE et HA)

#### 2.2.3.1. Principe de la Chromatographie phase gazeuse- Spectrométrie de masse

En soumettant une HE à la CG-SM, nous déclenchons un processus à plusieurs étapes :

- ionisation des molécules qui se volatilisent sous l'effet de la haute température,
- accélération des ions formés qui se dirigent vers le dispositif de séparation,
- traitement du signal de sortie de l'appareil ce qui conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports  $m/z$ .

La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs « banques de données » de référence permet son identification. [75]

#### 2.2.3.2. Elaboration des profils chromatographiques (NF ISO 11024-1 : 1999) [19]

##### 2.2.3.2.1. Préparation des échantillons pour essai

Une quantité de 1 $\mu$ l d'HE diluée dans le dichlorométhane est prélevée et injectée dans l'appareillage pour déclencher les procédures d'analyse.

##### 2.2.3.2.2. Conditions opératoires de la CG-SM

Les analyses chromatographiques des HE et HA ont été effectuées sur un CPG type Hewlett Packard (6890) couplé avec un SM (HP 5973).

La fragmentation est effectuée par impact électronique à 70 eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0,25 mm). La température de la colonne est programmée de 50 à 250 °C à raison de 4 °C.min<sup>-1</sup>. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse *NIST 98* et piloté par un logiciel « *HP ChemStation* ». Ceci permettra l'identification des constituants aromatiques de l'HE et de l'HA.

## 2.2.4. Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'hydrolat

### 2.2.4.1. Souches microbiennes étudiées

Sept bactéries (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*) et une levure (*Candida albicans*) ont été choisies pour leurs fréquences élevées dans les contaminations humaines.

Les souches bactériennes sont des lots de l'ATCC (American Type Culture Collection).

### 2.2.4.2. Milieux de culture et Produits actifs

Nous avons utilisé la gélose aux peptones de caséine et de soja (TSA) et la gélose Sabouraud au chloramphénicol.

Lors de nos essais, nous avons testé aussi bien l'activité antimicrobienne de l'HE que celle de l'HA du géranium rosat.

### 2.2.4.3. Protocoles d'étude

#### 2.2.4.3.1. Technique en milieu solide : Méthode des aromatoigrammes

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme [76][77]. Elle a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des produits à tester et de s'appliquer à un grand nombre d'espèces bactériennes. [28][30]

Dans cette méthode, nous utilisons des disques de papier filtre de 9 mm de diamètre, imprégnés de 20 µl d'HE ou d'HA. Nous déposons ces disques à la surface d'un milieu géloséensemencé en surface à l'aide d'une suspension bactérienne. L'incubation est faite dans une étuve à 35°C pendant 24 h pour les bactéries et à 25°C pendant 5 jours pour les levures. (Figure 2.2)

L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et exprimé en millimètre.

### 2.2.4.3.2. Micro atmosphère ou méthode en phase vapeur

La différence entre cette méthode et les aromagrammes réside dans la position du disque imprégné. Cette technique permet de mettre en évidence la diffusion des composés volatils des HE à l'intérieur d'une boîte de Pétri. [28][30]

Le disque imprégné est déposé au centre du couvercle de la boîte de Pétri qui est renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. (Figure 2.3.)

La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve. L'incubation est réalisée dans les mêmes conditions qu'en aromagramme. L'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose.

La boîte de contrôle présente un disque non imbibé par l'HE. Une autre boîte témoin, sans disque, est ensemencée dans les conditions de l'expérience. Elle nous renseigne sur l'homogénéité du tapis bactérien.

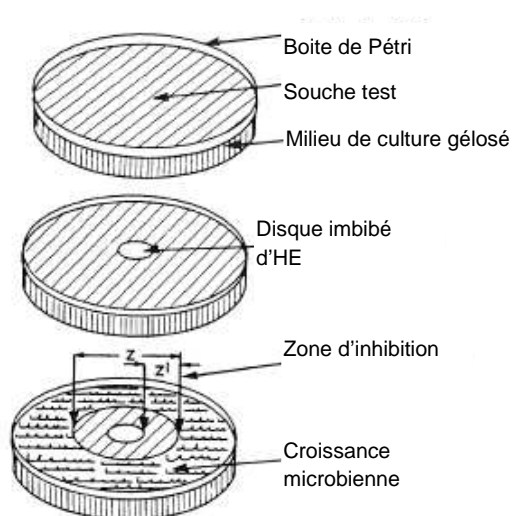


Figure 2.2 : Illustration de la méthode des aromagrammes sur boîte de Pétri. [28]

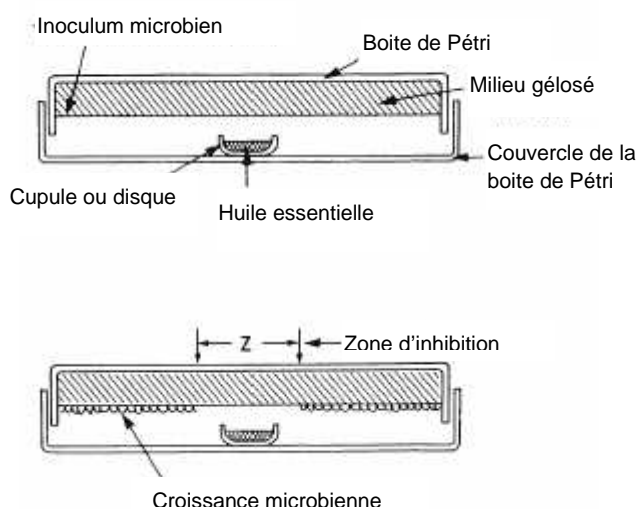


Figure 2.3 : Illustration de la méthode des microatmosphères. [28]

### 2.2.4.3.3. Expression des résultats

La mesure du diamètre des halos d'inhibition est souvent transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (tableau 2.1). [78]

Tableau 2.1: Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés. [78]

Diamètres de la zone d'inhibition	Transcription	Sensibilité du germe
0	0	Résistant
0,5 cm	±	Peu sensible
1 cm	+	Sensible
2 à 3 cm	++	ssezA sensible
> 3 cm	+++	Très sensible

### 2.2.5. Préparation d'une émulsion à usage topique (Crème dermique hydrophile)

L'objectif assigné à cette étude est la mise au point d'une formule galénique topique adaptée à l'extrait aromatique de géranium rosat.

#### 2.2.5.1. Étude d'orientation

La forme pharmaceutique choisie est celle d'une émulsion hydrophile largement utilisée pour le traitement local des pathologies cutanées.

#### 2.2.5.2. Formulation de la crème dermique

##### 2.2.5.2.1. Choix de l'ingrédient pharmaceutique actif ou principe actif (PA)

Le PA est représenté par la fraction aromatique de géranium rosat (HE-HA). Cette fraction trouve une utilisation comme régénérant cellulaire (cicatrisant et hémostatique), topique dans le traitement des mycoses superficielles (dermatophytes) et appréciée pour ses propriétés thérapeutiques. [22][25][32]

##### 2.2.5.2.2. Choix du type de l'émulsion

Notre formule d'émulsion est de type L/H. Ce choix a été orienté par la meilleure disponibilité des PA qu'offre cette forme (contact direct avec la peau).

##### 2.2.5.2.3. Choix des excipients

Notre choix pour l'excipient a été motivé par des critères standardisés (nature physico-chimique des PA à véhiculer, bonne tolérance cutanée). Les ingrédients utilisés lors des formulations des crèmes sont consignés dans le tableau 2.2.

Nom	Synonymes / Dénomination INCI	Caractères	Point de fusion	Usages	Concentration moyenne
Ingrédients de la phase lipophile					
Huile de vaseline	Huile de paraffine, Pétroleine, <i>Paraffinum liquidum.</i>	Liquide huileux, incolore, transparent et ne présentant pas de fluorescence.		Utilisé dans les cérats et pommades pour le traitement des brûlures.	10-20%
Acide stéarique	Stéarine, stearic acid	Paillettes blanches, onctueuses au toucher, à faible odeur de sui.	70°C	Émulsifiant L/H avec un alcalin. Excellent facteur de consistance : apporte douceur et onctuosité.	5-15%
Alcool cétylique	Ethal, alcool palmitique, alcool hétérocyclique, hétérocyclanol, Lanette 16, cetylic alcohol	Paillettes blanches, cireuses, onctueuses au toucher	55°C	Gélifiant non émulsif, non ionique, opacifiant, hydrophobe. Facteur de consistance dans les crèmes.	2 à 10%
Alcool cétostéarylique	Emulgine 1000, Emulgine, Emulgade, Emulgine B2	Écailles blanches et inodores. Mélange d'alcools solides contenant 80% d'alcool stéarylique + 20% d'alcool cétylique.	55°C	Agent épaississant augmentant la consistance d'une émulsion. C'est un émulsifiant hydrodispersible.	2 à 10%
Cire blanche	<i>Cera alba</i>	Morceaux blancs, translucides en sections minces.	65°C	Utilisée comme agent de consistance dans les pommades et cérats en donnant une texture onctueuse.	1-10% dans les crèmes.
Ingrédients de la phase hydrophile					
Glycérine	Glycerin, Glycérol, Propane-triol	Liquide sirupeux, onctueux, incolore, limpide et très hygroscopique, miscible à l'eau et à l'alcool.		Utilisé comme additif pour prolonger le pouvoir hydratant d'une crème. C'est un excellent adoucissant.	3-6%
Triéthanolamine	Trolamine	Liquide transparent et incolore ou jaune, pâle, visqueux, hygroscopique à odeur légèrement aminé.	21°C	Compensateur de pH. Légèrement alcalin, il donne des savons très stables avec l'acide stéarique.	Qsp en fonction du pH.

Tableau 2.2 : Excipients de la crème dermique à base d'essence de géranium rosat. [3][69][79]

### 2.2.5.3. Préparation officinale et conditionnement de la crème dermique

La formule de base sur laquelle nous avons travaillé est inspirée du formulaire thérapeutique magistrale [69] (tableau 2.3).

Tableau 2.3 : Composition de la crème dermique.

Dénomination INCI	Concentration (%)
<b>Phase Huileuse (30%)</b>	
- Paraffinum liquidum	10-15
- Cera alba	3-5
- Stearic acid	3-4
- Cetyl alcohol	3-4
- Ceto stearyl alcohol	1-2
- Geranium essential oil	0,3
<b>Phase Aqueuse (70%)</b>	
- Geranium hydrosol	65
- Glycerin	4-5
- Trolamine	0,3-2 (qsp pH 7)

Le protocole de fabrication est celui d'une émulsion classique selon le mode opératoire suivant :

- Préparation de la phase huileuse : déposer dans un béccher la quantité appropriée d'huile de vaseline, d'acide stéarique, de cire blanche et des tensioactifs (alcool cétylique et alcool cétostéarylique).
- Préparation de la phase aqueuse : mélanger l'HA avec la glycérine et le TEA.
- Nous portons les 2 bécchers au bain-marie à 70°C jusqu'à fusion complète des composés. Ces derniers sont mélangés sous une agitation manuelle rapide.
- La phase aqueuse sera versée dans la phase grasse par petites fractions en mélangeant entre chaque adjonction jusqu'au refroidissement.
- A température ambiante (25-30°C), nous ajoutons l' HE de géranium rosat avec un compte goutte sous une homogénéisation continue.

Nous avons opté pour un conservateur dérivé d'isothiazoline, le Kathon CG® à 0,005%. Ce choix a été motivé par des critères législatif, physico-chimique (aucune interférence avec le PA), microbiologique (spectre d'activité et pH) et toxicologique (tolérance cutanée). [3]

Le conditionnement se fait en pot. Les ingrédients utilisés sont mentionnés selon la nomenclature INCI par ordre de concentration décroissante : *Geranium hydrosol*, *Paraffinum liquidum*, *Acid stearic*, *Cera alba*, *Cetyl alcohol*, *Cetostearyllic alcohol*, *trolamine*, *geranium oil*, *izothiazoline*.

#### 2.2.6. Contrôles physico-chimiques des crèmes dermiques

Une grande diversité de contrôles a été nécessaire pour définir les caractéristiques des préparations topiques obtenues selon des méthodes homologuées. [66][70][72]

##### 2.2.6.1. Contrôle des caractères organoleptiques

Les propriétés organoleptiques regroupent tout ce qui est perceptible par les sens : aspect, couleur, odeur et toucher. L'examen macroscopique concerne également la recherche d'une opacité ou d'une texture particulière.

##### 2.2.6.2. Contrôle de l'homogénéité

Une certaine quantité de crème est étalée sur une lame puis recouverte d'une lamelle pour une observation microscopique. Ce test permet d'apprécier l'homogénéité de l'émulsion.

##### 2.2.6.3. Évaluation de la stabilité et vieillissement accéléré

Les principaux phénomènes d'instabilité sont appréciés dans une éprouvette graduée par l'observation à intervalles de temps réguliers. La coalescence des gouttes ou le déphasage ont été recherchés par centrifugation à vitesse constante (4500 tr/mn pendant 30 mn).

##### 2.2.6.4. Détermination du pH

Cette mesure est effectuée à l'aide d'un pH-mètre équipé d'une électrode après dilution à 1/10 de la crème dans de l'eau distillée.

## 2.2.7. Caractérisation rhéologique des crèmes dermiques

### 2.2.7.1. Caractéristiques techniques du rhéomètre

L'étude rhéologique des produits finis a été caractérisée à l'aide d'un rhéomètre rotatif de couette « Physica Rheolab MC1 » piloté par un logiciel « *Rheolve US200* ».

### 2.2.7.2. Mode de mesure employé

Avant de procéder aux différents tests, nous prélevons 20 g de notre échantillon que nous l'introduisons délicatement dans l'entrefer du système de mesure (Z3).

### 2.2.7.3. Présentation des protocoles de mesure utilisés

#### 2.2.7.3.1. Test de contrainte seuil

L'objectif du test est de déterminer la contrainte seuil correspondant à la fin du régime élastique et le début du régime non linéaire (augmentation de l'écoulement).

La méthode consiste à faire varier la contrainte de 0,05-40 Pa dans un temps de 3 mn et d'enregistrer la déformation résultante.

#### 2.2.7.3.2. Étude de la thixotropie

Cette étude vise à vérifier la thixotropie de la crème en présence d'une cinétique de déstructuration du système sous l'effet de plusieurs sollicitations constantes.

La méthode se résume à imposer plusieurs paliers à vitesse de déformation constante tout en mesurant l'évolution de la viscosité en fonction du temps.

#### 2.2.7.3.3. Test d'écoulement à l'équilibre

L'objectif assigné est de caractériser le comportement rhéologique de la crème qui est en écoulement variable afin de déterminer le modèle rhéologique auquel elle obéit.

La procédure se résume à faire varier la vitesse de 1 à 1000 s<sup>-1</sup>. Le rhéogramme obtenu donne la variation de la viscosité en fonction de la vitesse de déformation.



## 2.2.8. Contrôle de la qualité microbienne des crèmes dermiques

### 2.2.8.1. Objectif

L'objectif de ce contrôle est d'apporter les moyens de vérifier que les crèmes dermiques répondent aux exigences microbiologiques spécifiées dans les monographies de la Ph.Eur. (Figure 2.4)

Les analyses à effectuer se résument en la recherche et le dénombrement des germes aérobies viables totaux et la recherche des germes spécifiés. [71]

### 2.2.8.2. Dénombrement des germes viables totaux (mésophiles et champignons)

#### 2.2.8.2.1. Conditions et principe de l'essai

L'essai a été effectué dans des conditions d'asepsie en un endroit exempt de contamination (lampe UV). Les manipulations ont été accomplies sous une hotte à flux laminaire.

L'analyse des émulsions s'articule en 2 étapes. La première consiste en un échantillonnage et une hydratation de la crème. La 2<sup>ème</sup> étape est l'analyse a proprement parlé qui permet une évaluation de la population microbienne présente dans l'échantillon.

#### 2.2.8.2.2. Préparation des échantillons

La préparation des dilutions (1/10) s'effectue par dissolution de 10 g de l'échantillon à analyser dans 90 ml de la solution tampon peptonée au chlorure de sodium pH 7,0.

#### 2.2.8.2.3. Appareillage de filtration sur membrane

L'appareillage comporte un réservoir fermé et un réceptacle séparés l'un de l'autre par une membrane de porosité de 0,45 µm.

#### 2.2.8.2.4. Examen des échantillons

Après introduction d'une quantité appropriée de la solution mère (10ml) dans 2 filtres à membrane et sa filtration, nous déposerons une membrane sur gélose à

l'hydrolysate de caséine et de soja (TSA). Cette boîte de Pétri sera incubée à 35°C pendant 5 jours pour le dénombrement des mésophiles. L'autre membrane sera mise sur gélose Sabouraud. Elle sera incubée à 25°C pendant 5 jours pour la recherche des champignons.

Le nombre de germes viables totaux correspond à la somme du nombre de bactéries et du nombre de moisissures et levures ainsi définis.

### 2.2.8.3. Recherche des germes spécifiés

#### 2.2.8.3.1. Recherche des entérobactéries et autres bactéries gram négatives

L'échantillon de crème à analyser est dilué à 1/10 dans un milieu nutritif (Bouillon lactosé) qui sera incubé à 35°C pendant 2 heures. Après agitation, nous prélevons 1 ml du milieu et l'inoculons à 10 ml de milieu d'enrichissement MOSSEL. Après une incubation à 35°C pendant 18 à 48 h, des subcultures seront faites sur le milieu d'isolement VRBG. Ce dernier est incubé à 35°C pendant 24 h.

#### 2.2.8.3.2. Recherche d'*Escherichia coli*

La solution mère est préparée en diluant 10 g de crème dans 90 ml de milieu liquide aux peptones de caséine et de soja (Bouillon soja). Après une incubation à 35°C pendant 24 h, une quantité de 1 ml est ensemencée dans 100 ml de milieu liquide de bouillon soja (BS). L'incubation sera faite à 43°C pendant 24 h. Dépasser ce délai, des subcultures seront faites sur milieu gélosé d'EMB qui sera incubé à 35°C pendant 24 à 72 h. La présence de colonies rouges indique une présomption d'*E. coli*.

#### 2.2.8.3.3. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*

A partir du bouillon soja ensemencé préalablement, nous procédons à des subcultures sur milieu cétrimide. Ce milieu sélectif sera incubé à 35°C pendant 72 h.

#### 2.2.8.3.4. Recherche de *Staphylococcus aureus*

L'étape d'enrichissement avec le bouillon trypto-caséine-soja se fait de la même manière que précédemment. Les subcultures seront faites sur milieu sélectif (Chapman) à une température d'incubation de 35°C/24 h. La présence de colonies pigmentées en jaune et le changement de couleur de la gélose indiquent une présomption de *S. aureus*.

#### 2.2.8.4. Résultats

Les résultats sont exprimés en colonie formant unité (UFC). Selon les normes spécifiées par les monographies de la Ph.Eur, l'expression des résultats sera la suivante :

Nombre de UFC/gr observé  $\leq$  niveau cible: produit conforme

Nombre de UFC/gr observé  $>$  niveau d'alerte: produit non conforme

#### 2.2.9. Contrôle de la qualité microbienne de l'hydrolat du géranium rosat

##### 2.2.9.1. Objectif

L'analyse a pour but le dénombrement de la flore microbienne aéro-mésophile.

##### 2.2.9.2. Prélèvements

Des échantillons d'eau aromatique (HA) ont pu être collectés de l'appareil (Clevenger) dans des récipients stériles.

##### 2.2.9.3. Appareillage et méthodes d'analyse

Nous transvasons dans l'appareil de filtration une quantité de 100 ml d'HA. La filtration s'effectue immédiatement et la membrane sera transférée dans le milieu de culture (TSA). Pour la détection des champignons, nous procédons de la même façon en utilisant cette fois-ci la gélose Sabouraud. L'incubation se fait à 35°C pendant 5 jours pour l'essai destiné à la recherche des bactéries et à 25°C pour la recherche des champignons.

##### 2.2.9.4. Normes

D'après la méthode 2.6.12 de la Ph.Eur [71], la valeur limite pour l'eau purifiée est de 100 UFC/ml pour les germes mésophiles aérobies viables.

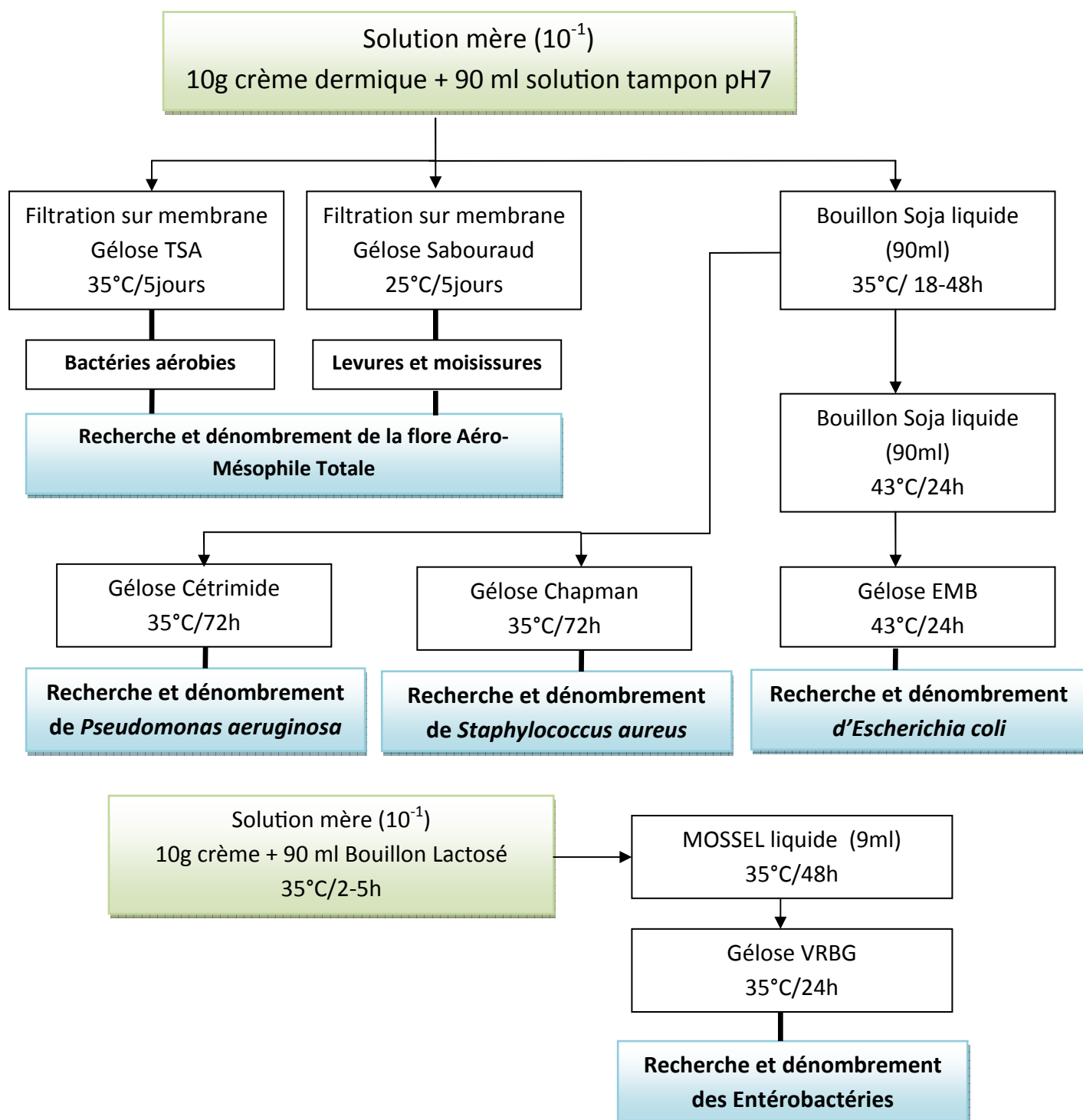


Figure 2.4 : Protocole d'analyse de la qualité microbienne des préparations pharmaceutiques non obligatoirement stériles (crèmes dermiques) selon les monographies de la Pharmacopée Européenne. [71]

## 2.2.10. Essais pharmaco-toxicologiques

Nous avons mené ces essais afin de mettre en évidence :

- les limites de toxicité de l'HE et ses éventuels effets indésirables sur des lapins,
- les propriétés pharmacologiques de l'HE en relation qualitative et quantitative avec l'emploi préconisé chez l'homme.

### 2.2.10.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC) de l'HE [80]

#### 2.2.10.1.1. Principe

L'irritation correspond à l'effet qui peut survenir après une projection unique ou une exposition forte mais de courte durée. Les effets s'échelonnent d'une légère rougeur (érythème) à des modifications sévères: œdème (accumulation d'une quantité excessive d'eau dans les tissus ou les cavités séreuses), escarre ou nécrose (dégénérescence et mort du tissu), hyperplasie, effet corrosif (destruction tissulaire irréversible sur toute la profondeur de la peau).

#### 2.2.10.1.2. Protocole

Les flancs de 3 lapins ont été tondu. Trois scarifications parallèles de l'épiderme ont été pratiquées au niveau du flanc droit de chaque animal. Une heure plus tard, une quantité de 0,5 g d'HE a été appliquée sur les flancs droits. Les flancs gauches serviront de témoins. L'IPC a été appréciée aux sites d'application à l'aide d'une échelle d'évaluation numérique permettant de coter les érythèmes et la formation d'œdème (Tableau 2.4) après 24 h. L'indice IPC sera calculé par la formule suivante :

$$\text{IPC} = \text{Somme valeurs de l'érythème et de l'œdème} / 6 \text{ (2 flancs pour 3 lapins)}$$

Tableau 2.4 : Échelle de cotation de l'érythème et de l'œdème lors de l'IPC. [80]

Échelle	Érythème	Œdème
0	Absence	Absence
1	Léger	Léger
2	Moyen	Moyen
3	Important	Important
4	Très grand	Très grand

Selon la gravité des effets observés, les produits seront classés en non irritants ( $IPC < 0,5$ ), légèrement irritants ( $0,5 < IPC < 3$ ), irritants ( $3 < IPC < 5$ ) et sévèrement irritants ( $5 < IPC < 8$ ).

#### 2.2.10.2. Tolérance locale après applications cutanées itératives [80]

Ce test est destiné à révéler des réactions cutanées impossibles à détecter lors des tests IPC. Il est fondé sur l'observation des réactions locales provoquées par des applications répétées de la crème dermique sur la peau du lapin.

##### 2.2.10.2.1. Méthode

Deux lots de 3 lapins chacun ont été constitués. Les flancs de chaque animal ont été tendus. Le 1<sup>er</sup> lot est traité par la crème dermique alors que le 2<sup>ème</sup> servira de témoin. La crème a été appliquée durant 28 jours consécutifs sur le flanc droit des lapins à raison de 4 g par animal et par jour.

Il nous est apparu utile de choisir la dose la plus élevée d'HE (0,5%), de façon à faire apparaître des effets nocifs.

##### 2.2.10.2.2. Lecture

Pendant la période de traitement, des examens cliniques ont été réalisés quotidiennement en faisant des observations macroscopiques des flancs traités.

Ce test peut mettre en évidence certains effets tels que le dessèchement, la desquamation ou les gerçures de la peau liés aux propriétés dégraissantes des substances.

#### 2.2.10.3. Évaluation de l'activité cicatrisante *in vivo* de la crème dermique [80]

##### 2.2.10.3.1. Objectifs

Ce test a été réalisé *in vivo* chez des lapins Albinos. Il a pour but l'évaluation de la potentialité de la néoformation des tissus dermiques après l'application quotidienne d'une crème à base d'HE (0,3 %) de géranium rosat. La lecture des résultats a été faite en comparaison avec :

- un groupe recevant un produit de référence (Acide asiaticoside 1 % - principe actif du Madécassol<sup>®</sup> Roche-Nicholas),
- un groupe traité uniquement par l'excipient exempt de principe actif (Placebo).

### 2.2.10.3.2. Méthodologie

Nous utilisons pour ce test 3 lots de 3 lapins chacun préalablement rasés sur les 2 flancs. De part et d'autre de l'axe vertébral de chaque animal, une série de 3 plaies parallèles a été effectuée par excision de la peau avec un scalpel. Chaque plaie présente une taille de 5 cm.

Le 1<sup>er</sup> lot de lapin sera traité avec la crème dermique ayant le PA, à raison de 5 g pour le flanc droit. Le flanc gauche servira de témoin. Le 2<sup>ème</sup> lot recevra le Placebo tandis que le dernier sera traité par application du produit de référence (Madécassol®). La durée du traitement est de 14 jours.

Chaque animal est placé dans une cage individuelle. Il recevra de la nourriture granulée et de l'eau durant tout le traitement jusqu'à la cicatrisation totale.

L'observation macroscopique est réalisée avant chaque nouvelle application. Une échelle de cotation (Tableau 2.5) a été établie pour suivre l'évolution du processus de cicatrisation. Elle prend en considération les paramètres suivants :

- évolution de la surface de la plaie (échelle graduée en 4),
- apparition ou non d'œdème.

Tableau 2.5 : Échelle de cotation de l'évolution de la cicatrisation des plaies. [80]

Échelle	Cicatrisation
0	Absence
1	Légère
2	Moyenne
3	Bonne
4	Excellente

### 2.2.10.4. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle

#### 2.2.10.4.1. Objectifs

Il s'agit d'évaluer l'HE dans un test discriminatoire anti-inflammatoire pour une éventuelle utilisation en thérapeutique.

Ce test est très utilisé pour évaluer un nouvel anti-inflammatoire en première intention. Il a été décrit par WINTER et al en 1962 [81].

#### 2.2.10.4.2. Principe

Le principe du test consiste à provoquer un gonflement aigu de la patte d'une souris. Il est réalisé par une injection d'une substance inflammatoire sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche. Ceci provoque une réaction qui peut être réduite par des substances anti-inflammatoires. Cette réaction se traduit par un œdème d'installation rapide et persistant. La mesure est effectuée en comparant, à différents temps, le volume (mm) de la patte des souris des 3 lots (témoin, référence, HE) avec un pied à coulisse. [82]

#### 2.2.10.4.3. Race de souris utilisée

Des souris des deux sexes, de race NMRI et pesant entre 27 et 30 g, sont réparties en 3 lots (5 souris par cage). Elles sont soumises à une photopériode de 12h de lumière par 24 h avec libre accès à l'eau et à la nourriture. Dix huit heures avant l'expérience, les animaux ont été mis à jeun tout en ayant un accès libre à l'eau.

#### 2.2.10.4.5. Déroulement de l'essai

Une dose de 2,5 % d'HE dissoute dans un solvant neutre (Myristate d'isopropyle) a été testée. L'efficacité de ce produit est appréciée en comparaison avec le Piroxicam (1%) qui est pris comme référence.

Nous avons constitués 3 lots de souris. Le 1<sup>er</sup> recevra l'HE à 2,5 % à raison de 0,6 ml par 100 g de poids corporel (0,2 ml par souris). Le second sera traité par le Piroxicam<sup>®</sup> et, enfin, le 3<sup>ème</sup> lot (témoin) recevra de l'eau physiologique. Les différents traitements ont été administrés par injection intra péritonéale.

L'induction d'une inflammation aiguë est faite par injection de 0,1 ml d'une solution de levure de bière (5 %) au niveau de la patte postérieure gauche. Le volume de chaque patte est mesuré après 24 h du traitement à l'aide d'un pied à coulisse.

#### 2.2.10.4.6. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance (ANOVA). L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport aux témoins selon la formule de NDIAYE et al (2002) [83] :

$$\% \text{ Réduction œdème} = \frac{(\% \text{ œdème témoin} - \% \text{ œdème essai}) \times 100}{\% \text{ œdème témoin}}$$



## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

#### 3.1. Extraction de la fraction aromatique du géranium rosat (*P. graveolens* L.)

##### 3.1.1. Extraction et rendement en huile essentielle

L'hydrodistillation de la partie aérienne de plante fraîche a été réalisée avec le dispositif de Clevenger. Le rendement moyen en HE est de 0,2 %. Ainsi et pour chaque extraction, nous avons pu récupérer une quantité de 0,22 ml d'HE pour 100 g de matière végétale.

Cependant, ce rendement en HE est relativement élevé comparé à ceux rapportés par les normes AFNOR (0,15%) et celui de DEMARNE (0,08-0,16%). [62]

En Algérie, le rendement en HE peut varier d'une région à l'autre selon les facteurs pédoclimatiques. Une étude récente [65] a rapporté un taux de 0,125% en HE extraite des plantes cultivées dans la plaine de Mitidja. Ce taux est très en dessous du rendement obtenu au cours de nos extractions. Ceci peut être lié aux influences pédologiques (texture, composition, porosité et pH du sol).

D'un autre côté, certains auteurs [86][88][92] ont obtenu un rendement légèrement supérieur au notre. Ceci peut, éventuellement, être attribué à un déficit en amendements minéraux. Ces derniers contribuent à l'augmentation de la masse végétale et à la quantité d'HE extraite.

En résumé, plusieurs études [2][87][90] ont confirmé que les fluctuations observées dans le rendement en HE peuvent être attribuées non seulement à l'origine de la plante mais également à l'imbrication d'une multitude de facteurs (biotique et abiotique). Parmi ces facteurs, nous pouvons citer la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents. Ce dernier exerce une influence directe chez les espèces qui possèdent des structures histologiques superficielles de stockage (cas du géranium rosat). [2][89][91]

D'autres auteurs [85][90][92][98] imputent ces changements aux pratiques culturales (espacements entre plants, désherbage, installation d'une culture intercalaire, apport des engrais organiques et/ou minéraux) et aux méthodes d'extraction. [62][89][99]

A propos des méthodes d'extraction, nous colligeons dans le tableau 3.1 le rendement en HE obtenu suivant 2 méthodes.

Tableau 3.1: Influence de la méthode d'extraction sur le rendement en HE.

Méthode d'extraction	% en HE
Hydrodistillation (HD)	0,2
Extraction avec solvant organique	0,25

L'extraction avec un solvant organique (éther éthylique) est la meilleure quantitativement. Dans notre étude, elle nous a permis de récupérer une grande quantité d'HE (0,25 %) par rapport à une simple hydrodistillation (0,2 %). C'est avec l'extraction liquide-liquide que les rendements semblent les plus élevés. Ceci a été confirmé par les travaux de RAJESWARA et al [93] et GOMES et al [99].

Cependant, cette méthode demeure préjudiciable pour la qualité organoleptique de l'HE.

### 3.1.2. Extraction de l'huile essentielle dissoute dans l'hydrolat (HA)

À partir d'un litre d'eau aromatique (hydrolat), nous avons récupéré une quantité de 2 ml d'essence aromatique (huile secondaire). Cette quantité est très importante et représente 25 % de la masse totale en HE (huile primaire).

Selon BOSSON et al [43] et PAOLINI et al [94], l'HE dissoute dans l'HA peut avoir plusieurs origines combinées :

- une partie de l'HE est dissoute dans l'eau, soit environ 1% de la fraction décantée,
- une autre fraction est émulsionnée le plus souvent dans 10% d'eau,
- enfin, une quantité est fortement mélangée avec de l'eau et des molécules organiques tierces. A l'interface huile/eau, elle peut être supérieure à 10%.

### 3.1.3. Observations microscopiques des structures sécrétrices

Afin de localiser les structures sécrétrices des HE, nous avons réalisé des coupes transversales au niveau des tiges pour effectuer des observations microscopiques.

L'examen de la coupe transversale au niveau de la tige a permis de distinguer de l'extérieur vers l'intérieur les tissus suivants :

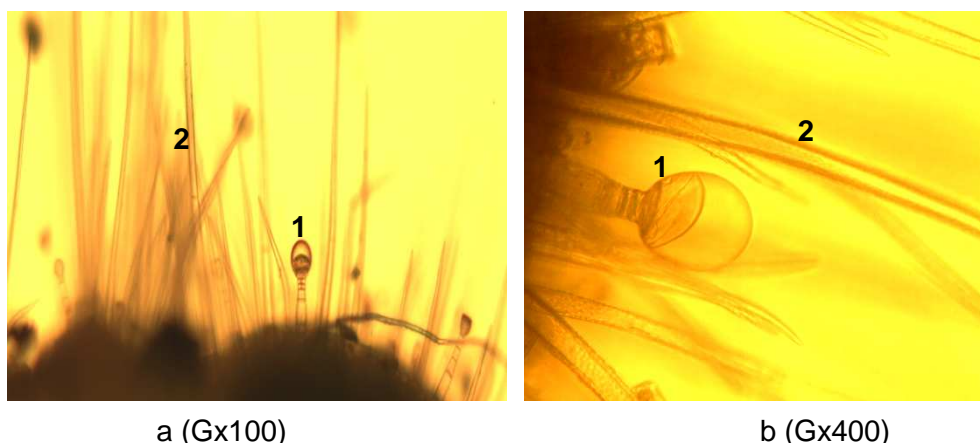
#### 3.1.3.1. Écorce

Épiderme : C'est un tissu protecteur des cellules du parenchyme. Il est formé d'une assise de cellules à paroi pectocellulosique. Sur la face externe, les cellules épidermiques sont cutinisées.

Les cellules épidermiques présentent des allongements vers l'extérieur. Ce sont des poils tecteurs unicellulaires et des poils sécréteurs à pied court.

Les poils sécréteurs sont unisériés. Ils sont formés par 3 à 5 cellules. A leur extrémité, ils se terminent par une cellule à tête enflée, globuleuse. Elle est remplie d'huile essentielle. (Fig. 3.1)

Parenchyme cortical : formé de cinq à six assises de cellules plus ou moins arrondies.



a (Gx100)

b (Gx400)

(1) Poil sécréteur, (2) Poil tecteur.

Figure 3.1: Observations microscopiques : (a, b) Poils sécréteurs et tecteurs unisériés pluricellulaires. (Original, 2009)

### 3.1.3.2. Cylindre central

Il est formé par un tissu de soutien dont les cellules sont mortes en l'occurrence le sclérenchyme qui entoure complètement les tissus conducteurs ou tissus cribro-vasculaires. (Figure 3.2)

#### 3.1.3.2.1. Sclérenchyme

Il est formé par un anneau continu. Ce dernier est composé par une, deux ou trois assises de cellules selon les endroits. Les cellules présentent des parois lignifiées. Des cellules sclérenchymateuses sont observées au dessus des tissus conducteurs.

#### 3.1.3.2.2. Faisceaux cribro-vasculaires

Les tissus conducteurs sont situés sur un seul cercle et, au centre, apparaît un seul faisceau cribro-vasculaire (Figure 3.3). Le tissu conducteur est formé par :

Phloème, tissu qui conduit la sève élaborée. Sur la coupe, on le distingue vers l'extérieur. Il est constitué d'un amas de petites cellules arrondies. Le phloème est un tissu vivant. Il est formé de cellules criblées dont les parois sont pectocellulosiques,

Xylème, tissu qui conduit la sève brute. Sur la coupe, on le distingue vers l'intérieur. Il est constitué de cellules dont les parois présentent un épaissement ligneux. C'est un tissu mort.

Aussi, nous observons une alternance des tissus du phloème avec les tissus du xylème. La différenciation des tissus conducteurs est centrifuge. Le nombre des faisceaux conducteurs est égal à neuf.

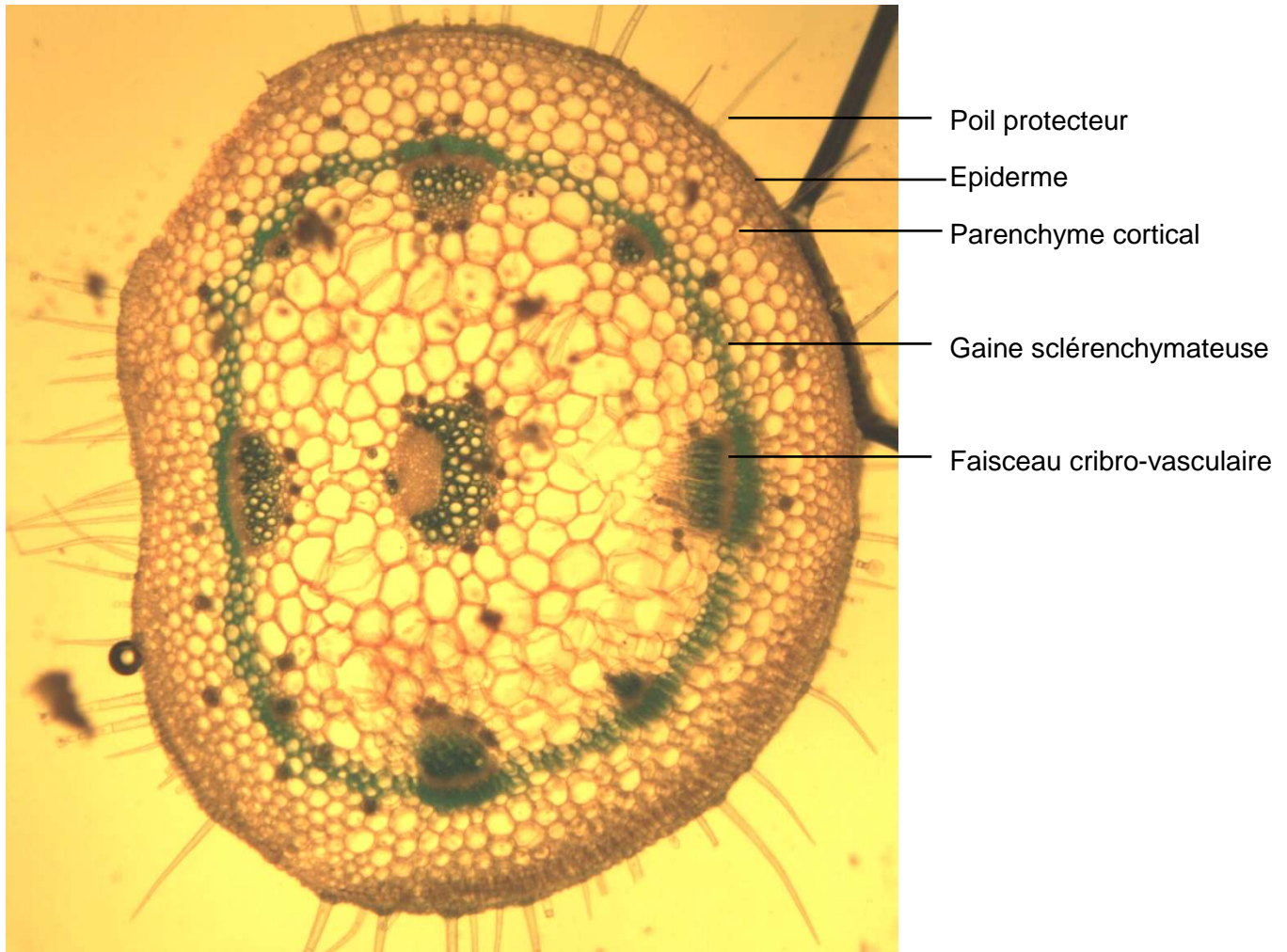


Figure 3.2 : Coupe transversale au niveau de la tige (Gx100). (Original, 2009)

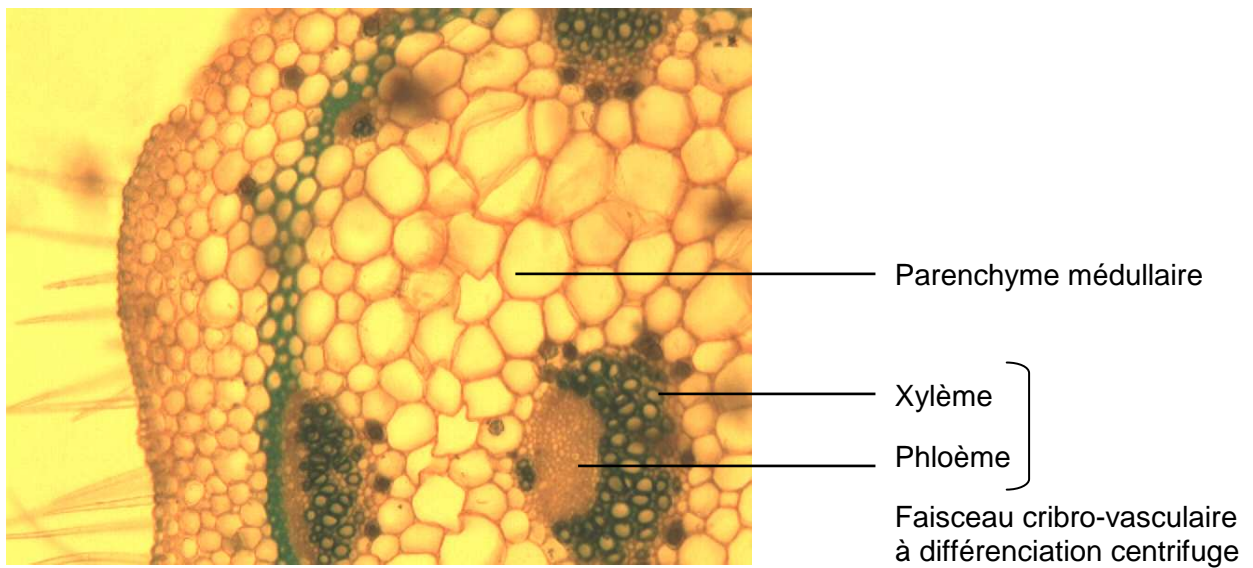


Figure 3.3 : Faisceau cribro-vasculaire au niveau de la tige (Gx100). (Original, 2009)

Une observation microscopique (vue de face) au niveau de la partie externe des feuilles a été effectuée. Elle a montré les structures suivantes (Figure 3.4) :

- Cellules épidermiques, de forme sinueuse qui forme un puzzle,
- Poils protecteurs unicellulaires,
- Stomates formés par 2 cellules stomatiques qui contiennent des chloroplastes.

Au centre, nous observons une ouverture, l'otiole.

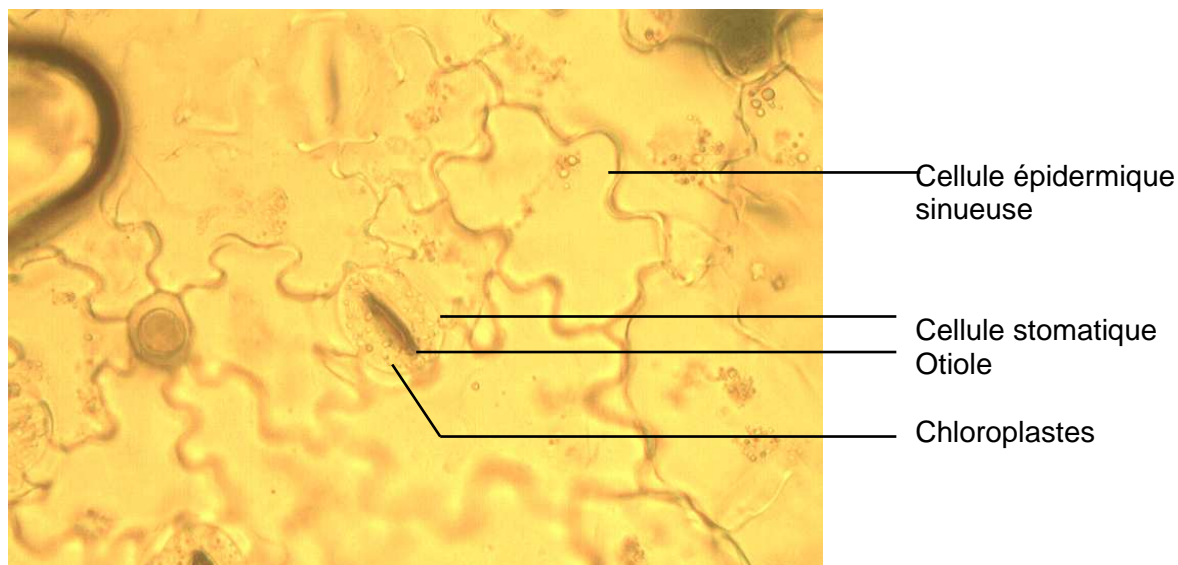


Figure 3.4: Vue de face de la partie supérieure de la feuille (Gx400). (Original, 2009)

Au terme de cette étude, nous pouvons dire que le géranium rosat ne possède que des structures sécrétrices superficielles. Ce sont des poils glandulaires.

Ce résultat a été confirmé par plusieurs travaux. Ainsi, SPERANZA [100] rapporte que les poils de protection sont constitués de cellules mortes et ne contiennent que de l'air. Leur enchevêtrement dense réussit à retenir une couche d'air qui se sature lentement par l'humidité. Dans son étude, LALLI et al [91] ont réalisé des observations au niveau des feuilles avec microscopie à balayage électronique. Ils ont pu constater une distribution équivalente entre les 2 types de poils.

#### 3.1.4. Étude de la cinétique d'extraction

Cette étude nous a permis de suivre la cinétique d'extraction et l'évolution du rendement en HE. Elle est présentée dans la figure 3.5.

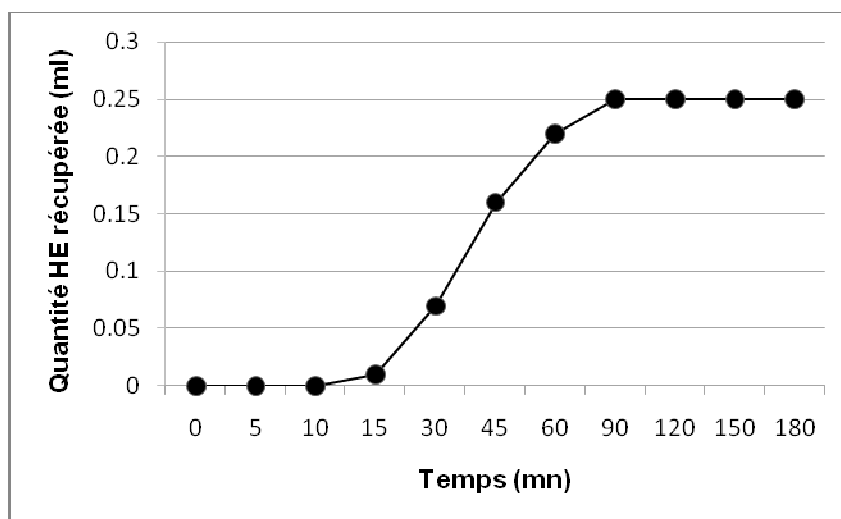


Figure 3.5: Cinétique d'extraction des HE lors de l'hydrodistillation.

La cinétique peut se diviser en trois étapes qui s'expliquent comme suit :

- dans une 1<sup>ère</sup> étape, nous observons un palier dont le rendement est nul (0-15 mn). Il correspond à la phase de chauffage de la matière végétale,
- la seconde correspond à une augmentation rapide de la quantité en HE (30-90 mn),
- au cours de la troisième étape, la courbe tend vers un second palier. Celui-ci correspond au rendement maximum possible à atteindre.

Le temps relativement court de l'hydrodistillation (moins de 2 heures) peut être expliqué par la localisation superficielle des sites sécréteurs. Ainsi, la membrane externe ou la cuticule constituent les seules barrières à la libération de l'HE. Elle est vite rompue à ébullition et les composés volatils sont aussitôt évaporés d'où la courte durée pour atteindre le pic cumulatif lors de l'extraction. Lorsque les HE sont localisées dans les tissus sous-cutanés, elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau. Elles seront alors lentement évaporées en comparaison avec les structures superficielles. [36] [92]

## 3.2. Étude analytique de l'huile essentielle

### 3.2.1. Caractéristiques organoleptiques

L'HE obtenue est de couleur jaune verdâtre. Elle présente une odeur prononcée de rose citronnée. Quant à l'HA, d'aspect transparent, il a une odeur moins prononcée et fleurie.

Les paramètres organoleptiques de l'HE sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes AFNOR (Tableau 3.2). En revanche, l'HA n'a pas fait l'objet de normalisation.

Tableau 3.2 : Propriétés organoleptiques de l'HE.

	AFNOR (2000) [9]	Notre étude
Aspect	Liquide mobile, limpide	Liquide limpide
Couleur	Jaune ambré à jaune verdâtre	Jaune verdâtre
Odeur	Rosée, ± menthée	Rosée, légèrement citronnée

### 3.2.2. Caractéristiques physico-chimiques

Les constantes physico-chimiques de l'HE ont été déterminées selon des méthodes normalisées. Les résultats de ces mesures sont regroupés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3: Caractéristiques physico-chimiques de l'HE.

	Paramètres physico-chimiques					
	Indice d'Acide	Indice d'Ester	Densité à 20°C	Indice de Réfraction	Miscibilité à l'EtOH à 70°	pH
Résultats obtenus	5,6	69	0,89	1,46	3	3,8
Normes AFNOR	<10	53-76	0,884-0,910	1,461-1,470	3-5	-

Nous remarquons que les paramètres physico-chimiques de l'HE sont en accord avec ceux mentionnés par les normes.

Pour les constantes chimiques, l'indice d'acide (IA) donne une idée sur le taux d'acides libres [101]. Cet indice est certes dans les normes mais demeure relativement élevé. Cela peut être dû à la dégradation de l'HE (hydrolyse des esters) durant sa conservation. Inversement, un IA inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'HE.



L'indice de réfraction varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés [102]. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé ce qui est le cas de l'HE de notre étude.

Plusieurs études ont démontré que les paramètres physico-chimiques des HE sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques [2][45][56].

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera primordial de déterminer le profil chromatographique de l'HE.

### 3.3. Analyses chromatographiques de la fraction aromatique

#### 3.3.1. Composition chimique de l'huile essentielle

Les résultats de l'analyse par CG/SM de l'HE sont présentés dans le tableau 3.4. Les composés majoritaires sont listés suivant l'ordre de prédominance.

Tableau 3.4: Composés majoritaires de l'huile essentielle.

Composés	%
Citronellol	33,215
Formate de citronellyle	10,566
Guaia-6,9-diene	9,256
Geraniol	5,423
Isomenthone	4,352
Tiglate de géranyle	3,033
Linalool	2,237
$\beta$ -Tiglate de phényl	2,208
Menthone	1,964
10-epi- $\gamma$ -eudesmol	0,386
Total identifié	95,6

Au total, 48 composés ont été identifiés ce qui correspond à un pourcentage de 95,6 % par rapport à l'ensemble des constituants isolés.

Le citronellol apparaît comme le constituant majoritaire de l'HE (33,0%), suivi du formate de citronellyle (10,56%), du guai-6,9-diene (9,25%), du géraniol (5,42%) et de l'isomenthone. Le Rhodinol (citronellol, géraniol et linalool) est présent à un taux de 41%.

Cette HE est composée essentiellement d'alcools terpéniques (41%). Les esters forment un pool à moins de 25% suivis des sesquiterpènes (19%). Les cétones sont à un taux assez important (6%) mais constituées uniquement de menthone et d'isomenthone.

Enfin, les composés minoritaires appartiennent à la famille des oxydes (oxyde de rose), aldéhydes (géraniol, néral) et alcools sesquiterpéniques. (Tableau 3.5)

Tableau 3.5: Classes biochimiques des composés identifiées dans l'HE.

Classes chimiques	%
Monoterpénols	40,875
Esters terpéniques	24,654
Sesquiterpènes	19,009
Cétones monoterpéniques	6,627
oxydes terpéniques	2,967
Alcools sesquiterpéniques	0,772
Aldéhydes terpéniques	0,679
Total identifié	95,583

Afin d'authentifier les HE selon leur composition chimique, nous nous sommes référés aux normes AFNOR. Ensuite, et selon profil chromatographique de l'HE, notre étude nous permettra d'aboutir aux chémotypes et cultivars du géranium rosat. Selon les normes, il existe 3 cultivars répertoriés à savoir Bourbon, Égypte et Chine. Ils sont différenciés par la proportion de certaines molécules (Citronellol et Géraniol) répertoriées dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6: Composés caractéristiques de 3 cultivars de géranium rosat. [9]

Cultivars	Citronellol	Géraniol	Formate de citronellyle	C/G
Bourbon	22	19	10	1-1,5
Égypte	26-29	9	6	3
Chine	29	6	13	5
Nos résultats	33	5	10	6

Le profil chromatographique de la plante aromatique étudiée (Tableau 3.6) montre que son HE possède tous les constituants nécessaires pour faire d'elle un "chénotype Citronello cultivar Chine". L'HE est marquée par un taux de Citronello plus important que le cv bourbon et inversement pour le Géraniol. Elle a un rapport C/G identique à celui de cv Chine.

En outre, l'HE étudiée est caractérisée par la prédominance de 3 composés : Citronello, Formate de citronellyle et Géraniol. Ces composés sont aussi majoritaires dans celle de la rose. Des ressemblances dans le profil chromatographique entre la rose et le géranium expliquent la préférence des parfumeurs pour ce dernier.

Ces 3 composés se rencontrent aussi dans les HE des autres plantes à parfum comme la Citronnelle [10][102] et le *Thymus vulgaris* cv géraniole. [25]

### 3.3.2. Composition chimique de l'hydrolat

Pour pouvoir quantifier les composants chimiques des HA par CG-SM, il a été nécessaire de le « concentrer » en procédant à une extraction avec l'éther éthylique. La composition chimique de l'HA est consignée dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7: Composition chimique de l'HA.

Composés	%
Géraniol	28,169
2,6 diméthyle decane	20,974
Linalool	8,798
Alcool undecylique	7,767
Isopropyle naphtalène	6,147
Acétate de citronellyle	4,503
Oxyde de linalool	4,255
Limonène 1,2 diol	3,783
Transhydroxylinalool	3,714
Oxyde de piperitone	2,835
Cis oxyde de linalool	1,722
Dihydroxyterpineol	1,271
Total identifié	93,938

A la lecture des résultats comparatifs des compositions chimiques de l'HE et de l'HA, il en ressort que ces 2 produits ne présentent pas le même profil. Dans l'HA, 12 composés ont été identifiés sur 18 ce qui représente un taux de 94%. Le composé majoritaire est le Géraniol (28%), suivi du 2,6-diméthyl decane (21%) et du Linalool

(8,7%). La majorité des composés appartiennent à la famille des alcools. Aucun mono ou sesquiterpène n'a été détecté.

L'HA présente des composés spécifiques. Il montre une petite quantité en composés volatils semblables à ceux présents dans l'HE (Linalool) ainsi que des composés solubles dans l'eau non retrouvés dans l'HE. La composition des HA s'éloigne donc de celle des HE.

Plusieurs études ont montré que les molécules oxygénées hydrophiles se trouvent en grandes quantités dans les HA. Au contraire, les composés lipophiles comme les hydrocarbures terpéniques sont généralement quasi absents [43][39][44][93].

À titre comparatif, les chromatographes suivants (Figure 3.6) permettent de constater les différences entre la composition de l'HE et celle de l'HA.

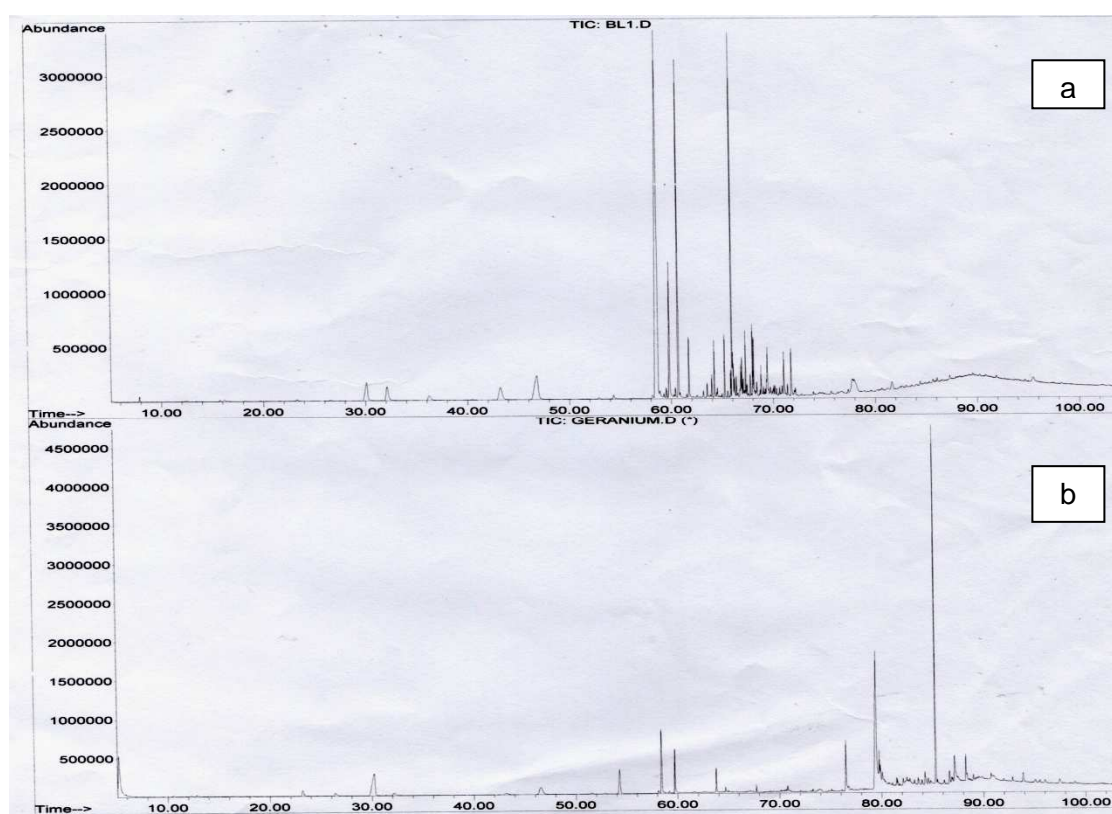


Figure 3.6: Comparaison entre le profil chromatographique de l'HE (a) et de l'HA (b).  
(Original, 2009)

Des résultats similaires ont été rapportés par RAO et al [93]. Ils montrent que l'HA est riche en composés oxygénés et hydrophiles.

### 3.4. Activité antimicrobienne de la fraction aromatique

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'HE et de l'HA (méthode classique de diffusion et micro atmosphère) sont présentés dans le tableau 3.8.

Tableau 3.8: Activité antimicrobienne des HE et HA du géranium rosat.

Souches microbiennes	Aromatogramme	Microatmosphère	Aromatogramme
	HE (mm)	HE (mm)	HA (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	39,4	25,2	12
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31	12,0	00
<i>Bacillus subtilis</i>	35,4	27,2	00
<i>Sarcina lutea</i>	49	35	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,3	00	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26,4	00	10
<i>Escherichia coli</i>	00	00	00
<i>Candida albicans</i>	25	17	00

L'HE présente *in vitro* une bonne activité inhibitrice sur les germes testés. Cependant, les microorganismes étudiés n'ont pas manifesté la même sensibilité vis-à-vis de l'HA.

En prenant en considération les diamètres d'inhibition, l'HE est la plus active sur *S. lutea*, *B. subtilis*, *S. aureus* et *S. epidermidis* avec une surface d'inhibition supérieure à 30 mm (Figure 3.7). Au contraire, elle est moins active vis-à-vis de *P. aeruginosa* (26 cm) et sera sans effet inhibiteur sur *K. pneumoniae* et *E. coli*.

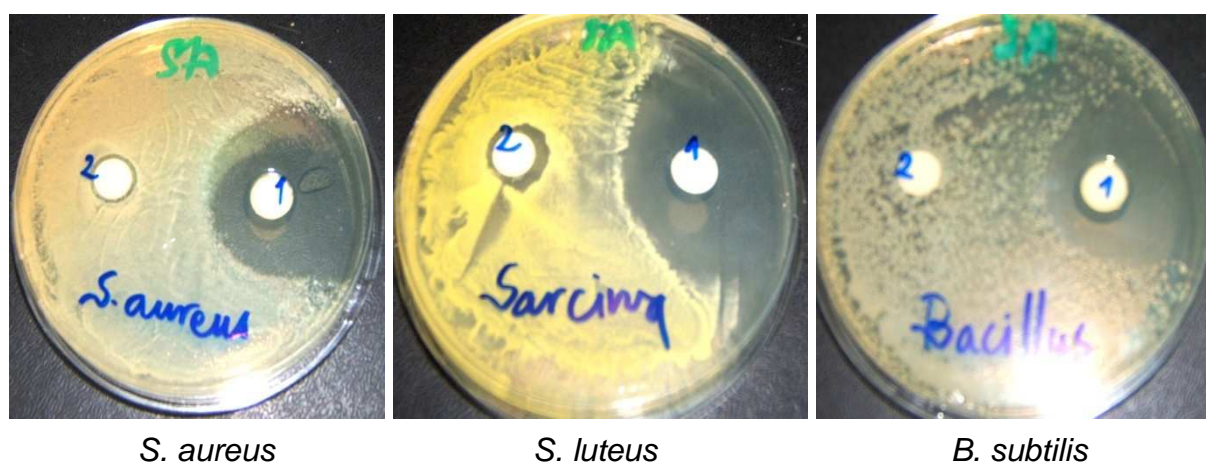


Figure 3.7: Aromatogramme des HE (1) et HA (2). (Original, 2009)

La résistance de ses 2 bacilles (*K. pneumoniae* et *E. coli*) Gram négatif à l'HE n'est pas surprenante. En fait, ces bactéries possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides. Cette résistance est en relation avec la nature de la membrane externe qui est composée de lipopolysaccharides. Ces derniers forment une barrière imperméable aux composés hydrophobes. [84]

En microatmosphères, l'HE est la plus active sur les *S. lutea*, *B. subtilis* et *S. aureus* avec respectivement une surface d'inhibition de 35, 27 et 25 mm (Fig. 3.8). Les résultats des aromagrammes sont très proches de ceux des microatmosphères pour ces 3 germes.

Des diamètres semblables s'expliquent par le fait que la diffusion des composés aromatiques de l'HE se fait aussi bien en phase gazeuse qu'en milieu gélosé.

Ces résultats démontrent l'efficacité antibactérienne de la phase volatile de l'HE. Ils sont très encourageants pour une éventuelle utilisation dans un projet visant à assainir l'air (hôpitaux).

La bactérie *S. lutea* a montré une plus grande sensibilité vis à vis de l'HE et de l'HA. Au contraire, chez *C. albicans*, l'HE et l'HA n'ont pas une grande action inhibitrice.

MAHBOUBI et al [108] ont suggéré que l'activité antimicrobienne de l'HE de géranium sera accrue en combinaison avec d'autres HE (lavande, clou de girofle). Ils soutiennent que cette synergie est capable d'inhiber la croissance des *P. aeruginosa* multi résistantes.

En étudiant l'activité antimicrobienne de 50 HE sur 25 souches bactérienne, DORMANS et al [109] ont trouvé que l'HE de géranium à une action bactéricide majeure. Cette propriété a été confirmée par d'autres études scientifiques [106] [107][108] qui ont démontré que cette activité est tributaire de la composition chimique de l'HE.

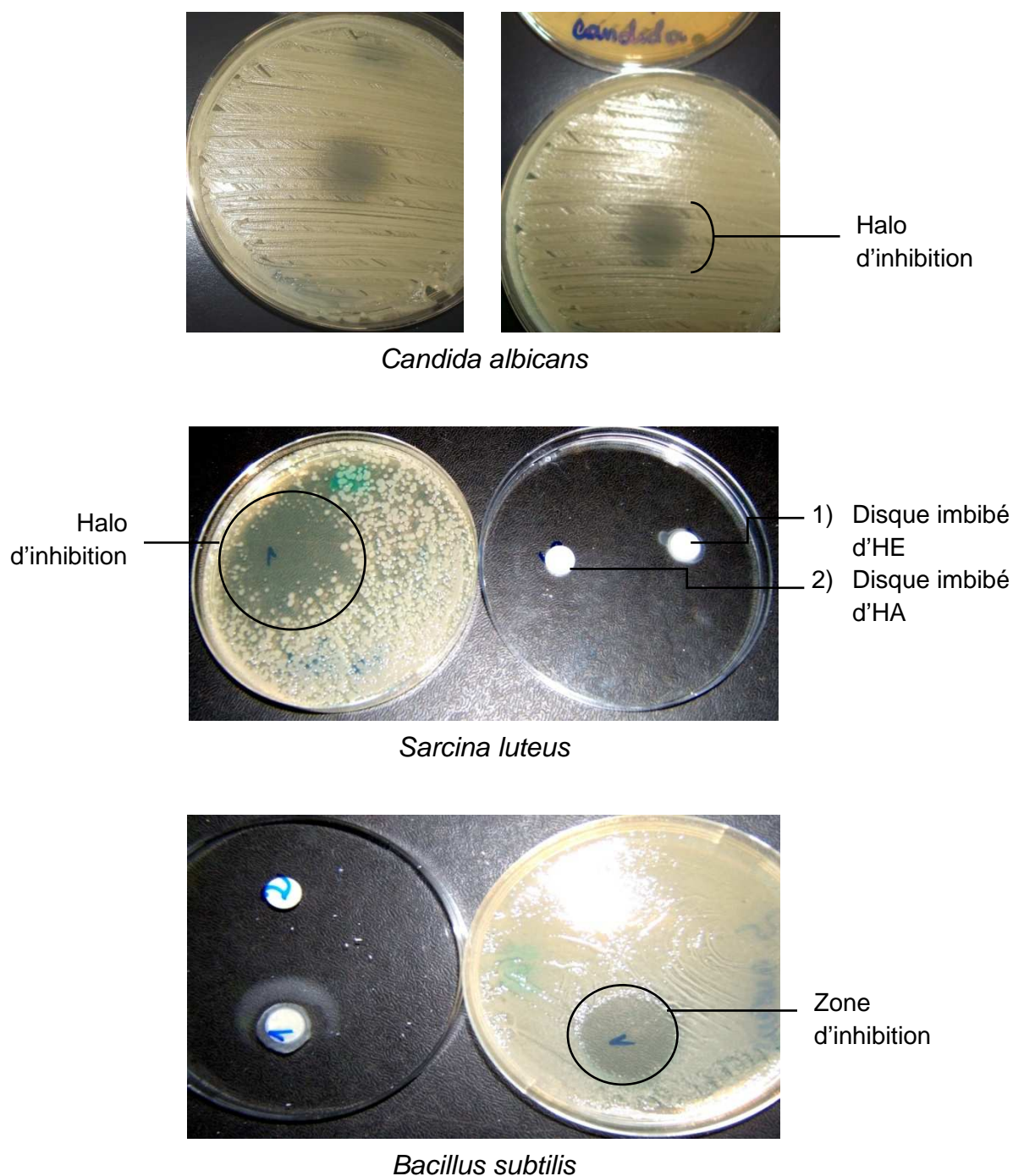


Figure 3.8: Effet antimicrobien de la phase volatile de l'HE et HA.. (original, 2009)

D'ores et déjà, ces résultats et autres travaux [110] laissent entrevoir la réalité de l'action anti infectieuse de la fraction aromatique.

La majorité des travaux s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des HE. Les études sur les mécanismes d'action sont en nombre négligeable.

L'activité antimicrobienne de l'HE est due principalement à son profil chimique. Ce dernier est caractérisé par une forte teneur en Citronellol, Formate de citronellyle et Géraniol (33%,12% et 5% respectivement). Ces alcools et esters terpéniques sont réputés pour avoir une grande action antibactérienne. D'après BELAICHE et al [7], ils présentent aussi une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des *S. epidermidis* et *S. aureus*.

Les composés chimiques purs les plus efficaces sont le Géraniol, le Citronellol, le Linalool, devant les monoterpènes. [109]

Cependant, vouloir relier directement les vertus thérapeutiques de l'HE à la seule présence de citronellol ou des monoterpénols n'est pas fondé.

En théorie chimique, l'HE qui renferme le plus fort taux de Géraniol devra présenter une forte activité antiseptique. Or les résultats expérimentaux prouvent qu'il n'en est rien. (Tableau 3.9)

La sensibilité d'*E. coli* au Géraniol pur est de ++. Cette sensibilité est mesurée à ++++ face au thym (22% de Géraniol). Le géranium rosat n'a aucune action bactéricide malgré ses 42 % de Géraniol.

L'ensemble des composées chimiques présents dans l'HE augmente l'activité bactéricide du Géraniol contre *E. coli* et *Pseudomonas* en agissant en synergie.

En revanche, aucune action inhibitrice n'a été décelée sur la croissance de *Klebsiella* et *Enterococcus*. [25]

Tableau 3.9: Comparaison entre l'activité antibactérienne des HE chémotypées. [25]

Germes	Thym vulgaire 22% Géraniol	Géranium rosat 42% Géraniol	Géranol pur 100%	Résultats obtenus 5% Géraniol
<i>E. coli</i>	++++	0	++	0
<i>Pseudomonas</i>	+++	+	++	++
<i>Klebsiella</i>	+++	+++	++	+
<i>Enterococcus</i>	0	0	++	
<i>Staphylococcus</i>	0	+++	++	+++
<i>Streptococcus</i>	+	+++	++	

+ : intensité du pouvoir antiseptique du germe.



Cela démontre que la différence d'activité antiseptique de ces 2 HE (thym et géranium rosat) ne peut pas s'expliquer par la présence d'un seul principe actif.

D'après DURAFFOURD et al [25], il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette façon, la valeur d'une HE tient à son « totum », c'est à dire à l'intégralité de ses composants.

En résumé, l'activité biologique d'une HE est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires et les possibles effets synergiques entre les constituants.

### 3.5. Préparation et contrôle physico-chimique des crèmes dermiques

La préparation officinale des crèmes dermiques (Figure 3.9) à base d'HE et d'HA a été accomplie en respectant les règles de BPF.



Figure 3.9 : Crème dermique à base d'HE (0,3 %).

L'idée d'utiliser l'HE et l'HA en usage topique est pleinement justifiée. D'abord pour la mise en évidence de nouvelles molécules thérapeutiques et ensuite pour la valorisation du patrimoine végétal en dermatopharmacie.

Les préparations magistrales colligées dans notre étude sont formées d'ingrédients répertoriés dans le "Handbook of Pharmaceutical Excipients" [79].

Lors de nos préparations galéniques, excepté l'huile de vaseline, tous les excipients sont choisis parmi les produits d'origine naturelle. Les crèmes dermiques obtenues seront donc labellisée « Bio ».

Dans les émulsions, la phase aqueuse représente (70%). Nous avons opté pour l'HA car, de nombreux médicaments contemporains et produits d'hygiène en contiennent. [35]

D'après MARTINI et al [3], la quantité des tensioactifs de la formulation de la crème est de 1 à 10 % en poids. Elle est incorporée dans la phase huileuse. Cette dernière représente de préférence 15 à 30 % du poids total de la crème. Cette phase peut être constituée par tous les corps gras et notamment les huiles qui sont classiquement utilisés dans la dermocosmétique.

Nous avons utilisé le Kathon CG<sup>®</sup> comme conservateur dans les crèmes dermiques préparées. Ces préparations ont données l'effet escompté (voir Essais pharmaco-toxicologiques) malgré les mises en garde rapportées dans certaines publications scientifiques. [111][112].

D'après ces études, le Kathon CG est référencé comme un allergène. De ce fait, nous l'avons soustrait des formulations. Ces dernières seront protégées contre les contaminations par la présence d'HE. Celle-ci est douée d'intéressantes propriétés antibactériennes.

### 3.5.1. Détermination des caractères organoleptiques

La composition obtenue se présente sous forme d'une crème de couleur blanche, rigide, lisse et d'aspect brillant. Elle a une texture veloutée agréable à l'application.

Elle présente des caractéristiques galéniques qui lui assurent un fort caractère couvrant et ne suscitent aucune sensation "collante". Le temps de séchage s'avère relativement court.

### 3.5.2. Évaluation de la stabilité et vieillissement accéléré

La centrifugation à vitesse constance (4500 tours/mn) n'a révélé aucun phénomène d'instabilité. Sa résistance à la centrifugation (critère de stabilité) est apparue très bonne.

### 3.5.3. pH des crèmes dermiques

La gamme de pH des préparations s'échelonne entre 7 et 8. Il est à noter que le pH de la peau est d'environ 5,5 d'où la nécessité d'avoir un pH neutre ou légèrement acide (par diminution du taux du TEA).

### 3.6. Caractérisation rhéologique des crèmes dermiques

#### 3.6.1. Test de contrainte seuil

Ce type de courbe (Figure 3.10) traduit un comportement typique d'un fluide plastique caractérisé par une contrainte seuil en dessous de laquelle l'écoulement n'est pas possible. Ceci est dû à l'existence des forces internes à la structure qui s'opposent à l'écoulement. Lorsque la contrainte appliquée est supérieure à la contrainte seuil (35 Pa), une déformation est enregistrée.

Les crèmes obtenues lors des préparations sont des fluides non Newtoniens au comportement pseudo plastique.

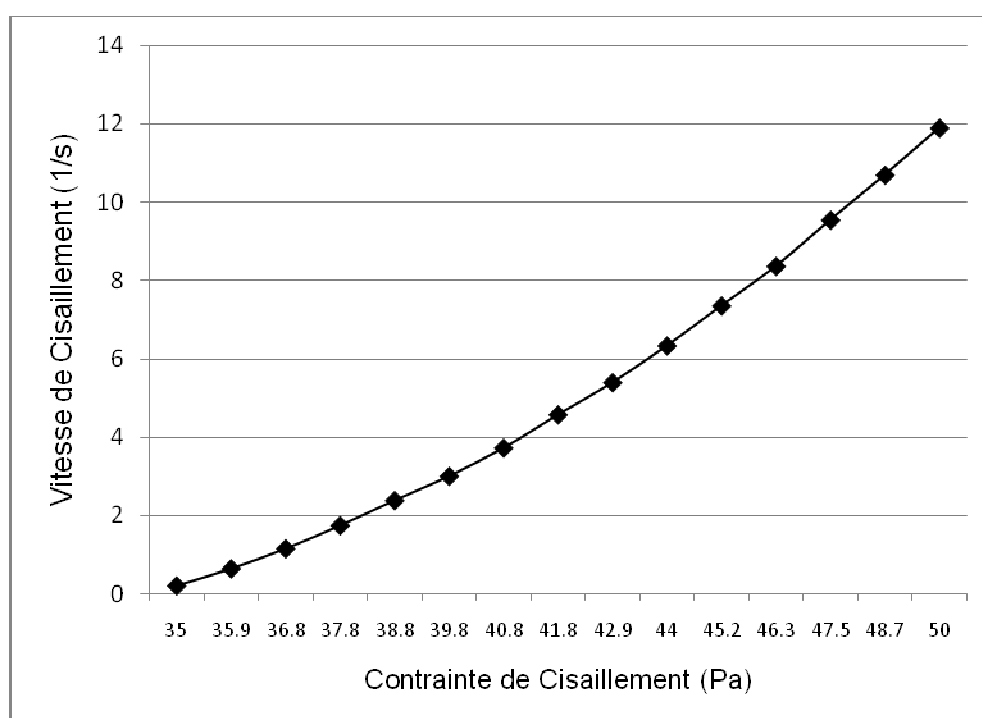


Figure 3.10 : Rhéogramme type donnant l'évolution de la vitesse de cisaillement en fonction de la contrainte de cisaillement pour un échantillon de crème à 20°C.

### 3.6.2. Étude de la thixotropie

La figure 3.11 présente un rhéogramme qui donne l'évolution de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement.

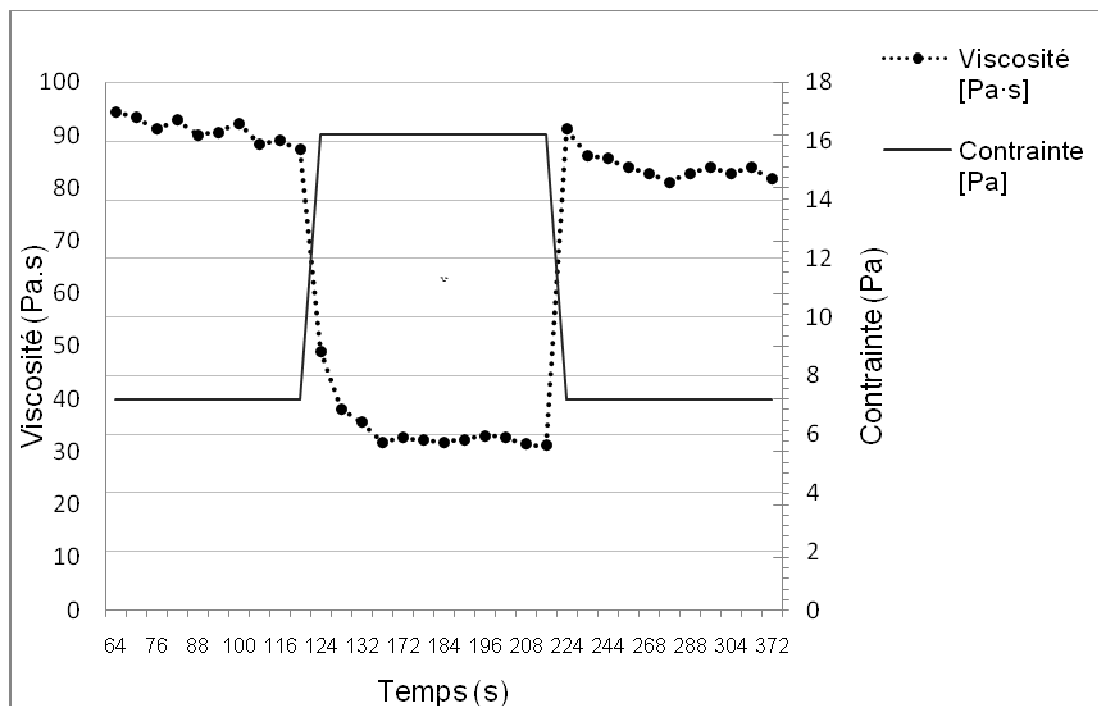


Figure 3.11: Évolution de la viscosité en fonction de la contrainte de cisaillement.

Le premier pallier correspond à une viscosité constante (contrainte de cisaillement= 40 Pa). Cette valeur chute librement en imposant une contrainte de 90 Pa. Elle se stabilise pour retrouver sa 1<sup>ère</sup> valeur avec un taux de 40 Pa et ce d'une façon quasi-instantanée.

A partir des courbes de relaxation, il en ressort que les crèmes obtenues sont des fluides thixotropes. C'est une propriété commune à ce type de produit à voir leur viscosité diminuée au cours de l'agitation et a retrouvé son état initial au repos.

### 3.6.3. Test d'écoulement à l'équilibre

La figure 3.12 présente le rhéogramme d'écoulement obtenu pour un échantillon de crème à 20°C. La courbe de la contrainte est de forme hyperbolique. La viscosité apparente de la crème diminue fortement jusqu'à atteindre des vitesses de cisaillement supérieures à 1000 s<sup>-1</sup>. Elle se stabilise pour les plus fortes valeurs ce qui met en évidence le comportement rhéofluidifiant des crèmes.

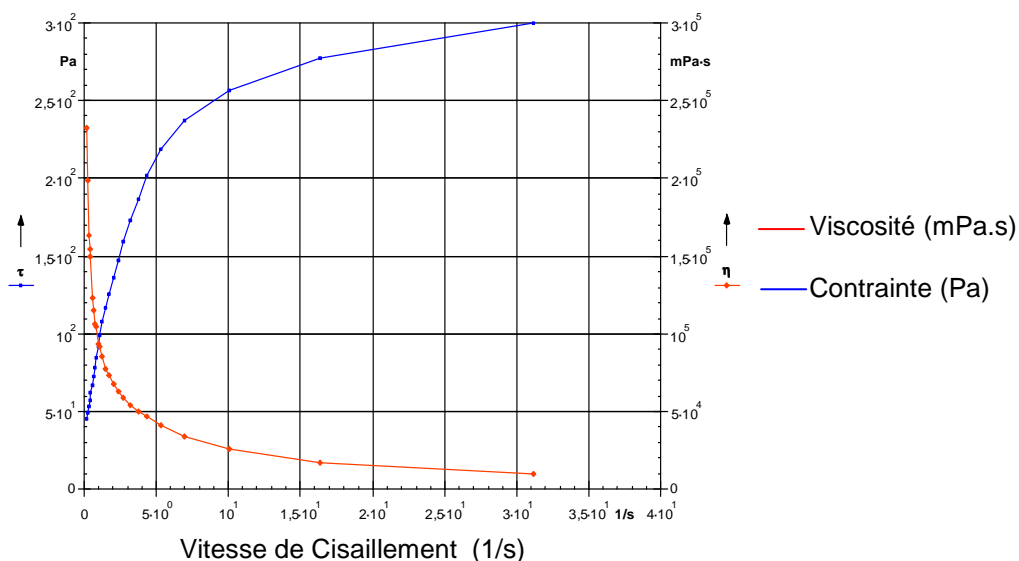


Figure 3.12: Évolution de la viscosité et de la contrainte avec la vitesse de cisaillement.

La thixotropie de nos préparations galéniques topiques est un caractère intéressant dans le cadre des applications dermiques. Elle est considérée par COUSSOT et al [113] et WAGINAIRE [114] comme un facteur favorable à leur bon étalement à la surface de la peau.

### 3.7. Contrôle de la qualité microbienne des crèmes dermiques obtenues

Nous colligeons dans le tableau 3.10 les résultats du contrôle de la qualité microbienne des crèmes dermiques.

Tableau 3.10 : Résultats du contrôle microbiologique des crèmes dermiques.

Germes recherchés	Normes (Ph.Eur)	Notre étude
	UFC/g	UFC/g
Germes mésophiles	<100	00
Entérobactéries	<10	00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	00
<i>Staphylococcus aureus</i>	00	00
<i>Escherichia coli</i>	00	00

Pour les germes aérobies viables totaux, aucune croissance bactérienne ou fongique n'a été décelée au bout de 5 jours d'incubation des géloses TSA et Sabouraud.

Aussi et pour ce qui est des germes spécifiques, aucune croissance microbienne n'a été constatée.

L'analyse microbiologique a révélé un taux de contamination bactérienne et fongique nulle et a permis aussi de montrer l'absence totale de germes pathogènes.

Au vu des normes en vigueur (Ph.Eur), les lots des crèmes analysés sont exempts de toutes contaminations microbiennes. Ils sont ainsi déclarés conformes.

La protection microbiologique des crèmes est obtenue en utilisant des conservateurs adaptés (Kathon CGi et/ou HE) à la formulation.

### 3.8. Contrôle de la qualité microbienne de l'hydrolat

Sur les cinq échantillons analysés, quatre répondent aux exigences de la Ph.Eur. Un seul échantillon accusait une charge de germes trop élevée. Une contamination microbienne et fongique a été décelée. La répétition de l'essai sur de nouveaux prélèvements ne confirme pas ce résultat.

De ce fait, ce résultat supérieur à la norme pour un seul échantillon nous fait suspecter un problème de contamination externe liée probablement à un défaut d'asepsie. Il est donc important non seulement de s'assurer que les prélèvements sont conformes, mais aussi de suivre au cours du temps les valeurs de contamination.

La préparation en officine des compositions à usage topique ne pose guère de problèmes grâce à la présence d'un conservateur approprié.

Dans la pratique de galénique, cela signifie que le danger de prolifération microbienne est présent. Cet incident est en corrélation avec les facteurs de risque, en l'occurrence, la présence simultanée d'eau ou d'humidité, de chaleur et la manipulation humaine. [115][116]

### 3.9. Essais pharmaco toxicologiques

#### 3.9.1. Détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée (IPC) de l'HE

Les valeurs numériques de cotation des lésions érythémateuses et œdémateuses ont permis de déterminer l'IPC de l'HE. Cliniquement, il n'y a pas de fissures sauf pour un seul flanc où une légère rougeur transitoire a été observée.

Dans ces conditions, l'HE a présenté un IPC de 0,04. Ce produit est considéré comme non irritant pour la peau selon le barème de classification. Néanmoins, un effet contraire a été observé et rapporté lors des tests épicutanés (patch test). [112]

#### 3.9.2. Tolérance locale après applications cutanées itératives

Cliniquement, aucun signe de toxicité locale ou systémique n'a été noté chez les lapins traités par la crème. Au terme de la période de traitement, aucunes lésions ou perturbation dans la repousse des poils n'ont été observées.

Ainsi, la crème dermique s'est révélée relativement bien tolérée chez le lapin après des applications cutanées itératives durant 28 jours.

Cependant, nous avons noté une irritation cutanée très discrète mais passagère, après 5 à 6 applications. Elle disparaît au 8<sup>ème</sup> jour de l'application.

Au cours de ce test, les rougeurs apparues provisoirement peuvent trouver une explication dans le pouvoir allergène du conservateur, des tensioactifs ou encore de l'HE incorporés dans la crème. [112]

L'HE contient plusieurs allergènes et notamment les principaux sensibilisateurs et des dérivés du géraniol et du linalool. De l'avis de certains auteurs [117][118], elles peuvent donc provoquer des dermatites de contact.

#### 3.9.3. Évaluation de l'activité cicatrisante *in vivo* de la crème dermique

Les résultats obtenus après application journalière des 3 préparations topiques utilisées, (Madécassol, Placebo et Crème dermique à base d'HE-HA), sont reportés dans la figure 3.13. Elle fait apparaître l'évolution de la cicatrisation des plaies pendant 2 semaines chez les lapins Albinos.

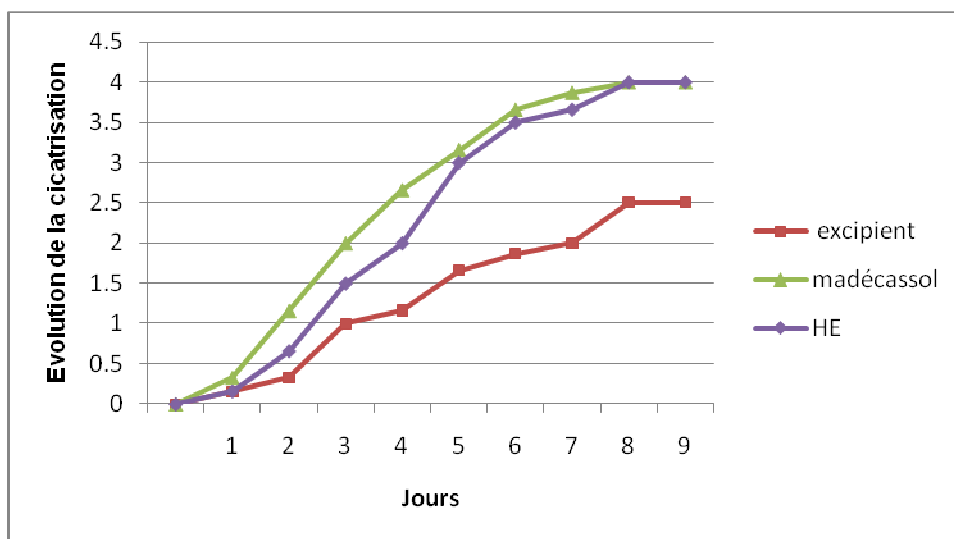


Figure 3.13: Évolution de la cicatrisation des plaies chez les lapins avec 3 crèmes dermiques.

Nous avons constaté une réduction totale de la surface initiale de la plaie chez le 1<sup>er</sup> et le 2<sup>ème</sup> lot. Avec le Placebo, la cicatrisation n'est que partielle.

L'observation macroscopique de l'évolution des plaies permet de constater une action très nette de l'association HE-HA sur la vitesse et la qualité de la cicatrisation superficielle.

Après 24 heures, les parois des plaies ont adhéré alors que les expérimentations témoins ne manifestent une adhérence totale que 5 jours après.

La cicatrisation est progressive aussi bien en ce qui concerne le Madécassol<sup>®</sup> que la crème dermique avec PA. Entre le 2<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour, avec le Madécassol<sup>®</sup>, nous observons une meilleure cicatrisation en comparaison avec la crème dermique. Dans la phase tardive de reconstitution de l'épiderme, les cinétiques sont comparables.

Il a été observé aussi que les principales utilisations dermatologiques pour l'HE de géranium concernent le traitement du vieillissement et la réparation cutanée [3]. Elles comprennent également l'usage dans les cas de dermatite atopique (eczéma), de mycose cutanée, de dermite séborrhéique, d'acné et pour la cicatrisation des plaies. [3][25][32]



Ces expérimentations confirment le rôle spécifique de la fraction aromatique sur la régénération du tissu cutané. Ces nouvelles propriétés pharmacologiques permettent de faire des HE d'authentiques médicaments. [119][120]

Autre élément souvent négligé, mais d'une cruciale importance, est celui de la pénétration cutanée de l'HE. Celle-ci est tributaire de la pilosité. Chez l'homme, la voie transépidermique est prépondérante, tandis que chez les animaux, la voie transfolliculaire serait la plus importante. [66]

Au demeurant, le mécanisme d'action de l'HE de géranium rosat n'est pas totalement élucidé.

Dans tous les cas, les essais de tolérance locale après application répétée doivent être particulièrement soignés. Des contrôles histologiques et des recherches sur la possibilité de sensibilisation doivent être envisagés.

#### 3.9.4. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle

Les résultats de cette activité sont consignés dans le tableau 3.11. Ce dernier montre les variations individuelles de diminution de l'œdème provoqué pour les 3 essais effectués (HE, Piroxicam et eau physiologique).

Tableau 3.11 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle.

Lots (n=5)		Pattes postérieures des souris	Volume (mm) (Moyenne ± ET)	
Témoin (eau physiologique + levure de bière)		Patte gauche	3.22 ± 0.22803	≠ significative
		Patte droite	2.52 ± 0.13038	
Essai 1 (Piroxicam + Levure de bière)		Patte gauche	2.62 ± 0.08366	≠ non significative
		Patte droite	2.58 ± 0.10954	
Essai 2 (Huile essentielle 2,5% + levure de bière)		Patte gauche	2.67 ± 0.09574	≠ non significative
		Patte droite	2.50 ± 0.07071	
Pourcentage Augmentation œdème des pattes Gauches/Droites	Lot Témoin		27.77778 %	
	Essai 1		01.55038 %	
	Essai 2		07,00 %	
Pourcentage Réduction œdème chez les souris traitées/Témoin	Souris traitées par Piroxicam		94.4186 %	
	Souris traitées par Huile Essentielle		74.80 %	

Chaque lot de souris a été préalablement traité avec une injection IP de l'HE, du Piroxicam ou de l'eau physiologique. Après ½ heures, les souris des 3 lots subissent une injection de la levure de bière dans la patte postérieure gauche. Une réaction immédiate et persistante a été contactée. Elle consiste en l'apparition d'un œdème d'intensité variable selon les 3 lots. Le témoin est traité avec de l'eau physiologique. C'est le lot qui a présenté le pourcentage d'œdème le plus élevé en comparaison avec les 2 autres lots.

Ainsi, et après 24 heures du début de l'application du traitement, nous observons que l'HE, à 2,5 %, induit une réduction de l'œdème de 74,8 %. Ce taux est légèrement inférieur à celui du traitement au Piroxicam (produit de référence). Ce dernier a induit une réduction quasi-totale de l'œdème. Cependant, la différence du volume moyen des pattes gauches des 2 essais (HE et Piroxicam) n'est pas significative (test ANOVA) (Appendice H). L'HE présente un effet anti-inflammatoire identique à celui du Piroxicam.

Selon MARUYAMA et al [121], l'injection par voie IP de 0,5 microlitre d'HE provoque une réduction de l'œdème des pâtes postérieures des souris. En outre, une administration réitérée d'HE permet d'enrayer l'aggravation de l'arthrite et le retour à une morphologie articulaire normale.

Sur le plan cellulaire, cette activité curative est liée à la suppression de l'adhérence de la réponse des neutrophiles *in vitro* et la diminution de leur recrutement dans la cavité péritonéale. Aussi, l'application cutanée et IP suppriment l'inflammation cellulaire et l'accumulation des neutrophiles dans ces sites. [121]

Dans notre étude, l'activité anti-inflammatoire locale de la crème n'a pu être évaluée pour des considérations techniques (non disponibilité du réactif : huile de croton).

Compte tenu de son activité et de sa faible toxicité, la combinaison HE-HA présente donc un réel intérêt thérapeutique.

## CONCLUSION

La recherche de nouvelles plantes aromatiques à caractère thérapeutique a surtout servi à montrer le bien fondé de leurs utilisations par les tradipraticiens. Elle a démontré aussi que notre pays recèle une biomasse végétale riche et variée. Celle-ci constitue une source incommensurable pour l'élaboration et la mise au point de nouvelles molécules actives à visé thérapeutique.

Notre travail avait pour but de mieux connaître le géranium rosat – issu d'une culture biologique - à travers l'étude de sa fraction aromatique (HE-HA). Nous avons pu évaluer et vérifier certaines de ses propriétés biologiques et mettre en exergue ses potentialités pharmacologiques.

De part son profil chromatographique (Chémotype Citronellol et cv Chine), l'huile essentielle extraite par hydrodistillation possède des propriétés organoleptiques très appréciées en parfumerie.

L'autre objectif était l'étude de la composition et des propriétés d'un produit secondaire de l'hydrodistillation, l'hydrolat. Sa composition chimique est en effet bien différente de celle de l'HE ce qui suppose des activités biologiques différentes.

Outre ses potentialités antimicrobiennes vérifiées sur des germes standardisés en milieu gélosé et en phase vapeur, la fraction aromatique possède une action anti-inflammatoire indéniable. De ce fait, elle pourra être proposée, éventuellement, comme un actif de choix dans le traitement local des inflammations. Cette fraction a été incorporée dans une préparation galénique topique (crème hydrophile) afin d'y subir une série de tests rhéologique, physico-chimique et microbiologique qui se sont révélés concluants.

Du point de vue pharmaco-toxicologique, Il a été trouvé que ces crèmes dermiques présentent à un degré élevé, la triple activité antibactérienne, anti-inflammatoire et cicatrisante. Parallèlement, elles se distinguent par une excellente tolérance cutanée et une absence totale de toxicité. Elles apparaissent dans ce contexte comme une solution naturelle et efficace pour faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique (dermopharmacie). Leur champ d'action peut s'étendre vers la clinique où elles seront indiquées dans les "problèmes de peau" directement liés aux plaies, inflammations et autres infections microbiennes.

En plus de cet apport thérapeutique, le gain économique ne serait pas négligeable. Il s'agit de valoriser le patrimoine végétal de notre pays et promouvoir la culture et la transformation des plantes aromatiques et médicinales à même de servir encore de tremplin pour la recherche scientifique.

S'agissant de la valorisation de la fraction aromatique de la plante, les résultats atteints marquent une étape importante surtout au niveau de l'association HE-HA. Cela contribue à concrétiser la politique nationale en matière de valorisation de la biomasse végétale et son intégration dans les services de santé. Tout n'est certes pas terminé dans ce secteur ; il reste notamment l'amélioration nette des méthodes et des conditions d'exercice de cet art, la prévention des intoxications pouvant en résulter et le respect scrupuleux des exigences hygiéniques.

Au niveau économique, cette étude a permis de valoriser cette plante à parfum et de trouver de nouvelles applications dans plusieurs secteurs de pointe comme la dermatopharmacie. Les résultats de cette recherche pourraient avoir, à moyen terme, une incidence sur le développement durable du pays.

En somme, les potentialités du géranium rosat étant à peine entrevues. Elles ouvrent d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir. C'est aux biotechnologies végétales que leurs incombe la mission de mener des études supplémentaires afin de compléter le développement phytopharmaceutique.

En perspective, il serait intéressant, lors des hydrodistillations, de récupérer l'hydrolat et d'analyser sa composition et son potentiel pharmacologique. N'ayant pas fait l'objet d'études scientifiques approfondies, ces eaux aromatiques constituent un créneau de recherche intéressant.

Finalement, l'objectif premier de cette étude a été atteint. Nous avons contribué, un tant soit peu, à la vulgarisation d'une branche thérapeutique (aromathérapie) via l'utilisation des extraits aromatiques des pélargoniums odorants. L'avenir dira l'impact de ces acquisitions récentes.

## REFERENCES

1. Bruneton J. « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». Éditions Tec & Doc, Paris 1999, éditions médicales internationales, pp: 483-560.
2. Lis-balchin M. « Geranium and pelargonium: the genera *Geranium* and *Pelargonium* ». CRC Press, Taylor & Francis, London, 2002, pp: 116-131, 147-165, 184-217.
3. Martini MC. « Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie ». Éditions Tec & Doc, Paris, 2006, pp : 33-55.
4. Belouad A. « Plantes médicinales d'Algérie ». Office des Publications Universitaires, Alger, 2001, pp : 5-10.
5. Heuze G. « Les plantes industrielles ». Librairie de L. Hachette et Cie, 1859, Paris, pp : 282-285.
6. Anton R, Iobstein A. « Plantes aromatiques : Épices, aromates, condiments et huiles essentielles ». Tec & Doc, Paris, 2005, 522p.
7. Belaiche P. « L'aromatogramme : Traité de phytothérapie et d'aromathérapie ». M.S. A. Éditeur. Paris 1979, Tome 1, pp : 200-204.
8. Baudoux D. « L'aromathérapie, se soigner par les huiles essentielles ». Douce Alternative, 2000 ; Biarritz (France), pp : 6-29, 221.
9. Afnor. « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 2000, 661-663.
10. Zhiri A, Baudoux D. « Huiles essentielles chémotypées et leurs synergies ». Edition Inspir Development, Luxembourg 2005, pp: 8-43
11. Salle JL. « Le totum en phytothérapie : Approche de phytobiothérapie ». Edition Frison-Roche, Paris 1991, pp : 12-35
12. Deysson G. « Organisation et classification des plantes vasculaires ». Ed. SEDES et CDVI, Paris 1978, Tome II, 381 p.
13. Boullard B. « Plantes & Champignons ». Éditions Estem, Paris 1997, 455 p.

14. Padrini F, Iucheroni MT. « Le grand livre des huiles essentielles ». Edition de Vecchi SA, Paris 2003, 65 p.
15. Guignard JL, Cosson L, Henry L. « Abrégé de phytochimie ». Masson, Paris 1985, 224 p.
16. Franchomme P, Penoël D. « L'aromathérapie exactement ». Ed Roger Jollois, Limoges (France), 1990, 446p
17. Grosmond G. « Aromathérapie ». Bulletin des GTV 2001, hors série et élevage agriculture biologique, pp : 143-146.
18. Clarke S, Tisserand R. « Essential chemistry for safe aromatherapy ». Elsevier Health Science, London 2002, pp: 130-131.
19. Afnor. « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse ». AFNOR, Paris, 2000, 440 p.
20. Garnéro J. « Huiles essentielles ». K 345. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physico-chimiques, vol. K3 (1996).
21. Scimeca D, Tetau M. « Votre santé par les huiles essentielles ». Alpen Editions s.a.m. Paris 2005, 45p.
22. Lis-balchin M. « Aromatherapy science: A guide for healthcare professionals ». Pharmaceutical Press, London 2005, pp : 195-201
23. Steflitsch W, Steflitsch M. « Clinical aromatherapy ». JMH, Vol. 5, No. 1, March 2008, pp: 74-85.
24. Lardry JM, Haberkorn V. « L'aromathérapie et les huiles essentielles ». Kinesither Rev 2007;(61):14-7.
25. Duraffourd C, Lapraz JC. « Traité de phytothérapie clinique ». Elsevier Masson, Paris, 2002, pp : 115-138
26. Lamendin H. « Soignez votre bouche par les plantes : Remèdes d'hier et d'aujourd'hui ». L'Harmattan, Paris 2007, 46p.
27. Lamendin H, Toscano G, Requirand P. « Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires ». EMC-Dentisterie 1 (2004) 179–192.
28. De Billerbeck VG, Roques C, Vanier P, Marquier P. « Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles ». HYGIENES - 2002 - Vol X – n°3, pp : 248-251.

29. Roquebert MR. « Les contaminants biologiques des biens culturels ». Elsevier Masson, Paris, 2002, pp : 345-355.
30. Pibiri M-C. « Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles ». Thèse de doctorat ès sciences, école polytechnique fédérale de Lausanne (2005). pp : 19-55.
31. Martini MC, seiller M. « Actifs et additifs en cosmétologie ». Editions Tec & Doc, Paris, 1999, pp : 110-126.
32. Goetz P, busser C. « La phytocosmétologie thérapeutique ». Springer, Paris, 2007, 58p.
33. Wilson R. « Aromatherapy: Essential oils for vibrant health and beauty ». Avery éd, New York 2002, pp: 75-76.
34. Worwood VA. « Aromatherapy for the Beauty Therapist ». Cengage Learning EMEA, New York, 2001, pp: 30-35.
35. Aquino R. « Arômes méditerranéens pour la réalisation des lignes cosmétiques méditerranéenne ». Journal of Cosmetic Sciences 53 (Nov-déc.), 2002, pp: 321-335.
36. Lucchesi ME. « Extraction sans solvant assistée par micro-ondes : Conception et application à l'extraction des huiles essentielles ». Thèse de Doctorat en sciences (option : Chimie), Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, juillet 2005, pp : 15-21.
37. Hernandez ochoa LR. « Substitution de solvants et matières actives de synthèse par un combine (solvant/actif) d'origine végétale ». Thèse de doctorat en science des procédés, option sciences des agro ressources, l'INP de Toulouse, oct 2005, pp : 33-35.
38. Peyron L. « Aspect international du marché des plantes aromatiques et médicinales ». Actes Journée Réflexion Plantes Arom. Méd. Casablanca, 16 Nov. 2000, pp : 17-25.
39. Piochon M. « Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore Laurentienne : composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse ». Mémoire de maitrise (ressources renouvelables). Université du Québec à Chicoutimi, Aout 2008, p : 12-30.
40. Garreta R. « Des simples à l'essentiel: De l'herboristerie à l'aromathérapie, pratiques et représentations des plantes médicinales ». Presses Univ. du Mirail, Canada, 2007, pp : 312-320.
41. Seidemann J. « World spice plants: economic, usage, botany, taxonomy ». Springer, London, 2005, pp: 275-277.

42. Crouzet J. « Arômes alimentaires ». Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés. 2004.
43. Bosson L, dietz G. « L'hydrolathérapie : Thérapie des eaux florales ». Coll. Douce Alternative - Ed Amyris, Bruxelles, 2005, 3ème trimestre, pp : 3-20.
44. Rose J. « 375 essential oils and hydrosols ». Frog edition, New York, 1999, pp: 83-85.
45. Demarne FE. « Le géranium rosat ». Parfums, Cosmétiques et Arômes, n°62, 1985.
46. Judd WS, bouharmont J, campbell CS, évrard CM, kellogg EA, stevens P. « Botanique systématique : Une perspective phylogénétique ». Edition De Boeck Université, Bruxelles, 2002, pp : 240-488.
47. Demarne FE. « l'amélioration variétale de géranium rosat : contribution systémique, caryologique et biochimique, ORSAY (France) ; université de Paris-sud, 1989, 250; p180.
48. Fuinel G. « Arbres et plantes médicinales du jardin ». Fernand Lanore, Paris, 2002, 72 p.
49. Anonyme. [www.flickrv.com](http://www.flickrv.com)
50. Vidalie H. « Les productions florales ». Edition techniques et documentations, Paris, 1998, p : 252-254.
51. Peter knovel KV. « Handbook of herbs and species ». Woodhead Publishing, Cambridge England, 2004, pp: 162-178.
52. Demarne FE. « La sélection des Pelargonium à parfum ». J.I.H.E, Digne, 1986.
53. Skaria BP. « Aromatic plants ». New India publishing, New Delhi 2007, pp: 88-95.
54. Quezel R, santa S. « Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques Méridionales » Tome II, Edition Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 1963, 977p.
55. Baba aissa F. « Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident) », Edition EDAS-Librairie Modernes- Rouiba (Algérie), 2000, p. 45.
56. Gilly G. « Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse ». L'Harmattan, Paris 1997, pp : 11-19.
57. Benini C. « Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores ». Mémoire d'ingénieur en Biologie (Orientation : Horticulture), Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux (Belgique), 2007, p: 41-75.



58. Nyabyenda P. « Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique ». Presses Agronomiques de Gembloux, Bruxelles, 2006, 120p.
59. Halpern GM, P weverka. « The healing trail: Essential oils of Madagascar ». Basic Health Publications, Antananarivo, 2006, pp : 59-64.
60. Bezanger-beauquesne L, pinkas M, torck M, trotin F. « Plantes médicinales des régions tempérées ». Maloine SA Editeurs, Paris 1980, pp : 153-154.
61. Pitman V. « Aromatherapy: A practical approach ». Nelson Thomas éd, New York 2004, pp: 236-238.
62. Demarne FE. « influence du mode de récolte sur la distillation du géranium rosat ». Agronomie tropicale (France) 1992; vol.46; n°2; p1 61-165.
63. Charabot. « La Culture du Géranium Rosat ». Journal d'Agriculture Tropicale. Vol. 13:289. Paris, 1913.
64. Michellon R, rakotondralambo P. « le géranium rosat, fiches techniques ». Projet d'appui à la filière d'huiles essentielles. Antananarivo, Madagascar, cirad-ca, 1998, 96p.
65. Azoug M. « Analyse par CG-SM des géraniums poussant en Algérie ». Mémoire de magister en Chimie, USTHB, Alger, 1997, p : 10-30.
66. Le hir A, cohen Y. « Pharmacie galénique: bonnes pratiques de fabrication des médicaments ». Elsevier Masson, Paris, 2001, pp : 86-110.
67. Guery J. « Émulsions doubles cristallisables : stabilité, encapsulation et relargage ». Thèse doctorale de Physique et Chimie des Matériaux, Université Paris VI (France), Nov 2006, pp : 22-25.
68. Harlay A, huard A, ridoux L, rolland A. « Guide du préparateur en pharmacie ». Edition Elsevier Masson, Paris, 2004, pp 1179.
69. Fonteneau JM, klusiewicz P. « Travaux pratiques de préparation et de conditionnement des médicaments ». Groupe Liaisons, Bruxelles, 2008, pp : 29-66.
70. Brochette P. « Émulsification ». Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés, 2006.
71. Anonyme. « Pharmacopée européenne ». 4<sup>ème</sup> édition, Strasbourg; 2002.
72. Wehler P. « Pharmacie galénique : formulation et technologie pharmaceutique ». Edition Maloine, Paris, 2007, pp : 107-129, 190-207.

73. Clevenger JF. « Apparatus for volatile oil determination, Description of New Type ». American Perfumer & Essential Oil Review, 1928, pp : 467-503.
74. Prat R. « Expérimentation en biologie et physiologie végétales : 300 manipulations ». Edition QUAE, Herman éditeurs, Paris 2007, 56 p.
75. De maack F, sablier M. « Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse ». [P 2 614], Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation (1997).
76. Benjilali B, tantaoui-elarki A, ismaili-alaoui M. « Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé ». Plant. Méd. Phytothér. 1986; 20, pp: 155-167.
77. Satrani B, fougrach H, bourkhiss B, bousta D, TALBI M. « Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus* ». Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 2007, 146, pp : 85-96.
78. Lis-balchin M, deans SG, eaglesham E. « Relationship between the bioactivity and chemical composition of commercial plant essential oils ». Flav. Fragr. J. 1998, 13: 98–104.
79. Rowe raymond C, sheskey PJ, owen S. « Handbook of Pharmaceutical Excipients: Fifth Edition ». Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2006, London, UK, pp: 15-29.
80. Pourrat A. « Étude de la cicatrisation des plaies chez le lapin et le rat ». J. Pharm. Belg, 1993.
81. Winter CA, risley EA, nuss GW. « Carrageenin induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs ». Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 1962. 1: 1: S44-547.
82. Maruyama N, ishibashi H, hu W, morofuji S, inouye S, yamaguchi H, abe S. « Suppression of Carrageenan and Collagen II-Induced Inflammation in Mice by Geranium Oil ». Mediators of Inflammation, Vol 2006, ID 62537, P: 1-7.
83. Ndiaye M, dieye A-M, mariko F, tall A, sall diallo A, faye B. « Contribution a l'étude de l'activité anti-inflammatoire de *Moringa oleifera* (Moringaceae) ». Dakméd 2002, 47, 2p.
84. Prescott LM, harley JP, klein DA, dusart J. « Microbiologie ». De Boeck Université, Bruxelles, 2003, pp : 11-25.
85. Rajeswara rao BR. « Biomass yield, essential oil yield and essential oil composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* species) as influenced by row spacings and intercropping with cornmint (*Mentha arvensis* L.f.) ». Industrial Crops and Products 16 (2002) 133-144.

86. Ram M, ram D, roy SK. « Influence of an organic mulching on fertilizer nitrogen use efficiency and herb and essential oil yields in geranium (*Pelargonium graveolens*) ». *Bioresource Technology* 87 (2003) 273-278.
87. Saxenaa G, rahmanb L, vermac PC, banerjeed S, kumare S. « Field performance of somaclones of rose scented geranium (*Pelargonium graveolens*) for evaluation of their essential oil yield and composition ». *Industrial crops and products* 27 (2008) 86-90
88. Shawl AS, kumar T, chishti N, shabir S. « Cultivation of rose-scented geranium as a cash crop in Kashmir valley ». *Asian Journal of Plant Sciences* 5 (4): 673-675, 2006.
89. Gomes PB, mata VG, rodrigues AE. « Characterization of Portuguese grown geranium oil (*Pelargonium* sp.) ». *J. Essent. Oil Res.* 16 (2004) 490-495.
90. Rodolfo J, koroch A, simon J, hitimana N. « Quality of geranium oils: case studies in southern and eastern Africa ». *Journal of essential oil research (JEOR)*, Sept 2006, 12p.
91. Lalli JY. « In vitro pharmacological properties and composition of leaf essential oils and extracts of selected indigenous *Pelargonium* species ». Thesis master of pharmacy, Faculty of Health Sciences, Witwatersrand University, Johannesburg, South Africa, 2005, 51p.
92. Mosta NM. « Essential oil yield and composition of rose-scented geranium (*Pelargonium* sp) as influenced by harvesting frequency and plant shoot age ». Thesis of doctorat MSC Agronomy, faculty of agricultural sciences, university of Pretoria, South Africa, Oct 2006.
93. Rajeswara rao BR, kaul PN, syamasundar KV, ramesh S. « Water soluble fractions of rose-scented geranium essential oil ». *Bioresource Technology* 84 (2002) 243-246.
94. Paolini J, leandri C, desjobert JM, barboni T, costa J. « Comparison of liquid-liquid extraction with headspace methods for the characterization of volatile fractions of commercial hydrolats from typically Mediterranean species ». *Journal of Chromatography A*, 1193 (2008) 37-49.
95. Sagdic O, ozcan M. « Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols ». *Food Control* 14 (2003) 141-143.
96. Djebili K, hadjougga G : Extraction, caractérisation et étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de géranium rosat et de santoline. Mémoire de fin d'études, Département de biologie, université de Blida, 2006, pp : 15-55.
97. Soundouss C. « Les essences de Géranium : Influences pédoclimatique et saisonnière sur les essences Marocaines : Classification par les méthodes d'analyse de données ». Thèse de doctorat en Sciences, Université Aix en Provence, Marseille, 1998, 3p. (n°: 98 AIX3 0076).

98. Chabanne A, boyer J, michellon R, seguy L. « Impacts des couvertures végétales sur la production de *Pelargonium x Asperum* et sur la biologie du sol (macrofaune) à l'île de La Réunion ». World Congress on Conservation Agriculture Madrid, 1-5 October, 2001. 35p.
99. Gomes PB, mata VG, rodrigues AE. « Production of rose geranium oil using supercritical fluid extraction ». J. of Supercritical Fluids 41 (2007) 50–60.
100. Sperenza A, calzoni GL. « Atlas de la structure des plantes : Guide de l'anatomie microscopique des plantes vasculaires en 285 photos". Edition Belin 2005, Paris (France), pp: 57-62.
101. Kanko C, sawaliho BE, kone S, koukoua G, n'guessan YT. « Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon giganteus* ». Comptes rendus Chimie 7 (2004) 1039–1042.
102. Koba K, sanda K, raynaud C, mandin D, millet J, chaumont JP. « Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* L, *C. nardus* L et *C. schoenanthus* ». Journal de Mycologie Médicale, Vol 13, N°4 - décembre 2003, pp : 175-180.
103. Arpino P. « Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse ». Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation (2008).
104. Sablier M. « Couplage CG/SM/SM ». Techniques de l'Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation (2000).
105. Heravi MJ, zekavat B, sereshti H. « Characterization of essential oil components of Iranian geranium oil using gas chromatography–mass spectrometry combined with chemometric resolution techniques ». J. Chromatography A, 1114 (2006) 154-163.
106. Burt S. « Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review ». International Journal of Food Microbiology 94 (2004) 223-253.
107. Schelz ZA, molnar JA, hohmann J. « Antimicrobial and antiplasmodial activities of essential oils ». Fitoterapia 77 (2006) 279–285.
108. Prabuseenivasan S, jayakumar M, ignacimuthu S. « In vitro antibacterial activity of some plant essential oils ». BMC Complementary and Alternative Medicine 2006, 6:39.
109. Dorman HJD, deans SG. « Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils ». J. Appl. Microbiol., 2000, 88, 308-316.
110. Lis-balchin M, deans SG. « Antimicrobial effects of hydrophylic extracts of *Pelargonium* species (Geraniaceae) ». Lett. Appl. Microbiol. 1996, 23: 205-7.

111. Pons-guiraudm A, frickm C, goldsteinmm N, sabouraud D. « Allergie et cosmétiques ». Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique 44 (2004) 682-685.
112. Goossens A, lepoittevin JP. « Allergie de contact aux cosmétiques et aux composants de parfums : aspects cliniques, chimiques et diagnostiques nouveaux ». Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, Vol 43, n°5, sept 2003, pp : 294-300.
113. Coussot P, grossiord JL. « Comprendre la rhéologie : de la circulation du sang à la prise du béton ». EDP Sciences Editions, Paris, 2002, pp : 191-195.
114. Waginaire L. « Analyse rhéologie et évaluation sensorielle ». Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 4, Numéro 4, -4, Juillet - Août 1997, 281p.
115. Pasquier O, mazaud P, garreau S, legendre C, sauvageon A. « Mise en place du contrôle de la qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques non obligatoirement stériles : Essais sur quelques préparations ». Lyon pharmaceutique 1999, 50, 2p.
116. Beutler M, kropf A, steiner S. « Production et stockage d'eau purifiée a l'officine : Recommandations de la Commission des médicaments des pharmaciens suisses AKA ». Journal suisse de pharmacie, 14/2003, 506p.
117. Geraut C, tripodì D. « Dermatoses professionnelles et aldéhydes ». Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique 47 (2007) 144-149.
118. Lalko J, api AM. « Investigation of the dermal sensitization potential of various essential oils in the local lymph node assay ». Food and Chemical Toxicology 44 (2006) 739-746.
119. Lis-balchin M, hart S, deans SG, eaglesham E. « Potential agrochemical and medicinal usage of essential oils of Pelargonium sp ». Herbs, Spices Med. Plants, 1995, 3: 11-22.
120. Voinchet V, giraud-robert AM. « Utilisation de l'huile essentielle d'hélichryse italienne et de l'huile végétale de rose musquée après intervention de chirurgie plastique réparatrice et esthétique ». Phytothérapie (2007) Numéro 2: 67-72.
121. Maruyama N, sekimoto Y, ishibashi H, inouye S, oshima H, abe S. « Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil ». Journal of Inflammation, 2005, 2:1.

## APPENDICE A

### ► Liste des abréviations, symboles et conventions :

AFNOR	Association française de normalisation
ATCC	American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes)
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
C/G	Rapport Citronellol/Géranol
cm	Centimètre
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CG/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse
$\tau$	Contrainte de cisaillement
$\gamma$	Déformation de cisaillement
°C	Degrés Celsius
g	Gramme
EtOH	Éthanol
ha	Hectare
HA	Hydrolat
HE	Huile essentielle
HD	Hydrodistillation
IA	Indice d'acide
IE	Indice d'ester
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
IP	Intra péritonéale
IR	Indice de réfraction
Kg	Kilogramme
L/H	Lipophile/Hydrophile
ml	Millilitre
mm	Millimètre
MeOH	Méthanol
m/z	Rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires d'ions ( <i>MS</i> )
PA	Principe actif
Pa	Pascal
PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales
pH	Potentiel d'Hydrogène
Ph.Eur	Pharmacopée Européenne
ppm	Unité de $\delta$ (Parties Par Million, <i>Parts per Million = 10<sup>-6</sup>, NMR</i> )
Qsp	Quantité suffisante pour
s	Seconde
$\eta$	Viscosité dynamique

## APPENDICE B

### ► Appareillage, verrerie et consommables

#### **B1. Liste des appareillages :**

- Balance de précision (SCALTEC SBC 31)
- Plaque chauffante
- Chauffe ballon
- Bain marie
- Évaporateur rotatif (Stuart RE300)
- Autoclave
- Etuve bactériologique (25°C, 35°C, 42°C)
- Loupe binoculaire avec caméra
- Microscope photonique avec caméra
- Centrifugeuse de paillasse
- Chromatographe en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (Network GC System, 6890N, Agilent Technologies ; Mass Selective Detector)
- Hydrodistillateur type Clevenger
- pH-mètre
- Rampe de filtration à 6 postes (Sartorius ; type SM 16824)
- Réfractomètre d'Abbe de précision 3T (Références 94110)

#### **B2. Liste de la verrerie et consommables**

- Bêchers : 100 ml, 250 ml, 500 ml
- Erlenmeyer 100 ml, 250 ml
- Ballon à fond plat à col rodé
- Ampoules à décanter
- Tubes à essai
- Pipettes graduées stériles
- Burette 20 ml
- Pincés
- Anse de platine
- Lames en verre et lamelles
- Écouvillons Stériles
- Boîtes de pétri stériles de 90 mm de diamètre
- Disques d'antibiogramme Stériles de 0,9cm de diamètre (Sensi-Disc™)
- Spatule inox
- Pipettes Pasteurs
- Lames de rasoir
- Papier filtre WHATMAN
- Seringues (1ml, 5 ml)
- Bec bunsen
- Compte-gouttes

## APPENDICE C

### ► Milieux de culture utilisés :

- Tampon DNP, flacon de 90 ml
- Gélose Trypto-Caséine-Soja précoulée
- Gélose Sabouraud + Chloramphénicol précoulée
- Eau peptonée tamponnée, flacon de 100 ml
- Bouillon lactosé simple concentration, flacon de 100 ml
- Bouillon d'enrichissement Entérobactéries selon Mossel
- Milieu VRBL glucosé précoulé
- Bouillon Trypto-Caséine-Soja, flacon de 100 ml
- Milieu Cétrimide (coulé en boîte de Pétri)
- Milieu Chapman (coulé en boîte de Pétri)
- Bouillon Trypto-Caséine-Soja, tube de 10 ml
- Bouillon diluant Tryptone sel, tube de 9 ml
- Eau physiologique

### ► Liste des solutions et réactifs utilisés :

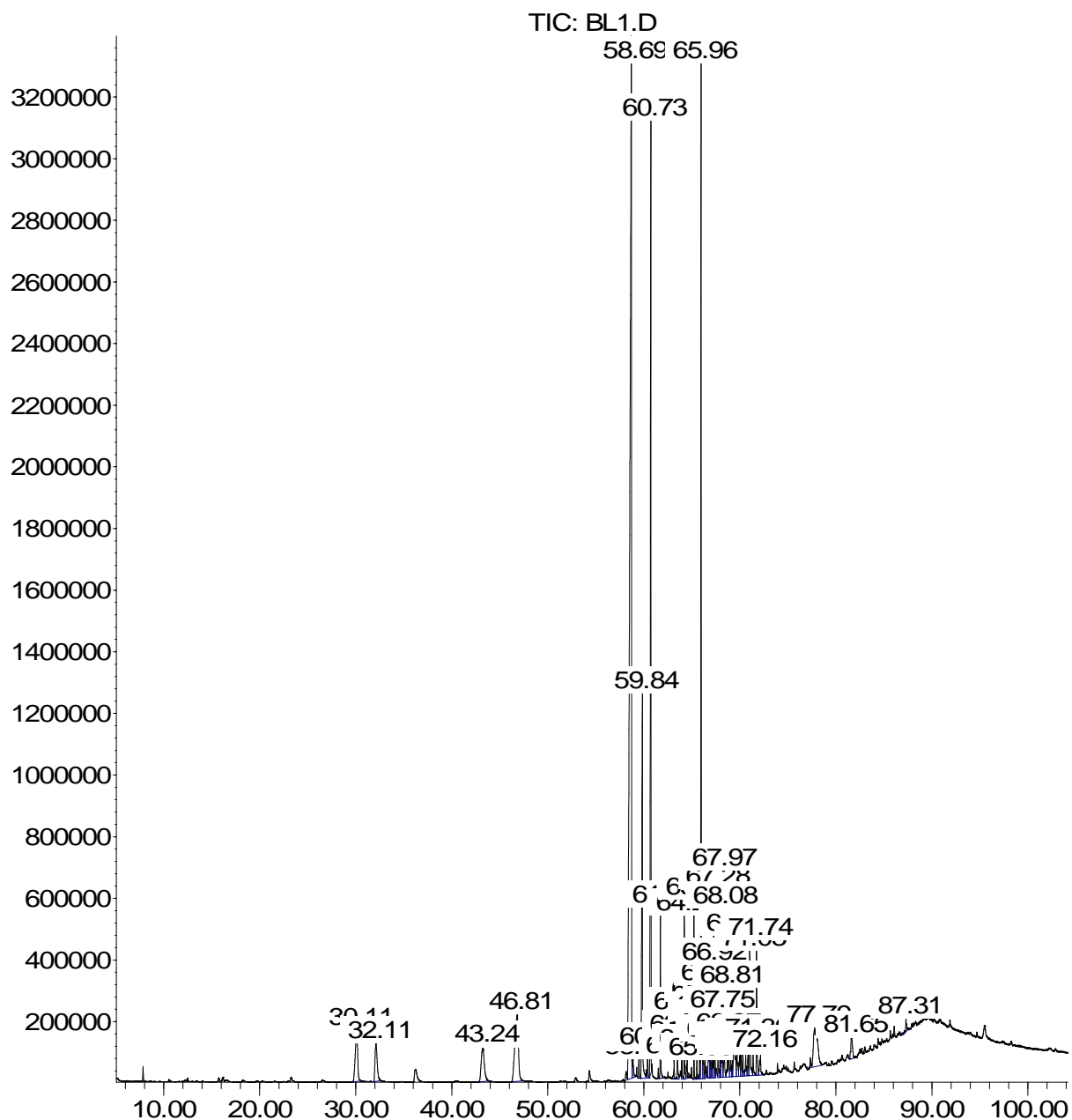
- Éther diéthylique
- Sulfate de magnésium
- Eau distillée
- Ethanol 95° et 70°
- Hydroxyde de potassium (KOH) : 0,02 mol/l et 0,5 mol/l
- Acide chlorhydrique (HCl) : 0,5 mol/l
- Myristate d'isopropyle
- Rouge de phénol : 0,4 g/l
- Eau distillée
- Eau pour préparation injectable (EPPI)



## APPENDICE D

Profil chromatographique (CG-SM) de l'huile essentielle de géranium rosat  
(*Pelargonium graveolens* (L.))

Abundance

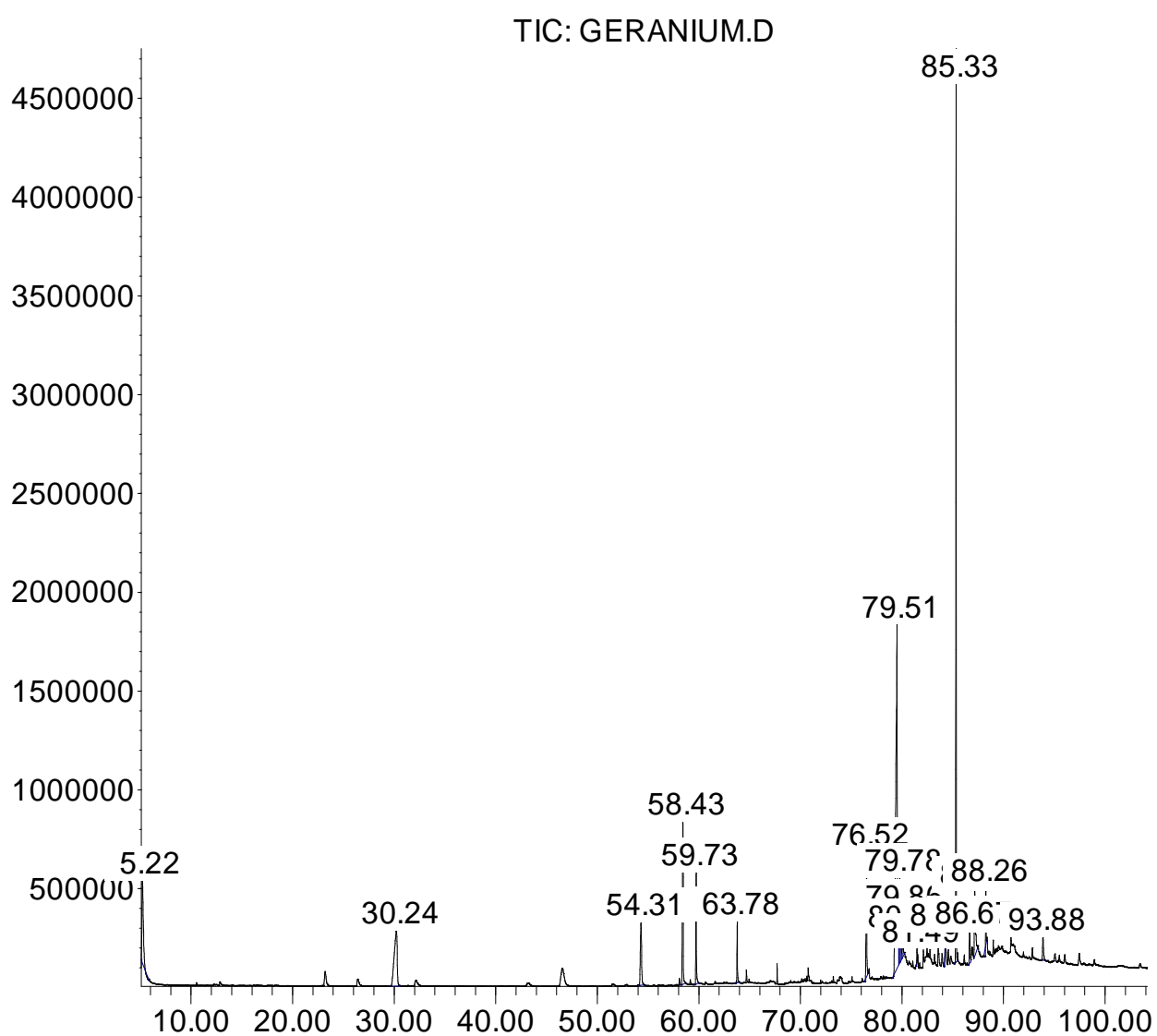


Time--&gt;

## APPENDICE E

Profil chromatographique (CG-SM) de l'eau aromatique de géranium rosat  
(*Pelargonium graveolens* (L.))

Abundance



Time--&gt;

## APPENDICE F

Photos de quelques appareils et tests biologiques :



Appareil CG-SM



Évaporateur rotatif



Rhéomètre MC1 et Thermostat



Rampe de filtration à 6 postes



Lapins Albinos (souche néozélandaise)



Application de la crème dermique



Plaies cicatrisées (crème HE-HA)



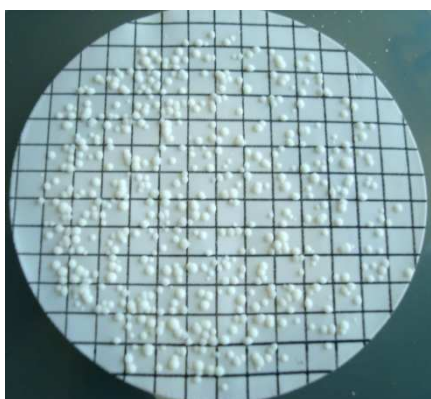
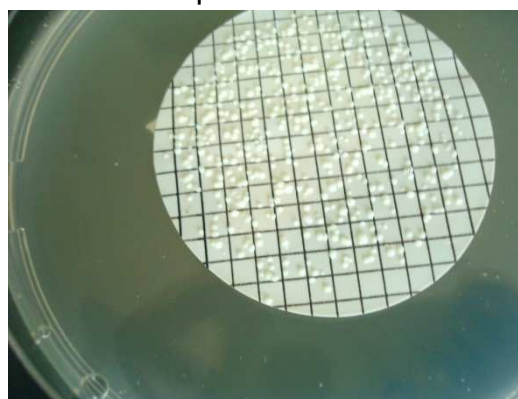
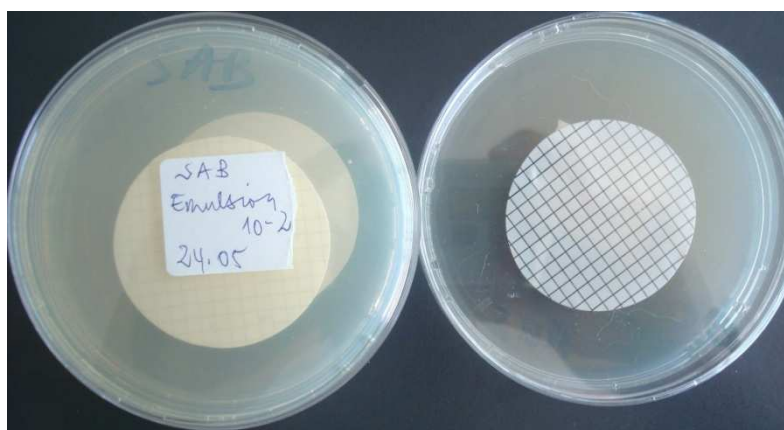
Cicatrisation défectueuse (Placébo)



Souris Albinos de race NMRI

Induction de l'œdème dans la patte gauche  
(injection de levure de bière)

Gonflement de la patte après injection

Mesure du volume de gonflement  
avec pied à coulisseDéveloppement des aérobies totaux sur  
TSA (éch : hydrolat de géranium)Développement des champignons sur  
Sabouraud (éch : hydrolat de géranium)Absence des aérobies totaux et des champignons dans la crème dermique  
(Tech de filtration)



Géranium rosat :  
Partie aérienne pour bouturage



Huile essentielle (gauche) et  
hydrolat de géranium rosat



Appareil de mesure des  
zones d'inhibition



Champs de culture de géranium rosat à Chiffa  
(w. Blida)



Aromatogramme de l'huile essentielle de géranium rosat sur  
quelques souches bactériennes.

## APPENDICE G

### Animaux de laboratoire

Les animaux utilisés lors des tests pharmaco-toxicologiques proviennent de l'animalerie du complexe ANTIBIOTICAL de Saidal sise à Médéa

Caractéristiques des animaux utilisés :

- Lapin Albinos, de souche néo-zélandaise.

Nombre = 12, Sexe : mâle; poids : 2,5-3 Kg.

- Souris Albinos, de race NMRI.

Nombre : 15, Sexe: mâle et femelle; Poids: 25-28 g.

Habitat:

- température : 22-25 °C.
- Humidité : 50-60 %.
- Eclairage : artificiel (12/24 heures).

Nourriture :

Elle est sous forme de granulés originaires de l'ONAB (Office Nationale d'Alimentation du Bétail) dont la composition est la suivante:

Composés	%
Humidité	14 max
Matière minérale	8 min
Matière protéique	22 min
Matière grasse	2,5 min
Cellulose	3 max
Vitamine A	12300 ul/Kg
Vitamine B	20 mg/Kg
Fer	76 mg/Kg
Magnésium	25 g/Kg

Abreuvement :

Il se fait par l'eau de robinet fraîche remplie dans des bouteilles en plastiques de 500 ml.

Contention:

Elle doit être ferme pour éviter toute morsure et maîtriser ainsi les réactions, parfois vives, de l'animal. La souris est prise par la base de sa queue et mise sur un revêtement rugueux puis saisie au niveau de la peau du dos près des oreilles. De ce fait, l'animal ne sera plus capable de tourner la tête pour mordre.

Marquage:

Il est nécessaire pour l'identification des animaux. Il se fait par un marqueur coloré sur la queue et/ou le dos.

## APPENDICE H

## Évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'Huile essentielle de géranium rosat

## TESTS STATISTIQUES

	Témoïn		Piroxicam		Huile essentielle	
	G	D	G	D	G	D
	3.2	2.4	2.7	2.6	2.6	2.6
	3.6	2.7	2.6	2.4	2.8	2.5
	3	2.6	2.6	2.6	2,7	2.4
	3.1	2.5	2.7	2.6	2.6	2.5
	3.2	2.4	2.5	2.7	2.7	2.5
Moyenne	3.22	2.52	2.62	2.58	2.675	2.5
Écart-type	0.22803	0.13038	0.08366	0.10954	0.09574	0.07071
<b>% Augmentation Œdème</b>						
	<b>27.7777778</b>		<b>1.5503876</b>		<b>7</b>	
<b>% Réduction Œdème</b>						
			<b>Référence / T</b>		<b>HE / T</b>	
			<b>94.418605</b>		<b>74.8</b>	

## ► Comparaison entre le volume des pattes Droites et gauches du lot Témoïn :

ANALYSE DE VARIANCE : LOT TEMOIN		
Source des variations	F	Valeur critique pour F
Entre Groupes	35.5072464	5.31765506

**F calculé >> F théorique : Différence significative.** La levure de bière provoque une intense inflammation dans les pattes gauches des souris du lot Témoïn.

## ► Comparaison entre le volume des pattes Droites des 3 lots :

Analyse de variance: un facteur				
RAPPORT DÉTAILLÉ				
Groupes	Nombre d'échantillons	Somme	Moyenne	Variance
Colonne 1	5	12.6	2.52	0.017
Colonne 2	5	12.9	2.58	0.012
Colonne 3	5	12.5	2.5	0.005
ANALYSE DE VARIANCE				
Source des variations	F	Valeur critique pour F		
Entre Groupes	0.76470588	3.88529383		

**F calculé < F théorique : Différence non significative** entre les pattes droites des différents lots.

## ► Comparaison entre le volume des pattes gauches du lot Témoïn avec Essai 1 :\*

ANALYSE DE VARIANCE		
<i>Source des variations</i>	<i>F</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	30.5084746	5.31765506

**F calculé >> F théorique.** Différence significative. Le Piroxicam inhibe la réaction inflammatoire provoquée par la levure de bière dans les pattes gauches du lot Essai 1.

► **Comparaison entre le volume des pattes gauches du lot Témoin avec Essai 2 :**

ANALYSE DE VARIANCE		
<i>Source des variations</i>	<i>F</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	24.7118644	5.31765506

**F calculé >> F théorique.** Différence significative. L'Huile essentielle de géranium rosat (2,5%) participe à la diminution de l'œdème et à la suppression de la réaction inflammatoire induite par la levure de bière dans les pattes gauches du lot Essai 2.

► **Comparaison entre le volume des pattes gauches du lot Essai 1 avec Essai 2 :**

ANALYSE DE VARIANCE		
<i>Source des variations</i>	<i>F</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	1.28571429	5.31765506

**F calculé < F théorique.** Différence non significative. L'Huile Essentielle de géranium rosat (2,5%) a un effet anti-inflammatoire comparable à celui du Piroxicam.



## APPENDICE I

### Glossaire

**Allopathiques** : Par opposition à l'homéopathie, médecine qui utilise des substances propres à créer les effets contraires de ceux de la maladie.

**Amphiphiles** : Une espèce chimique (molécule ou ion) qui possède à la fois un groupe hydrophile et un groupe hydrophobe.

**Analgsiques** : Mdicament utilis pour calmer la douleur.

**Androcée** : Ensemble des tamines (partie mâle de la fleur).

**Anthère** : Partie de l'tamine portée par le filet, contenant le pollen dans les loges polliniques.

**Anti-spasmodique** : Qui rduit les spasmes, les crampes, et les contractions musculaires.

**Aphes** : rruption vsculaire qui a son siége sur la muqueuse de la bouche. Cette affection est dite aussi « stomatite aphteuse ».

**Carpelle** : Organe reproducteur femelle de la fleur, formé d'un ovaire contenant le ou les ovules, et d'un stigmate.

**Dialypétales** : Se dit des fleurs et des plantes dont la corolle est faite de pétales séparés.

**Eczéma** : C'est une manifestation d'allergie caractrisée par une sécheresse et une rougeur de la peau qui entraînent des démangeaisons et desquamation.

**Emulsifiants** : Substances qui permettent ou facilitent la fine dispersion de deux ou de plusieurs phases non miscibles

**Étamine** : Organe reproducteur mâle d'une fleur ; elle est composée d'une anthère habituellement à deux loges fixée à un filet.

**Excipient** : substance qui reçoit, c'est-à-dire la partie neutre du médicament, dans laquelle on va incorporer les principes actifs.

**Galénique** : mode de présentation et de conditionnement du produit.

**Gingivite** : inflammation de la gencive, associée ou non à des phénomènes dégénératifs, nécrotiques ou prolifératifs et causée par la plaque bactérienne.

**Glande** Petit organe sécréteur contenant du liquide (huile, résine, nectar, eau, etc.).

**Herbacées** : Se dit d'un organe (tige, rameau) ou d'une plante entière présentant les caractères de l'herbe, par opposition à ligneux.

**Inflorescence** : Groupe de fleurs.

**Infusions** : L'infusion est une méthode d'extraction des principes actifs ou des arômes d'un végétal par dissolution dans un liquide initialement bouillant.

**Laticifère** : Canal uni- ou pluricellulaire permettant la sécrétion du latex.

**Lobée** : divisée en plusieurs lobes.

**Nectaire** : Glande spécialisée produisant du nectar.

**Nectar** : Sécrétion sucrée exsudée par des glandes spécialisées appelées nectaires.

**Ombelle** : Grappe de fleurs ayant des pédoncules tous insérés au même point et de longueur égale.

**Opposé** : Se dit de deux feuilles insérées face à face sur la tige.

**Pérenne** : Plante dont la durée de vie s'étale sur plusieurs années.

**Péricarpe** : Ensemble des différentes parties de la paroi du fruit, de l'intérieur vers l'extérieur : endocarpe, mésocarpe et épicarpe.

**Pistil** : c'est l'ensemble des pièces fertiles femelles. Il est constitué d'un ou plusieurs carpelles, libres ou soudés entre eux. Syn. : gynécée.

**Pivotant** : Se dit d'une racine très grosse par rapport aux racelles et s'enfonçant verticalement dans le sol.

**Principe actif** : est la molécule qui dans un médicament ou dans une plante possède un effet thérapeutique.

**Rhéologie** : l'étude de la déformation et de l'écoulement de la matière sous l'effet d'une contrainte appliquée.

**Serpentin** : tube de verre en forme de solénoïde. C'est aussi le nom du condenseur d'un alambic quand il a la forme d'un serpent.

**Stigmate** : Partie supérieure du pistil qui réceptionne le pollen.

**Stomatites** : infection de la muqueuse buccale qui provoque une inflammation de la bouche et des gencives.

**Surfactifs** : Agent qui agit en surface pour réduire la tension interfaciale d'un liquide.

**Teintures** : Une teinture est un colorant absorbé par le support et qui se mélange à sa couleur initiale, au lieu de la recouvrir comme un pigment.

**Thixotropie** : Propriété qu'ont certains fluides de passer d'un état visqueux à un état liquide lorsqu'on les agite et de retrouver leur état initial au repos.

**Thuyone** : est une molécule présente dans l'absinthe. Elle est très convulsivante et provoque des hallucinations.