

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE  
DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SALAH BOUBNIDER CONSTANTINE 3



FACULTE DE GENIE DES PROCÉDES

DEPARTEMENT DE GENIE PHARMACEUTIQUE

N° d'ordre: .....

Série : .....

Mémoire de Master / Projet Start-up dans le cadre de l'arrêté  
ministériel 1275

Filière: Génie des Procédés

Spécialité: Génie Pharmaceutique

Intitulé :

**FORMULATION, OPTIMISATION ET CARACTERISATION D'UNE  
CREME REPARATRICE DE LA PEAU A BASE DES PLANTES  
MÉDICINALES.**

**Dirigé par:**

-RABTI Hadjira

Maitre assistante A

**Présenté par:**

- KEROUH Chiraz

- SAOULI Aya Nour El Houda

Session : (Juillet 2024)

# Remerciement

Avant toute chose, nous remercions « Allah » le tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nos plus vifs remerciements vont également à notre encadreur du projet de fin d'études Mme RABTI Hadjira, qui nous a accordé l'honneur de diriger ce modeste travail, de nous orienter et de nous aider. Merci à sa disponibilité, sa patience son soutien moral et ses conseils pertinents qui ont été pour nous un solide repère et réconfort dans tous les moments.

Nous tenons à remercier vivement Monsieur BELMAHI Mohamed Habib, le doyen de la Faculté de Génie des Procédés, et Monsieur BEKKOUCHE Salim, le Chef de Département de Génie Pharmaceutique ainsi que tous les enseignants de la faculté de Génie des Procédés surtout madame LOUAER Wahida, madame LAMMARI Narimane et madame NACEF Houda Sara, qui ont grandement contribué à notre parcours d'étude et pour leur conseils précieux. Nous sommes Reconnaisantes pour leur soutien constant.

Nous souhaitons également adresser nos remerciements sincères aux membres de jury pour avoir accepté de consacrer leur temps et leur expertise à évaluer ce mémoire. Leurs commentaires constructifs et leurs suggestions judicieuses vont grandement contribuer à l'amélioration de notre travail.

Nous exprimons nos remerciements à l'équipe de l'Ecole Polytechnique (université Constantine 3) surtout madame LABED Hala et Monsieur SAOULI Wassil.

Nous présentons aussi nos sincères gratitudes à l'équipe du l'incubateur, ainsi qu'à tous les ingénieurs de la faculté de génie des procédés, pour nous avoir aidé au bon déroulement du travail.

Nous présentons aussi nos sincères gratitudes à l'équipe du Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques de Constantine (CRSP), et celle du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBT) pour nous avoir accueillis durant la période de notre travail.

Nous adressons nos remerciements également à Mme BENCHAIIB FERIAEL, Cheffe de service du Laboratoire de contrôle de qualité de l'unité LDM(Constantine), et à Mr BENATIA ZAKARIA et à toute l'équipe du groupe LDM, et nous avoir procuré l'appui et l'aide pour accomplir ce travail.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

*Merci.*

# *Dédicace*

*Avec l'aide de Dieu tout puissant, qui a tracé le Chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie à :*

*La lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère hayet qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité. A mon cher père Messaoud qui ma supportée et m'a aidée dans les pires moments.*

*A mes très chers frères;  
Ayoub , Charaf et Chiheb Eddine*

*A toute ma famille surtout ma tante Souad, des remerciements spéciaux, Je tiens à leur exprimer l'assurance de mes sentiments respectueux et dévoués pour leurs aides lors de la réalisation de ce mémoire et pour le soutien moral qu'ils n'ont cessé de m'apporter.*

*A ma belle copine et partenaire depuis toutes ces années Aya Nour El Houda, merci pour ta patience et ta gentillesse à mon égard.*

*A mes amies avec qui j'ai vécu des beaux moments au cours de mon cursus à l'université surtout : Hadil, Rayene, Rania, Safa, Imen, Yasmine, Amina, Racha et ma moitié Samah, Ritedj, Sara, Chaima.*

*A tous mes collègues surtout Abdou et Marouane*

*Finalement à notre promotrice Mme Rabti hadjira, merci pour vos merveilleux efforts et vos conseils tout au long de la réalisation de ce projet.*

*Chiraz*

# *Dédicace*

*Préalablement, je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Bon Dieu, ALLAH le Tout-Puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour réaliser ce merveilleux travail.*

*Je dédie ce travail à mes chers parents, mon père Samir pour ses sacrifices et son encouragement, et ma mère Samia, qui est la bougie illuminant ma route.*

*À ma très jolie sœur Ritedj Nour Israe, avec qui je partage tous les bons et les mauvais moments.*

*À mes deux frères, Mohamed Taki Eddine et LouayAbdEl Rahman, qui me soutiennent toujours.*

*À toute ma famille, et surtout à Mima, Sidi Omar, et Amina.*

*Je tiens également à dédie ce travail à ma belle binôme KEROUH CHIRAZ, mon amie et ma sœur, avec elle j'ai partagé de nombreux souvenirs.*

*À ma chère encadrante, Mme RABTI Hadjira, pour sa patience et son soutien.*

*À tous mes amis : Alia, Malek, Feriel et Chayma, sans oublier le groupe avec lequel nous avons étudié et réussi ensemble, mes belles amies Chiraz, Rayen, Hadil, Nouara et Lina.*

*À tous mes collègues de laboratoire et à tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin.*

*Aya Nour El Houda*

# Table des matières

Liste des figures

Liste des Tableau

Liste des abréviations

Résumé

**INTRODUCTION GENERALE** ..... 1

## **CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

I.1. Généralités sur les plantes étudiées ..... 3

I.1.1. Cardoncelle bleue ..... 3

I.1.1.1. Dénomination ..... 4

I.1.1.2. Origine ..... 4

I.1.1.3. Répartition géographique ..... 5

I.1.1.4. Composition chimique ..... 5

I.1.1.5. Utilisation de traditionnelles ..... 6

I.1.1.6. Activités pharmacologiques ..... 6

I.1.2. Cyprès ..... 7

I.1.2.1. Dénomination ..... 8

I.1.2.2. Origine ..... 8

I.1.2.3. Répartition géographique ..... 9

I.1.2.4. Composition ..... 9

I.1.2.5. Utilisation de cyprès ..... 10

I.1.2.6. Activités pharmacologiques ..... 10

I.2. Techniques d'extraction des plantes médicinales. .... 11

I.2.1. Infusion ..... 11

I.2.2. Décoction ..... 11

I.2.3. Distillation ..... 11

I.2.4. Hydro distillation ..... 12

I.2.5. Macération ..... 12

I.3. Crèmes pour application cutanée ..... 14

I.3.1. Peau humaine ..... 13

I.3.1.1. Définition ..... 13

I.3.2. Pénétration à travers la peau ..... 14

I.3.4. Emulsions ..... 14

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| I.3.4.1.Type d'émulsion .....                     | 15 |
| I.3.4.2. Emulsifiant .....                        | 16 |
| I.3.5. Procédure de fabrication d'une crème ..... | 16 |
| I.4. Brûlures cutanées .....                      | 18 |
| I.4.1. Définition .....                           | 18 |
| I.4.2. Classification des brûlures.....           | 18 |
| I.4.3. Facteurs de gravité .....                  | 18 |
| I.4.3.1. Profondeur de la brûlure.....            | 18 |
| I.4.3.2.Surface brûlée .....                      | 20 |
| I.4.3.3. Localisation .....                       | 20 |
| I.4.3.4. Terrain .....                            | 20 |
| I.4.4. Cicatrisation normale .....                | 20 |
| I.5. Plan d'expériences.....                      | 22 |
| I.5.1. Différent types des facteurs.....          | 22 |
| I.5.2. Types de plans d'expériences.....          | 22 |
| I.5.3. Plan Box Behnken .....                     | 23 |
| I.5.4. Validation des modèles .....               | 24 |

## CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.1. Matériel .....                                                            | 25 |
| II.1.1. Matériel du laboratoire.....                                            | 25 |
| II.1.2. Equipements .....                                                       | 26 |
| II.1.3.Logiciels .....                                                          | 26 |
| II.1.4.Matière végétale .....                                                   | 26 |
| II.1.5.Produits .....                                                           | 28 |
| II.1.6.Produits Souches bactériennes, fongiques et milieu de culture .....      | 28 |
| II.2.Méthodes .....                                                             | 29 |
| II.2.1.Extraction des huiles essentielles.....                                  | 29 |
| II.2.2.Extraction par macération .....                                          | 30 |
| II.2.3.Caractérisation des huiles essentielles et des extraits des plantes..... | 33 |
| II.2.4.Détermination du taux des polyphénols totaux des extraits.....           | 34 |
| II.2.5.Détermination du taux des flavonoïdes des extraits .....                 | 34 |
| II.2.6.Etude de l'effet antioxydant.....                                        | 35 |
| II.2.7.Test de cytotoxicité .....                                               | 38 |
| II.2.8.Activités biologiques .....                                              | 39 |

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| II.2.9. Formulation et caractérisation de la crème ..... | 44 |
| II.2.9.1. Etapes de la formulation .....                 | 44 |
| II.2.9.2. Optimisation de la formulation .....           | 45 |
| II.2.9.3. Contrôle de qualité de la crème formulée ..... | 45 |

## CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSIONS

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| III.1. Extraction par macération et par hydrodistillation .....         | 49 |
| III.1.1. Rendement de la macération par Box Benken .....                | 49 |
| III.1.2. Rendement de l'extraction des huiles essentielles .....        | 58 |
| III.2. Caractérisation des huiles essentielles .....                    | 59 |
| III.3. Dosage des polyphénols et flavonoïdes .....                      | 61 |
| III.4. Activité Antioxydante .....                                      | 61 |
| III.5. Test de cytotoxicité .....                                       | 64 |
| III.6. Activité anti bactérienne .....                                  | 65 |
| III.7. Activité antifongique .....                                      | 69 |
| III.8. Optimisation de la formulation des crèmes .....                  | 72 |
| III.8.1. Type de la crème .....                                         | 72 |
| III.9. Contrôle qualité de la crème .....                               | 78 |
| III.9.1 Caractéristique organoleptique de la crème .....                | 78 |
| III.9.2 pH de la crème .....                                            | 78 |
| III.9.3 Viscosité .....                                                 | 79 |
| III.9.4 Type de l'émulsion .....                                        | 80 |
| III.9.5 Etude de stabilité .....                                        | 80 |
| III.9.6. Etude <i>In vivo</i> .....                                     | 81 |
| III.9.6.1. Test d'irritation sur la peau humaine .....                  | 81 |
| III.9.6.2. Test des brûlures et de cicatrisation chez les animaux ..... | 81 |
| CONCLUSION GENERALE .....                                               | 86 |
| BIBLIOGRAPHIE .....                                                     | 88 |
| ANNEXES                                                                 |    |

## Liste des abréviations

**ABTS** : 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

**ANOVA** : Analyse de variance.

**CM** : Carré moyen.

**CRBT** : Centre de recherche en biotechnologie.

**CRSP** : Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques.

**DPPH** : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle.

**E/H** : Eau-dans-huile.

**FRAP**: Ferricreducingantioxidant power.

**FOL** : *Fusariumoxysporum f.sp. lycopersici*.

**HE** : Huile essentielle.

**HEs** : Huiles essentielles.

**H/E** : Huile-dans-eau.

**GC-MS**: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

**GC-MS**: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

**mg** : Milligramme.

**MPE** : Méthodologie des plans d'expériences.

**NI\*** : Non identifié.

**nm** : Nanomètres.

**PDA** : Potato dextrose agar.

**Pa.s**: Pascal seconde.

**rpm** : Tours par minute.

**SCEL** : Somme des carrées des écarts dus à la liaison.

**SCER** : Somme des carrées des écarts des résidus.

**SCET** : Somme des carrées des écarts totale.

**UFC** : Unité formatrice de colonie.

**µg** : Microgramme.

**µl**: Nanomètre.

## Liste des Figure

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure I.1.Différentes parties de la cardoncelle (A) : plante complète, (B) : racine, (C) : tige, (D) : fleur, (E) : feuille].                                     | 3  |
| Figure I. 2.Répartition de la cardoncelle dans le monde                                                                                                            | 5  |
| Figure I. 3. Les différentes parties de la plante <i>Cupressus sempervirens</i> L. [(A) : plante complète, (B) : feuille, (C) : fleur, (D) : écorce, (E) : fruits. | 7  |
| Figure I. 4.Aire et répartition du cyprès dans le monde.                                                                                                           | 9  |
| Figure I. 5.Distillation ou l'obtention d'huile essentielle                                                                                                        | 11 |
| Figure I. 6.Extraction par hydro-distillation.                                                                                                                     | 12 |
| Figure I. 7.Étapes de macération.                                                                                                                                  | 12 |
| Figure I. 8.Structure de la peau.                                                                                                                                  | 13 |
| Figure I. 9.Phase dispersée et phase dispersante d'une émulsion.                                                                                                   | 14 |
| Figure I. 10.Les différents types d'émulsions.                                                                                                                     | 16 |
| Figure I. 11.Schéma d'un tensioactif.                                                                                                                              | 16 |
| Figure I. 12. Différent degrés des brûlures.                                                                                                                       | 19 |
| Figure I. 13.Étapes de la cicatrisation de peau.                                                                                                                   | 20 |
| Figure I. 14.Plan Box-Behnken à 3 facteurs.                                                                                                                        | 24 |
| Figure II. 1. Préparation de la drogue du cyprès [A) Récolte ; B) Broyage ;C) Poudre].                                                                             | 27 |
| Figure II. 2.Préparation de la drogue de la cardoncelle bleue [A) Récolte ; B) Epluchage ; C) Découpage ; D) Poudre].                                              | 27 |
| Figure II. 3.Procédé d'extraction des huiles essentielles du cyprès.                                                                                               | 29 |
| Figure II. 4.Procédé d'extraction des huiles essentielles de <i>Carthamus caeruleus</i> L.                                                                         | 30 |
| Figure II. 5.Procédure de la macération effectuée pour la plante <i>Cupressus sempervirens</i> L.                                                                  | 31 |
| Figure II. 6.Procédure de la macération effectuée pour la plante <i>Carthamus caeruleus</i> L.                                                                     | 31 |
| Figure II. 7.Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydant "DPPH"                                                                                         | 36 |
| Figure II. 8. Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydant "ABTS"                                                                                        | 36 |
| Figure II. 9.Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante phénantroline.                                                                                | 37 |
| Figure II. 10.Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydant FRAP.                                                                                         | 38 |
| Figure II. 11.Procédés d'évaluation de la cytotoxicité des extraits et des huiles.                                                                                 | 39 |
| Figure II. 12.Technique des stries pour réactivation des souches antibactérienne.                                                                                  | 40 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure II. 13.Préparation de l'inoculum. ....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 40 |
| Figure II. 14.Ensemencement des boîtes par différentes souches bactériennes.....                                                                                                                                                                                                                                 | 41 |
| Figure II. 15.Méthode des puits. ....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 42 |
| Figure II. 16. Diagramme du procédé de fabrication d'une émulsion. ....                                                                                                                                                                                                                                          | 44 |
| Figure II. 17.Répartition des rats.....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 47 |
| Figure II. 18.Induction des brûlures et des plaies sur les rats. ....                                                                                                                                                                                                                                            | 48 |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
| Figure III. 1.Comparaison des valeurs réelles et prédites du rendement d'extraction du cyprès (A) et de la cardoncelle (B). ....                                                                                                                                                                                 | 51 |
| Figure III. 2.Tracés des effets principaux des facteurs sur le rendement. A) du cyprès; B) de la cardoncelle. ....                                                                                                                                                                                               | 53 |
| Figure III. 3.Tracé de contour du rendement d'extraction du cyprès.....                                                                                                                                                                                                                                          | 54 |
| Figure III. 4.Tracé de contour du rendement d'extraction de la cardoncelle. ....                                                                                                                                                                                                                                 | 55 |
| Figure III. 5.Optimisation des paramètres pour le cyprès (A) et la cardoncelle (B). ....                                                                                                                                                                                                                         | 56 |
| Figure III. 6.Extraits des plantes : cyprès (A) et cardoncelle (B).....                                                                                                                                                                                                                                          | 57 |
| Figure III. 7.Huiles essentielles des plantes (: cyprès (A) et cardoncelle B). ....                                                                                                                                                                                                                              | 58 |
| Figure III. 8.Activité anti-radicalaire des huiles et des extraits contre le radical DPPH. ....                                                                                                                                                                                                                  | 61 |
| Figure III. 9.Activité antiradicalaire des huiles et des extraits contre le radical ABTS.....                                                                                                                                                                                                                    | 62 |
| Figure III. 10.Activité antiradicalaire des huiles et des extraits par la méthode de phénantroline ....                                                                                                                                                                                                          | 62 |
| Figure III. 11.Activité antiradicalaire des huiles et des extraits par la méthode FRAP.....                                                                                                                                                                                                                      | 63 |
| Figure III. 12.Résultats de suivi pendant le cinquième jour de cytotoxicité des : (T) Témoin, (A) Extrait cardoncelle, (B) Extrait cyprès, (C) HE cardoncelle, (D) HE cyprès. ....                                                                                                                               | 64 |
| Figure III. 13.Diamètres d'inhibition de la croissance des différentes souches bactériennes après application du témoin, des huiles de cardoncelle (A) et du cyprès (B) et des extraits de cardoncelle (C) et du cyprès (D). ....                                                                                | 67 |
| Figure III. 14.Diamètres d'inhibition de la croissance des différentes souches bactériennes après application des : mélange des huiles (A), mélange des extraits (B), mélange de l'huile du cyprès avec l'extrait du cardoncelle (C) et mélange de l'huile du cyprès avec les extraits des deux plantes (D) .... | 68 |
| Figure III. 15.Diamètres d'inhibition de la croissance des différentes souches fongiques après application du témoin, des huiles de cardoncelle (A) et du cyprès (B) et des extraits de cardoncelle (C) et du cyprès (D). ....                                                                                   | 70 |
| Figure III. 16.Diamètres d'inhibition de la croissance des différentes souches fongiques après application des : mélange des huiles (A), mélange des extraits (B), et mélange de l'huile du cyprès avec les extraits des deux plantes (C). ....                                                                  | 71 |
| Figure III. 17.Crème hydrophile (A) et crème lipophile (B).....                                                                                                                                                                                                                                                  | 72 |

|                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure III. 18.Résultats de l'activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents types...          | 74 |
| Figure III. 19.Crèmes hydrophiles à différente concentration (1) 0.2%, (2) 0.35% et(3) 0.5%. ....                     | 75 |
| Figure III. 20. Résultats de l'activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents dosages.         | 77 |
| Figure III. 21.Aspect de la crème.....                                                                                | 78 |
| Figure III. 22.PH de la crème.....                                                                                    | 78 |
| Figure III. 23.Type d'émulsion par dilution.....                                                                      | 79 |
| Figure III. 24.Type d'émulsion par microscope.....                                                                    | 79 |
| Figure III. 25.Vieillissement en enceinte climatique (A) Vieillissement au chaud (B) Vieillissement à froid.<br>..... | 80 |
| Figure III. 26.Sédimentation forcée. ....                                                                             | 80 |
| Figure III. 27.Avant et Après application de la crème. ....                                                           | 81 |
| Figure III. 28.Evolution de la surface des brulures appliquées sur différents lots de rats. ....                      | 82 |

## Liste des Tableaux

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau I. 1.Classification phylogénique de la cardoncelle.....                                                      | 4  |
| Tableau I. 2Diverses appellations de la cardoncelle bleue. ....                                                      | 4  |
| Tableau I. 3.Classification systématique du cyprès . ....                                                            | 8  |
| Tableau I. 4.Diverses appellations de cyprès. ....                                                                   | 8  |
| Tableau I. 5.Essais pharmaco-techniques des crèmes.....                                                              | 17 |
| Tableau I. 6.Table d'ANOVA.....                                                                                      | 25 |
|                                                                                                                      |    |
| Tableau II. 1.Différant matérielle utilisé avec leur référence. ....                                                 | 26 |
| Tableau II. 2.Solvants, réactifs et produits utilisés. ....                                                          | 28 |
| Tableau II. 3.Souches bactériennes et fongiques utilisées. ....                                                      | 29 |
| Tableau II. 4.Matrice d'expérience générée par le plan Box-Behnken.....                                              | 32 |
| Tableau II. 5.Conditions opératoires des analyses par GC-MS pour les huiles essentielles.....                        | 33 |
| Tableau II. 6.Répartition des rats en lots.....                                                                      | 47 |
|                                                                                                                      |    |
| Tableau III. 1.Résultats des essais du plan Box Benken.....                                                          | 49 |
| Tableau III. 2.Table d'ANOVA pour le rendement d'extraction.....                                                     | 50 |
| Tableau III. 3.Effets des facteurs et leurs interactions sur le rendement .....                                      | 51 |
| Tableau III. 4.Rendements théorique et expérimentale de l'extraction des plantes sous conditions optimales.<br>..... | 57 |
| Tableau III. 5.Rendement des huiles essentielles pour chaque plante. ....                                            | 58 |
| Tableau III. 6.Analyse qualitative et quantitative de l'HE du cyprès par GC-MS. ....                                 | 59 |
| Tableau III. 7.Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes.....                                               | 60 |
| Tableau III. 8.Valeurs des IC50 obtenues des huiles et des extraits contre le radical DPPH. ....                     | 61 |
| Tableau III. 9.Valeurs des IC50 obtenues des huiles et des extraits contre le radical ABTS. ....                     | 62 |
| Tableau III. 10.Valeurs des IC50 obtenues des huiles et des extraits par la méthode de phénantroline.....            | 63 |
| Tableau III. 11.Valeurs des IC50 obtenues des huiles et des extraits par la méthode de FRAP. ....                    | 63 |
| Tableau III. 12.Pourcentages de survivants des larves de Tenebrio Molitor après 5 jours de surveillance.....         | 64 |
| Tableau III. 13.Echelle de Poncé des diamètres d'inhibition.....                                                     | 65 |
| Tableau III. 14.Résultats de l'activité antibactérienne des extraits et des huiles.....                              | 65 |
| Tableau III. 15.Résultats de l'activité antibactérienne des mélanges des extraits et des huiles.....                 | 66 |
| Tableau III. 16.Résultats de l'activité antifongique des extraits et des huiles. ....                                | 69 |
| Tableau III. 17.Résultats de l'activité antifongique des mélanges des extraits et des huiles.....                    | 70 |

Tableau III. 18.Résultats de l’activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents types.72

Tableau III. 19.Résultats de l’activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents dosages.  
.....75

## Résumé

L'objectif de ce travail est la formulation d'une crème à base d'extraits obtenus par deux méthodes (macération et hydrodistillation) pour utilisation parapharmaceutique. Deux plantes ont été étudiées à savoir : la cardoncelle bleu (*Carthamus caeruleus L.*) et le cyprès (*Cupressus semprevirens L.*). Le travail est réparti en quatre parties. La première a porté sur l'optimisation de la macération par plan Box Behnken et l'extraction par macération et hydrodistillation. La deuxième sur l'étude de la cytotoxicité et l'activité antimicrobienne, antifongique, et antioxydant des différents extraits et les huiles essentielles (HEs). Enfin, la troisième et la quatrième parties ont porté sur le développement des crèmes, leur caractérisation ainsi que l'étude de l'activité anti-brûlure et cicatrisante *in vivo*. Les résultats montrent que la crème préparée exerce un potentiel antioxydant, antimicrobien, anti-brûlure et cicatrisant très élevés par rapports aux standards.

**Mots clés :** Cardoncelle bleu, Cyprès, Antioxydant, Antimicrobien, Anti-brûlure, Cicatrisant, Crème.

# INTRODUCTION GENERALE

### INTRODUCTION GENERALE

Les brûlures constituent un problème de santé majeur dans le monde entier, causant environ 180 000 décès par an selon les estimations de l'Organisation mondiale de la santé. Elles peuvent être causées par diverses sources, telles que la chaleur, les produits chimiques, l'électricité et le rayonnement. La gravité d'une brûlure est définie selon la surface corporelle brûlée, la profondeur, la localisation, le terrain (âge et antécédents) et l'existence de lésions associées [1].

Depuis des siècles, les plantes médicinales ont été utilisées dans diverses cultures pour traiter les maladies connues sous le nom de phytothérapie [2]. Les plantes médicinales sont une source majeure de traitement pour de nombreuses maladies humaines à travers le monde. Ainsi, la demande de remèdes issus de sources naturelles pour remplacer les médicaments thérapeutiques synthétiques, et minimiser leurs effets secondaires ainsi que leur toxicité, n'a cessé d'augmenter [3].

L'utilisation des plantes à des fins médicinales a été éclipsée par l'avènement de la synthèse chimique et l'industrie pharmaceutique moderne. Cependant, cette tendance s'inverse progressivement grâce aux avancées scientifiques, en particulier le développement de méthodes d'analyse sophistiquées qui permettent de mieux comprendre les propriétés thérapeutiques du règne végétal. De plus, face aux effets secondaires indésirables et aux échecs thérapeutiques observés avec certains médicaments de synthèse, ainsi qu'à leurs coûts élevés, le public s'interroge sur l'efficacité, la sécurité et l'innocuité des traitements pharmaceutiques. Dans ce contexte, les plantes médicinales occupent une place de choix dans la médecine et la pharmacie contemporaines, que ce soit comme source exclusive de principes actifs, comme matière première pour la synthèse de médicaments ou encore comme excipients. De ce fait, les plantes médicinales, longtemps délaissées au profit des médicaments de synthèse, regagnent aujourd'hui du terrain dans le domaine de la santé, tirant parti des avancées scientifiques et des préoccupations du public face aux limites des traitements pharmaceutiques conventionnels [4].

L'Algérie possède une richesse floristique considérable, comprenant des espèces méditerranéennes, sahariennes et une flore paléo-tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% sont endémiques [5].

Parmi les ressources locales, nous sommes particulièrement intéressés à la cardoncelle bleue (*Carthamus caeruleus* L.), dont les racines sont traditionnellement utilisées pour leurs propriétés anti-brûlures [6]. Pour renforcer l'effet cicatrisant on a ajouté une deuxième plante riche en propriétés thérapeutiques connue par son effet anti-bactérien et cicatrisant, c'est le cyprès (*Cupressus sempervirens* L.) [7].

Dans le contexte de l'exploitation des ressources naturelles, s'inscrit notre travail qui porte sur la

## INTRODUCTION GENERALE

formulation, pour la première fois, d'une crème anti brûlure et cicatrisante à base de l'extrait de cardoncelle bleue de du cyprés, pour application parapharmaceutique.

Une optimisation de la macération par le plan d'expérience Box Behnken a été réalisée afin d'étudier les effets des facteurs influençant et de maximiser le rendement d'extraction. Une hydrodistillation a été accomplie afin d'obtenir les huiles essentielles (HEs) des plantes étudiées. Puis, l'activité antimicrobienne des extraits et des HEs a été investigué. Le pouvoir antioxydant de l'extrait obtenu a été évalué en utilisant plusieurs méthodes à savoir : DPPH, ABTS, FRAP et phénantroline. Par la suite, une crème anti brûlure et cicatrisante à base des extraits et des HEs a été préparée, optimisée et caractérisée.

Le travail présenté dans ce mémoire est structuré en trois chapitres principaux

Le premier chapitre bibliographique est dédié aux généralités sur les plantes utilisées, les méthodes d'extraction, les crèmes pour application cutanée, les brûlures et le plan d'expérience

Le deuxième chapitre englobe tous le matériel, les produits utilisés ainsi que les méthodes suivies pour réaliser ce travail.

Le troisième chapitre consacré aux résultats obtenus et à leur interprétation.

Enfin, nous terminons notre travail par une conclusion générale englobant ainsi les principaux résultats avec les perspectives futures.

# CHAPITRE I

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

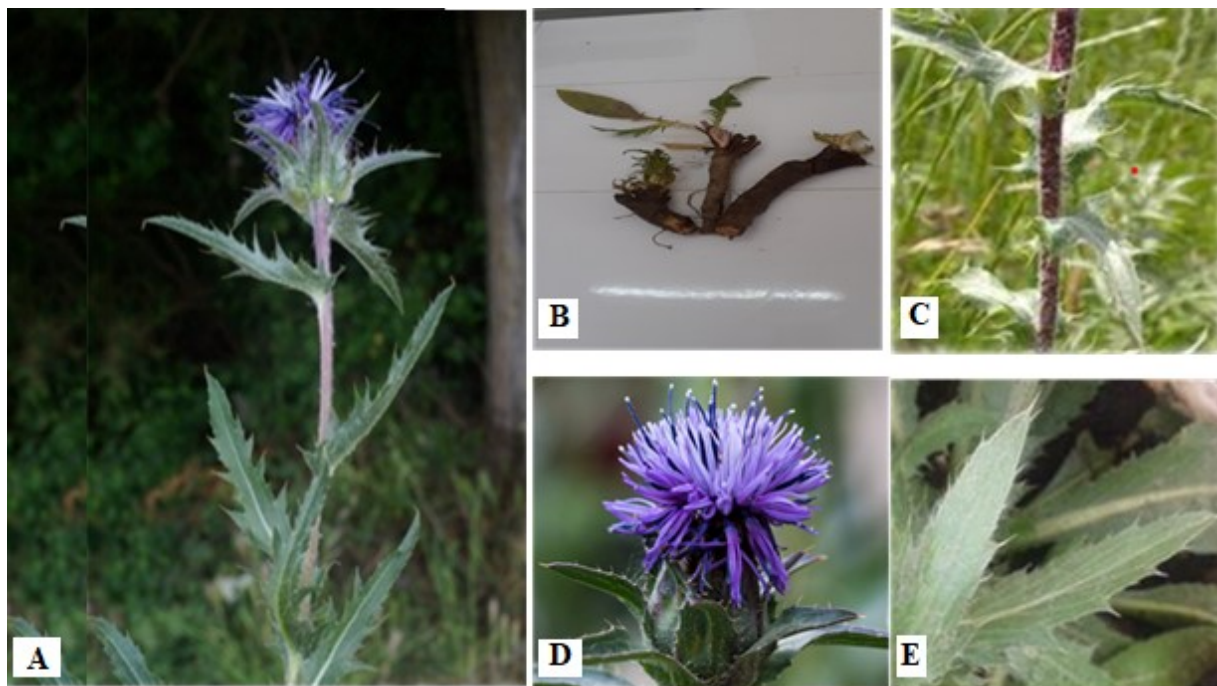
## CHAPITRE I. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### I.1. Généralités sur les plantes étudiées

Les plantes médicinales ont été utilisées depuis des millénaires pour traiter diverses maladies et affections. Deux plantes en particulier ont été historiquement utilisées à ces fins ; le "Mers'gouss", une plante connue dans le nord de l'Algérie, dont le rhizome est traditionnellement utilisé sous forme de pommade pour traiter les brûlures cutanées et le cyprès, une plante présente dans les régions méditerranéennes, qui figurait dans un texte assyrien vieux de 3 500 ans révélant son utilisation pour traiter la douleur et les cicatrices à long terme.

#### I.1.1. Cardoncelle bleue

La plante décrite correspond au *Carthamus caeruleus* L. ou cardoncelle bleu (Figure I.1.), une plante vivace mesurant entre 2 et 6 décimètres, avec une tige dressée peu rameuse et anguleuse [8]. Elle possède un rhizome composé d'une racine principale évoluant horizontalement, avec des racines secondaires verticales. Les feuilles sont coriaces, luisantes, fortement dentées, et piquantes, surtout les supérieures. Son inflorescence se présente en capitule avec des fleurs bleues, en capitules terminaux solitaires, fleurissant de mai à juillet. Les fruits de la cardoncelle sont des akènes [9].



**Figure I.1.** Différentes parties de la cardoncelle (A) : plante complète, (B) : racine, (C) : tige, (D) : fleur, (E) : feuille [10].

La classification de la cardoncelle est représentée sur le **Tableau I.1.**

**Tableau I. 1.**Classification phylogénique de la cardoncelle [11].

|                      |                               |
|----------------------|-------------------------------|
| <b>Règne</b>         | Plantae                       |
| <b>Embranchement</b> | Tracheophyta                  |
| <b>Classe</b>        | Magnoliopsida                 |
| <b>Ordre</b>         | Asterales                     |
| <b>Famille</b>       | Asteraceae                    |
| <b>Genre</b>         | Carthamus                     |
| <b>Espèce</b>        | <i>Carthamus caeruleus L.</i> |

#### I.1.1.1. Dénomination

L'espèce *Carthamus caeruleus L.* est connue également sous le nom cardoncelle bleue ou carduncellus bleu, est connue sous diverses appellations, comme illustré dans le Tableau I.2.

**Tableau I. 2**Diverses appellations de la cardoncelle bleue [8].

| <b>Langue</b>    | <b>Nom vernaculaire</b>                |
|------------------|----------------------------------------|
| <b>Français</b>  | Cardoncelle bleue.                     |
| <b>Anglais</b>   | Blue thistle.                          |
| <b>Espagnol</b>  | Cardosantoazul.                        |
| <b>Italienne</b> | Cardoncelloazzurro.                    |
| <b>Arabe</b>     | Kendjar, Gergaa, Qartum, MerghesGhers. |
| <b>Berbère</b>   | Tagalekhla, amersgus.                  |

#### I.1.1.2. Origine

Le nom de genre "Carthamus" provient du mot arabe "qūrtūm" qui signifie "teinture". L'espèce "tinctorius" fait référence à ses usages en teinturerie. Le carthame est une plante de la famille des Astéracées, comme le chardon, qui est son cousin sauvage. Le genre Carthamus comprend environ 20 espèces annuelles ou vivaces, originaires d'Asie tempérée, d'Europe centrale et du pourtour méditerranéen. Le carthame est connu depuis l'Égypte antique, où ses fleurs rouges étaient utilisées

pour teindre les textiles. Il s'est ensuite répandu en Inde, en Chine et dans tout le bassin méditerranéen. C'est une plante herbacée annuelle de 30 à 150 cm de haut, avec des feuilles épineuses et une racine pivotante puissante. Ses fleurs rouges ou jaunes permettent d'extraire des pigments tinctoriaux comme La carthamine et la carthamone.

### I.1.1.3. Répartition géographique

La répartition géographique de cette espèce peu commune est assez large, bien qu'elle préfère les endroits ensoleillés du bassin méditerranéen. En Algérie, elle se rencontre dans les régions côtières méditerranéennes (Tipaza, Annaba, Béjaïa, Boumerdès, Sidi Bel Abbès et Bouira) ainsi que dans les hauts plateaux de Sétif [9].



Figure I. 2. Répartition de la cardoncelle dans le monde [9].

#### 1.1.1.1. Composition chimique

Le screening phytochimique du rhizome du *Carthamus caeruleus* L. a révélé une richesse en composés polyphénoliques, mucilages et amidon, qui sont des métabolites secondaires et des polysaccharides jouant des rôles importants dans la physiologie et l'écologie des plantes [8].

- **Polyphénols**

Le rhizome du *Carthamus caeruleus* L. est riche en polyphénols, qui sont des substances naturelles présentes dans le règne végétal.

- **Mucilage**

Le rhizome contient également des mucilages, qui sont des macromolécules biologiques solubles dans l'eau, responsables de la viscosité des solutions et pouvant former des gels à faible concentration. Chimiquement, les mucilages sont de nature polysaccharidique et sont utilisés comme épaississants et stabilisants de suspensions, en évitant la cristallisation. Ils ont principalement un effet calmant sur les

tissus irrités.

- **Amidon**

Enfin, le rhizome renferme de l'amidon, qui est le principal polysaccharide de réserve des plantes supérieures [12].

#### **I.1.1.4.Utilisation de traditionnelles**

Les extraits des rhizomes de la cardoncelle sont utilisés en médecine traditionnelle algérienne pour traiter les brûlures grâce à leurs propriétés astringentes. Les extraits aqueux des racines de cette plante présentent également des effets cicatrisants et anti-inflammatoires. Les extraits de la cardoncelle semblent donc être une source prometteuse de nouveaux agents thérapeutiques naturels [13].

#### **I.1.1.5.Activités pharmacologiques**

##### **A. Activité antioxydant**

Le rhizome de *Carthamus caeruleus L.* est riche en composés polyphénoliques (tanins, flavonoïdes, acides phénoliques) qui lui confèrent une forte activité antioxydant. Les extraits polyphénoliques ont montré un pouvoir réducteur élevé et une activité anti-radicalaire importante, comparable à celle de l'acide ascorbique.

##### **B. Activité anti-inflammatoire**

L'extrait des racines de *Carthamus caeruleus L.* a démontré un excellent effet anti-inflammatoire chez l'animal. Il inhibe l'œdème, l'infiltration des cellules inflammatoires et la sécrétion de médiateurs inflammatoires, grâce à sa richesse en flavonoïdes.

##### **C. Activité antimicrobienne**

Les racines de *Carthamus caeruleus L.* ont un pouvoir inhibiteur important sur les bactéries multi-résistantes responsables d'infections. Ses substances flavoniques présentent un fort potentiel antimicrobien contre de nombreuses souches bactériennes.

##### **D. Activité cicatrisante**

Le pouvoir cicatrisant de *Carthamus caeruleus L.* s'explique par sa composition en substances phénoliques antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes, ainsi que par ses stérols végétaux[8].

### I.1.2.Cyprès

Le *Cupressus sempervirens* L. ou le cyprès est un arbre conifère persistant qui peut atteindre une hauteur de 25 mètres. Il a un tronc élancé avec des branches disposées en longue cyme pyramidale étroite et en aigüe. L'écorce de l'arbre est grise rougeâtre et fissurée. Les caractéristiques de l'arbre sont :

- **Feuilles** : Les feuilles sont persistantes, aromatiques, vert foncé, et disposées en écailles fines le long des rameaux.
- **Fleurs** : Les fleurs sont unisexuées et situées aux extrémités des rameaux. Les chatons mâles sont de couleur jaune à marron clair, chargés de pollen, et peuvent être allergisants.
- **Écorce** : L'écorce est grise-brun, fibreuse, sillonnée verticalement avec des crêtes filamenteuses disposées par paires opposées à l'extrémité des rameaux écailleux.
- **Fruits** : Les fruits sont des cônes coniques, sphériques, de 3 à 4 cm de diamètre, verts et brillants, avec de légères épines à leurs extrémités [14].



**Figure I. 3.** Les différentes parties de la plante *Cupressus sempervirens* L. [(A) : plante complète, (B) : feuille, (C) : fleur, (D) : écorce, (E) : fruits[15].

La classification de Cyprès, *Cupressus Sempervirens L.* est représentée sur le **Tableau 1.3**

**Tableau I. 3.** Classification systématique du cyprès [16].

|                            |                                   |
|----------------------------|-----------------------------------|
| <b>Embranchement</b>       | Spermaphytes ou phanérogames      |
| <b>Sous- embranchement</b> | Gymnospermes (graine nue)         |
| <b>Classe</b>              | Pinopsida                         |
| <b>Ordre</b>               | Pinales                           |
| <b>Famille</b>             | Cupressacées                      |
| <b>Genre</b>               | Cupressus                         |
| <b>Espèce</b>              | <i>Cupressus sempervirens. L.</i> |

### I.1.2.1. Dénomination

*Cupressus sempervirens L.*, connu sous le nom de cyprès méditerranéen, est aussi connue sous diverses appellations, comme illustré dans le **Tableau I.4**.

**Tableau I. 4.** Diverses appellations de cyprès [16].

|                    |                                                                                             |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Français</b>    | cyprès d'Italie, cyprès de Montpellier, cyprès de Provence, cyprès pyramidal, sempervirent. |
| <b>Anglais</b>     | Italiancypress.                                                                             |
| <b>Allemand</b>    | EchteZypresse                                                                               |
| <b>Néerlandais</b> | Italiaanse Cipres                                                                           |
| <b>Espagnol</b>    | Cipréscomún, ciprésfino, xifrer, xiper                                                      |
| <b>Italien</b>     | cipressocomune Arabe sarwel                                                                 |
| <b>Arabe</b>       | sarwel, سرول                                                                                |

### I.1.2.2. Origine

Le nom du genre *Cupressus* vient du latin, qui désigne le genre, et du grec "Kuparissos", qui signifie l'espèce. Certains auteurs pensent que le nom pourrait plutôt venir de Chypre, suggérant que le cyprès est originaire de cette île. Le nom d'espèce *sempervirens* signifie "toujours vert" en latin, composé de "semper" (toujours) et "virens" (vert). Le cyprès méditerranéen (*Cupressus sempervirens*) est une espèce d'arbre conifère de la famille des Cupressaceae, originaire des régions tempérées chaudes de l'hémisphère nord, notamment du bassin méditerranéen[16].

### I.1.2.2. Répartition géographique

- Dans le monde

Le cyprès sempervirent est originaire de la région méditerranéenne et du Moyen-Orient. Il est présent à l'état naturel ou naturalisé dans plusieurs régions comme l'Afrique du Nord (Tunisie, Algérie, Maroc), l'Europe du Sud (Grèce, Italie, Espagne, Corse, Sardaigne), l'Asie occidentale (Iran, Palestine, Jordanie, Liban, Syrie, Irak, Turquie[14].



**Figure I. 4.**Aire et répartition du cyprès dans le monde[17].

En Algérie, les relevés botaniques démontrent une richesse et une diversité floristique importante. Les groupements forestiers diffèrent selon les secteurs et même à l'intérieur d'un même secteur. Les bosquets de l'Atlas algérien contiennent des Cupressinées, avec le genre *Cupressus* présent principalement en arbres solitaires ou d'ornement, à l'exception de quelques rares petites formations[14].

### I.1.2.3.Composition

Le cyprès est riche en composés flavonoïdes tels que les cupressuflavones, les aménoflavones, la rutine, la quercitrine, la quercitrine et la myricitrine. De plus, il contient des composés phénoliques, notamment les anthocyanidines, les catéchines, les flavones, les flavonols et les isoflavones. Les tanins présents incluent l'acide ellagique, l'acide gallique, les phénylisopropanoïdes, l'acide caféique,

l'acide coumarique et l'acide férulique. Les branches contiennent des biflavonoïdes riches en monoterpènes et huiles essentielles, tandis que les cônes contiennent 0,5% d'huile essentielle. Les feuilles et les fruits de cette plante sont très riches en tanins et en flavonoïdes, mais ne contiennent pas d'alcaloïdes et sont pauvres en saponines[16].

#### **I.1.2.4.Utilisation de cyprès**

Le cyprès est effectivement une plante médicinale aux multiples bienfaits, en plus de son utilisation ornementale et son bois de qualité. Ses rameaux et cônes sont les parties les plus utilisées en phytothérapie et aromathérapie grâce à leurs composants actifs avec des propriétés antivirales contre certains virus comme l'herpès, la grippe A et le coronavirus. Les flavonoïdes ont aussi des effets anti-inflammatoires et sont utiles contre les troubles veineux et hémorroïdaires. Les graines séchées sont utilisées pour traiter les inflammations, maux de dents, ulcères, ecchymoses, éruptions cutanées et érysipèle.

Les rameaux de cyprès contiennent des huiles essentielles (HEs), flavonoïdes et autres composés phénoliques. L'HE du cyprès a des propriétés antiseptique, astringente, antispasmodique, anti-inflammatoire, balsamique, aromatique et antimicrobienne. Elle est aussi antispasmodique, hémostatique, diurétique, tonique, apaisante, neutralisante des odeurs et purifiante pour les vaisseaux sanguins[18].

#### **I.1.2.5.Activités pharmacologiques**

Le cyprès possède diverses activités biologiques, notamment des propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antioxydants et antidiabétiques[15].

## I.2. Techniques d'extraction des plantes médicinales.

L'extraction est une étape essentielle employée dans divers secteurs industriels, tels que la pharmacie, la cosmétique, la parfumerie et l'agroalimentaire. Cette méthode de séparation repose sur le transfert de matière entre une phase solide, contenant la substance à extraire, et un solvant liquide d'extraction. L'objectif est d'isoler et de séparer un ou plusieurs composants du mélange solide- solvant[19].

Il existe plusieurs méthodes d'extraction qui sont choisies en fonction de la plante et la fragilité de ses composants.

### I.2.1. Infusion

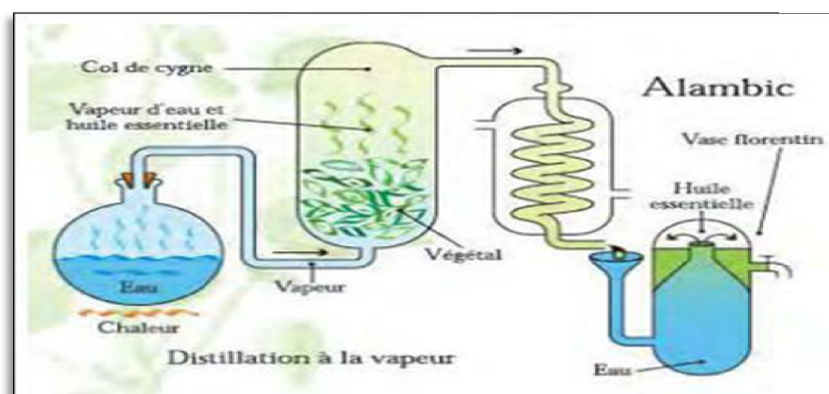
Cette technique consiste à verser de l'eau bouillante sur la partie de la plante utilisée, en couvrant le mélange pour éviter la volatilisation des principes actifs, puis en laissant la préparation refroidir [20].

### I.2.2.Décoction

Elle est destinée aux espèces ou parties de plantes assez coriaces, telles que les rameaux, les racines et les écorces. Cette méthode consiste à faire bouillir la partie de la plante utilisée, qu'elle soit sèche ou fraîche, dans de l'eau pendant quelques minutes[21].

### I.2.3.Distillation

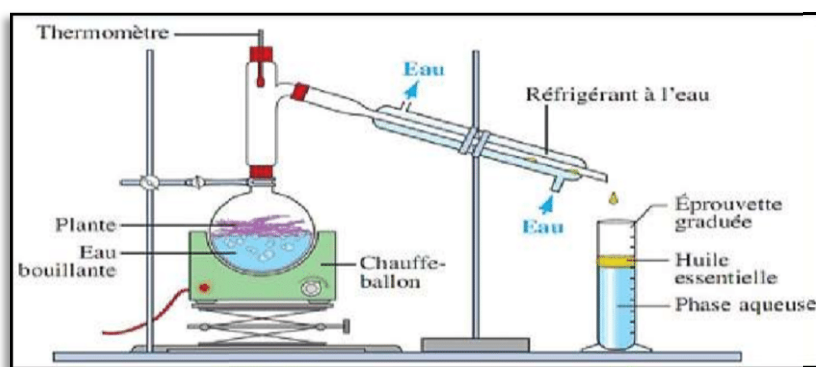
Actuellement, la distillation à vapeur saturée est la méthode la plus couramment utilisée dans l'industrie pour obtenir des HEs à partir de plantes aromatiques ou médicinales. Dans ce procédé(**Figure I.5**), la matière végétale n'entre pas en contact avec l'eau ; la vapeur d'eau est injectée à travers la masse végétale disposée sur des plaques perforées, sous pression atmosphérique[22].



**Figure I. 5.**Distillation ou l'obtention d'huile essentielle [23].

### I.2.4. Hydro distillation

Le principe de l'hydrodistillation repose sur une distillation hétérogène. Ce procédé consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau, puis à porter l'ensemble à ébullition (**Figure I.6**), généralement à pression atmosphérique. La température d'ébullition du mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chaque constituant est égale à la pression d'évaporation, ce qui la rend inférieure aux points d'ébullition des substances pures. Ainsi, le mélange "eau + huile essentielle" distille à une température inférieure à 100°C à pression atmosphérique[24].

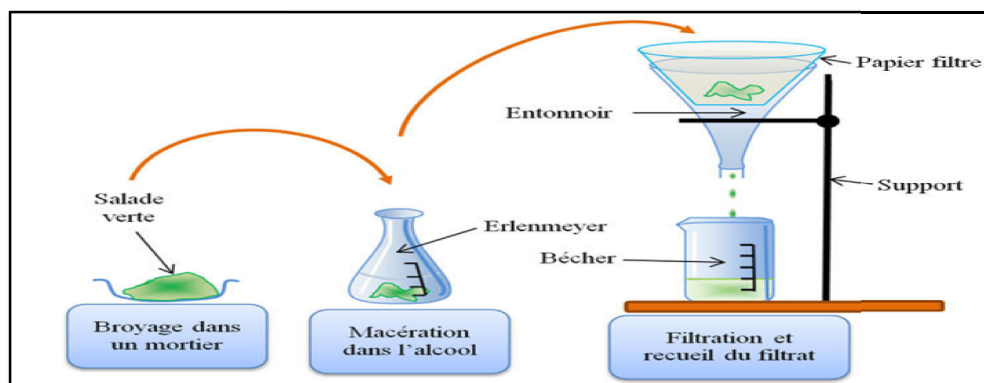


**Figure I. 6.**Extraction par hydro-distillation [25].

### I.2.5.Macération

La macération (**Figure I.7**) consiste en une infusion à froid dans un solvant. Pour ce faire, la matière végétale est placée avec l'ensemble du solvant d'extraction dans un récipient fermé, puis laissée à reposer pendant un certain temps. Ensuite, le mélange est filtré et le marc pressé. Les extraits liquides obtenus sont alors combinés. La clarification de la préparation se fait par précipitation ou filtration.

La macération peut présenter certains inconvénients, notamment en termes de fermentation ou de contamination bactérienne, surtout si le solvant utilisé est l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation rapide des molécules actives[26].



**Figure I. 7.**Étapes de macération [27].

### I.3. Crèmes pour application cutanée

Les préparations semi-solides sont des formulations homogènes conçues pour être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses. Elles sont formulées dans le but d'exercer une action locale ou transdermique des principes actifs, ou encore d'offrir une action émolliente ou protectrice [28].

Les formes galéniques destinées à la voie cutanée sont extrêmement nombreuses, on distingue ; Pommades ; Gels, Emulsions, Crème...

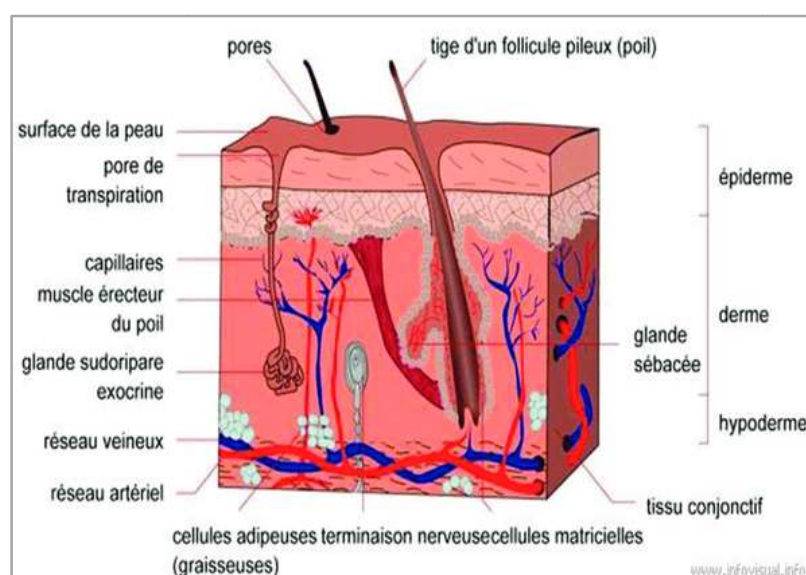
#### I.3.1. Peau humaine

##### I.3.1.1. Définition

La peau, un tissu hautement vascularisé, enveloppe le corps humain avec une superficie d'environ 2 mètres carrés (m<sup>2</sup>) et un poids moyen d'environ 4 kilogrammes (kg), représentant près de 16% de la masse totale de l'individu.

Elle se compose de trois couches distinctes d'origines embryologiques différentes : l'épiderme, d'origine ectodermique, est recouvert par le film hydrolipidique de surface ; le derme ; et l'hypoderme, d'origine mésodermique.

Des appendices dermiques sont également présents, notamment les glandes sébacées qui accompagnent les follicules pileux, ainsi que les glandes sudoripares[29].



**Figure I. 8.**Structure de la peau [30].

### I.3.1.2. Pénétration à travers la peau

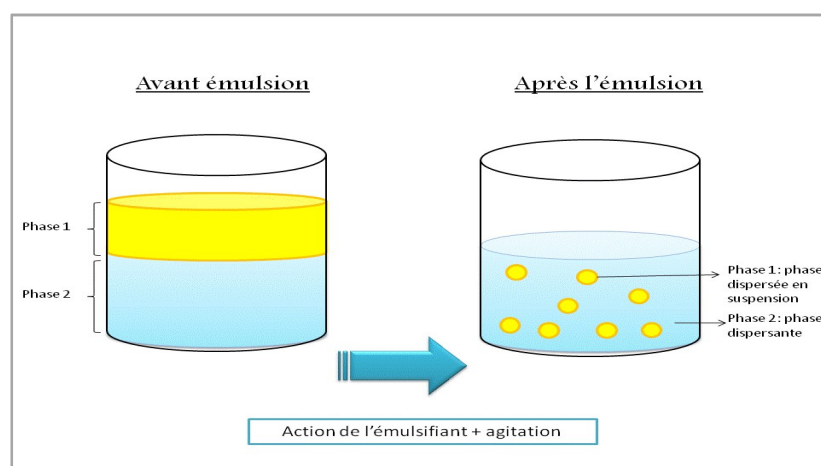
Le mécanisme de diffusion à travers la couche externe de la peau, le stratum corneum, est un processus passif qui repose sur le gradient de concentration, allant des zones les plus concentrées vers les moins concentrées. Les substances absorbées doivent présenter une petite taille, un degré élevé de non-ionisation et des propriétés lipidiques favorisant leur transport intracellulaire. En cas de propriétés hydrophiles de la substance, une diffusion plus profonde peut se produire par voie transcellulaire [31].

### I.3.3. Crèmes

Les crèmes sont des préparations dermatologiques multiphasiques, composées d'au moins deux phases liquides non miscibles : une phase hydrophile ou aqueuse et une phase lipophile ou huileuse. Leur utilisation répond à divers objectifs, tels que la préservation ou l'amélioration de l'aspect esthétique de la peau en la rendant plus souple et fraîche, la protection contre les agents extérieurs, l'apport en eau ou en matières grasses, le nettoyage, ou encore la confération d'une action spécifique[32].

### I.3.4. Emulsions

Une émulsion est définie comme la dispersion de deux phases liquides non miscibles. C'est un mélange de solutions lipophile et hydrophile caractérisé par la présence de deux phases distinctes, l'une étant dispersée dans l'autre (voir **Figure I.9**). La phase formant des gouttelettes est appelée phase dispersée ou phase discontinue, tandis que le second liquide est désigné comme la phase dispersante ou la phase continue. Comme les émulsions font partie des colloïdes, la taille des gouttelettes se situe généralement entre le micromètre et le nanomètre[33].



**Figure I. 9.**Phase dispersée et phase dispersante d'une émulsion [30].

### I.3.4.1.Type d'émulsion

#### A. Selon la phase dispersée

##### ❖ Macros émulsions

Le diamètre moyen des émulsions classiques est généralement supérieur ou égal au micromètre. En raison de leur taille et en fonction de la viscosité de la phase continue, les gouttelettes des émulsions ont tendance à se sédimenter (ou à crêmer) sous l'effet de la gravité[29].

##### ❖ Nano/mini émulsions

Les termes "nanoémulsions" et "microémulsions" sont utilisés pour désigner des systèmes diphasiques dont la taille des gouttelettes est comprise entre 20 et 200 nanomètres. En raison de leur petite taille, les nanoémulsions apparaissent transparentes ou translucides à l'œil et sont stables vis-à-vis de la sédimentation ou du crémage[31].

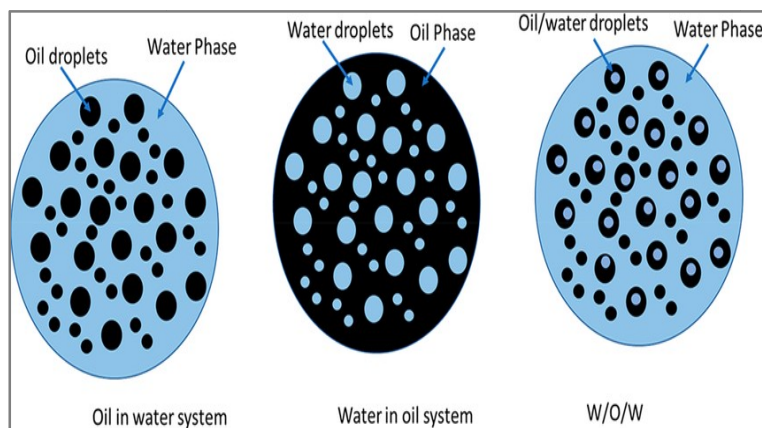
##### ❖ Microémulsions

Il s'agit d'émulsions simples dans lesquelles les particules dispersées sont si fines qu'elles semblent être solubilisées dans la phase aqueuse. En effet, la taille des particules, qui est comprise entre 10 et 100 nanomètres (nm), confère une transparence aux préparations et favorise une meilleure pénétration des substances actives à travers la couche cornée de la peau[31].

#### B. Selon la nature de la phase dispersante

Il existe plusieurs types d'émulsions (**Figure I.10**) selon la dispersion des phases aqueuses et huileuses

- ❖ Les émulsions simples sont appelées eau-dans-huile (E/H) lorsque des gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse, et huile-dans-eau (H/E) dans le cas inverse.
- ❖ Les émulsions multiples peuvent être classées en h/E/H ou e/H/E, où h (ou e) indique la phase la plus interne et H (ou E) indique la phase la plus externe. Les phases h et H, ou e et E, peuvent être identiques ou différentes. Les biémulsions sont des émulsions contenant deux phases internes de gouttelettes différentes, soit de même nature (mais de taille différente), soit de nature différente (quelle que soit la taille). Ce type d'émulsion est utilisé lorsque deux composants compatibles sont présents dans la même phase H ou E[34].

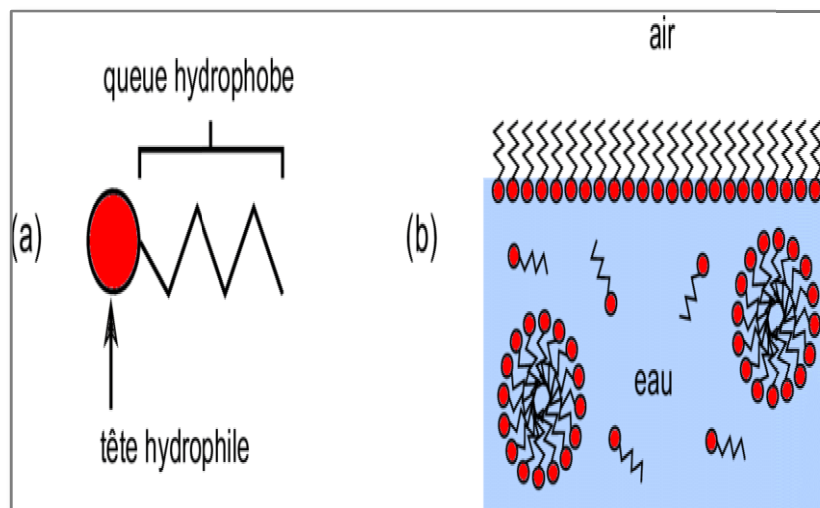


**Figure I. 10.** Les différents types d'émulsions [35].

#### I.3.4.2. Emulsifiant

Un émulsifiant (**Figure I.11**), également connu sous divers noms tels que tensioactif, détergent, agent mouillant ou surfactant, est une substance chimique particulière. Il est caractérisé par son amphiphile, c'est-à-dire qu'il présente deux parties ayant des polarités différentes : l'une est lipophile, constituée d'une chaîne hydrocarbonée apolaire, tandis que l'autre est hydrophile, contenant des hétéroatomes (O, P, S et N) polaires.

Les tensioactifs confèrent à l'émulsion sa stabilité, en réduisant la tension interraciale[36].



**Figure I. 11.** Schéma d'un tensioactif [37].

#### I.3.5. Procédure de fabrication d'une crème

Pour fabriquer l'émulsion, il est primordial d'effectuer deux étapes successives :

- Le mélange-dispersion qui sert à la mise en suspension des gouttelettes de la phase dispersée dans la phase dispersante.

- Homogénéisation par l'utilise des disperseurs (turbine, hélice) et homogénéisateurs (rotor-stator) [34].

A la fin, pour assurer la qualité de la crème on doit assurer certain paramètres qui sont résumés dans le **Tableau I.5.**

**Tableau I. 5.**Essais pharmaco-techniques des crèmes [38].

|                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Caractéristiques organoleptiques                | odeur et couleur                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Homogénéité                                     | Examen macroscopique<br>Microscopique                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Type des émulsions                              | Méthode de dilution<br>Mesure de la conductivité électrique<br>Méthode des colorants                                                                                                                                                                                                                          |
| Consistance                                     | Viscosité<br>Dureté                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Force d'extrusion                               | c'est la force nécessaire pour expulser une quantité de la pommade à partir d'un tube.                                                                                                                                                                                                                        |
| Capacité d'étalement                            | mesure de la surface d'étalement en exerçant une force bien déterminée.                                                                                                                                                                                                                                       |
| Détermination du PH                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Stérilité                                       | tester la qualité microbiologique                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Essai de diffusion ou de biodisponibilité       | Il se fait par la cellule de Franz.                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Uniformité de masse                             | le test est réalisé sur 20 pots. Le lot est conforme si pas plus de deux valeurs sont en dehors des limites $[m-x, m+x]$ et aucune des valeurs est en dehors du double de ce pourcentage $[m-2x, m+2x]$ . $X=10\%$ la masse moyenne.                                                                          |
| Uniformité de teneur (dosage du principe actif) | le test est réalisé sur 10 pots. Le lot est conforme si toutes les valeurs sont dans l'intervalle $[85\%, 115\%]$ . Si une valeur est en dehors de cet intervalle mais aucune n'est en dehors de $[75\%, 125\%]$ on doit refaire sur 10 pots où aucune valeur ne doit dépasser l'intervalle $[85\%, 115\%]$ . |

## **I.4. Brûlures cutanées**

Les brûlures sont un problème de santé publique mondial de grande importance, responsable de nombreux décès chaque année, principalement dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Il est essentiel de traiter les brûlures de manière appropriée et de prévenir ces lésions pour réduire les complications et les décès [39].

### **I.4.1. Définition**

La brûlure cutanée est définie comme une destruction partielle ou totale du revêtement cutané, parfois même des structures sous-jacentes, causée par un agent thermique, chimique, électrique ou radiatif. Cette destruction peut entraîner des conséquences importantes sur l'organisme, tant physiques que psychologiques, en particulier dans le cas de brûlures graves[39].

### **I.4.2. Classification des brûlures**

Les brûlures sont classées en fonction de l'agent causal, qui peut être thermique, électrique, chimique, ou par irradiation. Voici la classification des brûlures par type d'agent causal :

- Brûlures thermiques
- Brûlures électriques
- Brûlures chimiques
- Brûlures par irradiations

### **I.4.3. Facteurs de gravité**

La gravité d'une brûlure dépend de plusieurs critères :

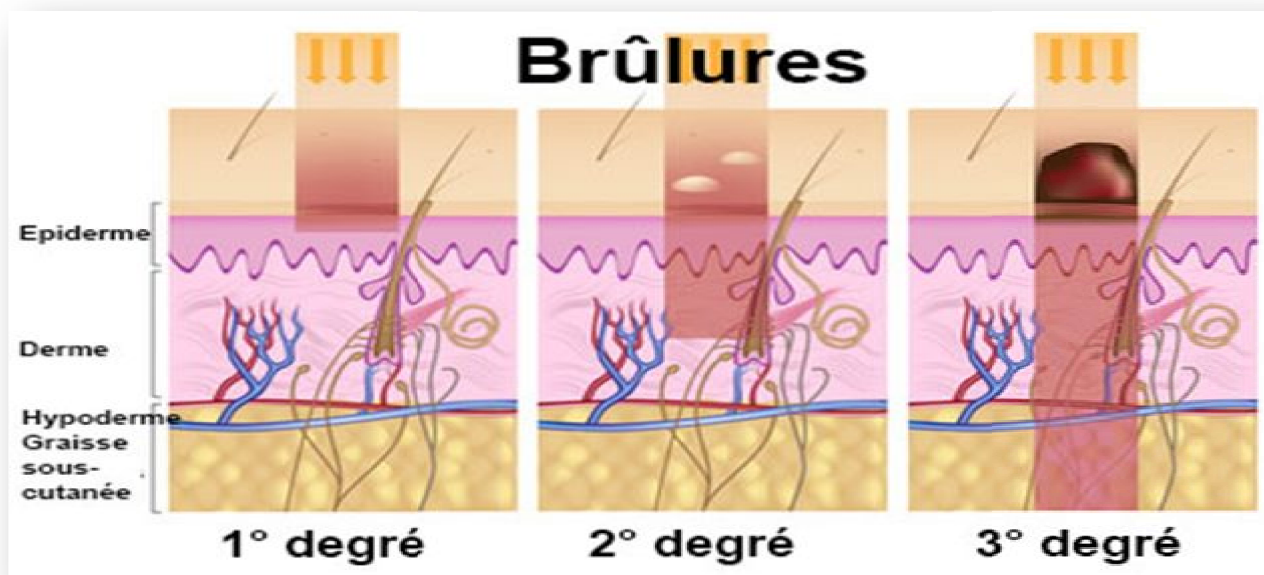
#### **I.4.3.1. Profondeur de la brûlure**

Une brûlure est considérée comme grave si sa surface est supérieure à la moitié de la paume de la main du patient, soit supérieure à 0,5% de la surface corporelle. Les brûlures des yeux, du nez, des mains, des orifices naturels, des organes génitaux ou de l'intérieur des cuisses sont les plus graves. Il existe quatre degrés de profondeur pour les brûlures décrits dans le **Tableau I.6** et la **Figure I.13**.

**Tableau I.6.** Profondeur des brûlures [39].

|                            |                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Premier degré              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Atteinte superficielle de l'épiderme, peau rouge, sèche et douloureuse (ex: coup de soleil).</li> <li>- Guérison en 3-6 jours sans cicatrice</li> </ul>                                      |
| Deuxième degré superficiel | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Peau très douloureuse, gonflée, rouge, suintante avec cloques.</li> <li>- Guérison spontanée en 10-14 jours sans séquelle</li> </ul>                                                         |
| Deuxième degré profond     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cloques blanches, derme pâle et peu sensible. Destruction de l'épiderme et du derme superficiel.</li> <li>- Cicatrisation longue (jusqu'à 35 jours).</li> </ul>                              |
| Troisième degré            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Peau cartonnée, blanche ou brunâtre, insensible.</li> <li>- Destruction de la peau en profondeur, atteinte des masses musculaires possible.</li> <li>- Greffe de peau obligatoire</li> </ul> |

La figure ci-dessous illustre les différents degrés des brûlures et leurs profondeurs correspondantes

**Figure I. 12.** Différent degrés des brûlures[40].

### I.4.3.2. Surface brûlée

Plus la brûlure est étendue, plus le retentissement général est important. La surface est exprimée en pourcentage de la surface corporelle totale, en tenant compte de toutes les brûlures.

### I.4.3.3. Localisation

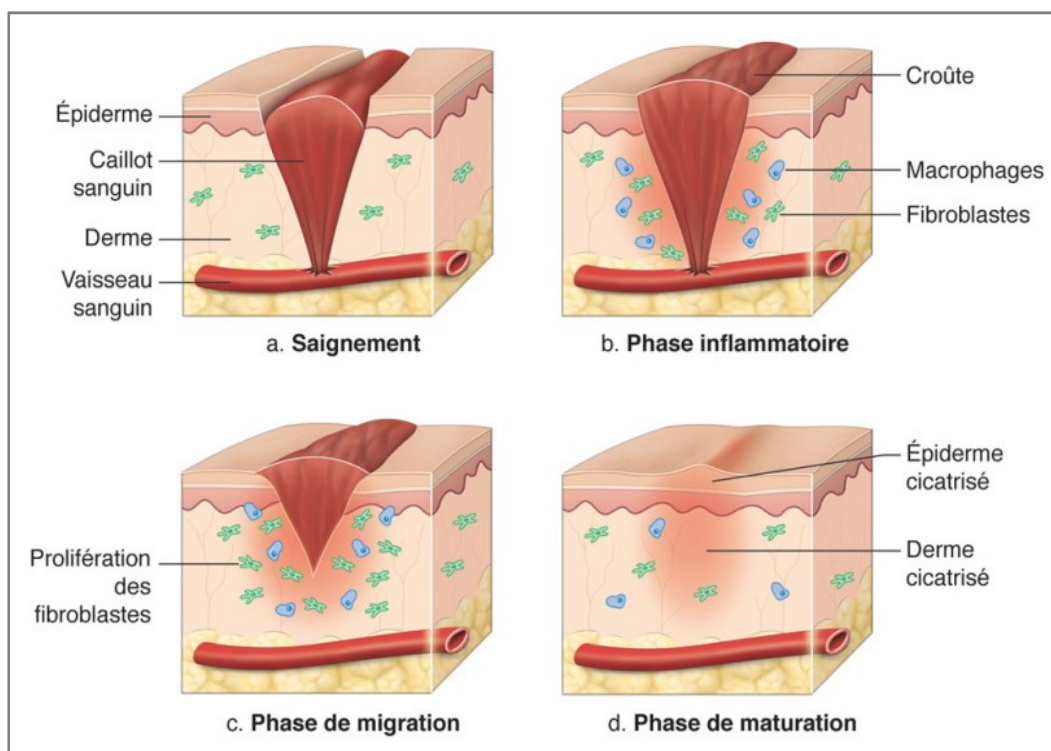
Le siège de la brûlure est important pour évaluer le pronostic vital, fonctionnel et esthétique.

### I.4.3.4. Terrain

Les âges extrêmes de la vie (nourrissons, personnes âgées) et les pathologies sous-jacentes sont des facteurs aggravants [39].

## I.4.4. Cicatrisation normale

La cicatrisation normale est un processus complexe qui se déroule en plusieurs étapes pour réparer les tissus lésés[39]. La **Figure 1.13** représente les étapes de cicatrisation d'une peau lésée.



**Figure I. 13.**Étapes de la cicatrisation de peau [40].

L'évolution de la cicatrisation dépend de plusieurs facteurs, qui peuvent être intrinsèques ou extrinsèques. En résumé, pour favoriser une cicatrisation optimale, il est important de prendre en

compte ces facteurs intrinsèques et extrinsèques et d'adopter des mesures appropriées pour soutenir le processus de guérison. Cela peut inclure une alimentation équilibrée, un contrôle adéquat du diabète et la gestion des médicaments qui pourraient interférer avec la cicatrisation [39].

### I.5. Plan d'expériences

La méthodologie des plans d'expériences (MPE) est une approche systématique de planification des expériences scientifiques et industrielles, conçue pour extraire des informations pertinentes liées à des objectifs spécifiques préétablis. L'analyse des données recueillies repose sur l'utilisation de méthodes statistiques[41].

Avec les plans d'expériences permettent d'obtenir le maximum d'informations avec le minimum d'expériences nécessaires. Pour y parvenir, il est essentiel de suivre des règles mathématiques précises et d'adopter une démarche méthodique et rigoureuse[42].

La réponse Y également appelée l'optimum en fonction des facteurs Xi est représentée

Par la formule mathématique suivante :

$$Y = f(x_1, x_2, x_3 \dots x_k) \quad (I.2)$$

#### I.5.1. Différent types des facteurs

Les facteurs sont les grandeurs supposées influencer sur les variations des réponses.

- Continu : ce type de facteur peut prendre n'importe quelle valeur numérique réelle dans un intervalle donné, tel que [binf, bsup]. Par exemple, les dimensions géométriques utilisées dans la construction de machines électriques, telles que l'épaisseur de la culasse ou la hauteur des dents, sont des exemples de facteurs continus.
- Discret : ce type de facteur peut prendre un nombre fini de valeurs, toutes situées dans un intervalle spécifique. Par exemple, le nombre d'encoches dans une machine électrique est un facteur discret.
- Qualitatif : ce type de facteur présente un ensemble fini de modalités, où les valeurs ne peuvent pas être comparées entre elles. Ces modalités peuvent inclure des types, des propriétés, ou d'autres caractéristiques distinctes. Par exemple des types, des propriétés...[43].

#### I.5.2. Types de plans d'expériences

On distingue trois grandes classes de plan d'expérience ;

- Les plans du premier degré : Ces plans, également appelés factoriels, sont d'une grande importance pratique, qu'ils soient complets ou fractionnaires.
- Les plans du second degré : Ils sont spécifiquement conçus pour les facteurs continus qui prennent plus de deux niveaux et dont l'interprétation est basée sur des modèles du second degré. Parmi eux, on trouve les plans composites, de Doehlert, Box-Behnken, et autres. Ces plans sont bien adaptés à une étude séquentielle des facteurs.
- Les plans des mélanges : Ces plans sont adaptés aux facteurs comportant des contraintes, tels que les concentrations des constituants d'un mélange. Ils ne s'appliquent qu'aux facteurs continus[44].

### 1.5.3. Plan Box Behnken

Le plan de Box-Behnken est un plan de second ordre rotatif qui repose sur des plans factoriels incomplets à trois niveaux. Sa disposition particulière des niveaux permet d'augmenter le nombre de points du plan tout en contrôlant le nombre de coefficients polynomiaux. Par exemple, pour trois facteurs, le plan peut être construit en trois blocs de quatre expériences, chacun composé d'une expérience complète et de trois expériences représentant un plan factoriel à deux niveaux, le niveau du troisième facteur étant fixé à zéro.

Ces plans sont construits en combinant des plans factoriels à deux niveaux avec des plans incomplets de blocs, ce qui les rend dépourvus de générateurs de plan simples et confère des interactions complexes. Néanmoins, leur économie en termes de ressources les rend particulièrement utiles lorsque les essais expérimentaux sont coûteux.

- Avantages économiques et donc particulièrement utiles lorsque les essais expérimentaux à réaliser sont coûteux[45].

Le plan de Box-Behnken nécessite un nombre d'expérience selon l'équation (eq) suivante :

$$N = k^2 + k + cp \dots \dots \dots (I.3)$$

Où K est le nombre de facteurs et cp le nombre de répétitions du point central.

Le plan de Box-Behnken est un plan sphérique et rotatif. Si on le visualise comme un cube, il comprend un point central, ainsi que les points centraux et médians des arêtes (**Figure I.14**).

Pour le plan expérimental Box-Behnken à trois niveaux et trois facteurs, un total de 15 essais

expérimentaux[46].

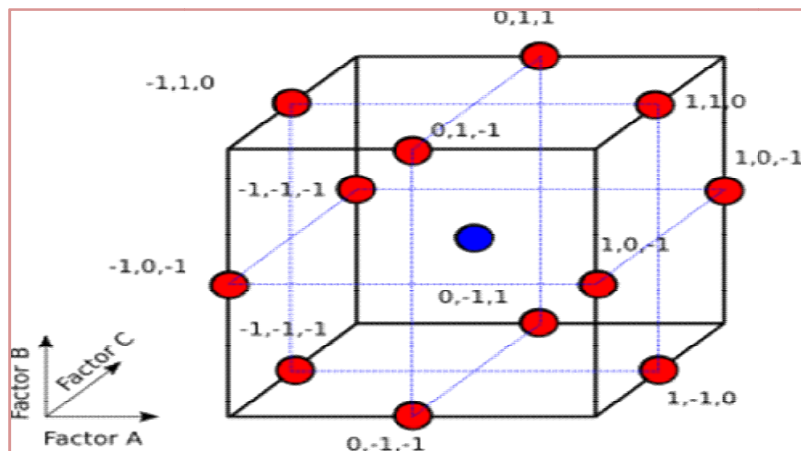


Figure I. 14. Plan Box-Behnken à 3 facteurs [47].

#### I.5.4. Validation des modèles

L'analyse de la variance (terme souvent abrégé par le terme ANOVA : analysis of variance) est une méthode statistique permettant de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population. Ce test s'applique lorsque l'on mesure une ou plusieurs variables explicatives catégorielles (appelées alors facteurs de variabilité, leurs différentes modalités étant parfois appelées « niveaux ») qui influencent la distribution d'une variable continue à expliquer[48].

##### I.5.4.1. Analyse de variance (ANOVA)

L'ANOVA est utilisée pour la détermination de la signification d'un effet ou d'un modèle mathématique. Elle est basée sur le calcul de l'écart total entre les différentes mesures  $Y_i$  du plan d'expériences et la moyenne de ces mesures.

Parmi la grandeur utiliser pour la validation du modèle :

- SCEL : la somme des carrées des écarts dus à la liaison (eq. I.4).
- SCER : la somme des carrées des écarts des résidus (eq. I.5).

$$SCEL = \sum (Y_{i \text{ est}} - Y_{\text{moy}})^2 \quad (\text{I.4})$$

$$SCER = \sum (Y_{\text{exp}} - Y_{i \text{ est}})^2 \quad (\text{I.5})$$

- La somme des carrées des écarts totale SCET est donnée par :

$$SCET = \sum (Y_{exp} - Y_{moy})^2 = SCEL + SCER \quad (I.6)$$

Avec

- $Y_i$  est la valeur prédite du modèle linéaire
- $Y_{exp}$  correspond à la réponse.
- $Y_{moy}$  la moyenne des réponses expérimentales
- CM (carré moyen) qui est représenté par le rapport de  $=SCE/DDL$ .

Pour la comparaison de deux moyennes provenant des échantillons indépendants, le test t de Student est utilisé. Si on a plus de deux échantillons indépendants, le test F permet de comparer le  $F_{obs}$  pour un risque donné et fixé avec un  $F_{critique}$  déterminé à partir du tableau de Fisher[17]. (**Tableau I.6**)

**Tableau I. 6.**Table d'ANOVA.

| Variation due à | SCE  | DDL | Carrée moyen      | F                      |
|-----------------|------|-----|-------------------|------------------------|
| Liaison         | SCEL | p-1 | SCEL/ p-1=<br>CML | $F_{obs} =$<br>CML/CMR |
| Résidus         | SCER | n-p | SCER/ n-p=<br>CMR |                        |
| Totale          | SCET | n-1 | SCET/ n-1=<br>CMT |                        |

Si :  $F_{obs} < F_{crit}$ , le modèle linéaire est non valide.

Si :  $F_{obs} > F_{crit}$ , le modèle linéaire est valide.

- Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) est un indicateur qui permet de juger la qualité d'une régression linéaire. Il varie entre 0 et 1, plus le  $R^2$  est proche de 1 plus le modèle linéaire est valide. Pour mieux déterminer la qualité descriptive du modèle, on a recours au coefficient de détermination ajusté ( $R^2_{ajust}$ ) (eq I.7 et I.8) [45].

$$R^2 = SCEL / SCET \quad (I.7)$$

$$R^2_{adj} = 1 - CMR / CMT \quad (I.8)$$

# CHAPITRE II

## MATERIEL ET METHODES

## **CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES**

L'objectif de cette étude est de déterminer comment les activités antioxydants, antifongiques et antibactériennes de deux plantes médicinales peuvent être combinées pour formuler une crème anti brûlure à usage cutané. Dans ce chapitre on va illustrer en détail la méthodologie expérimentale suivie au cours de cette étude, en présentant tout le matériel et les produits utilisés, les techniques réalisées ainsi que les tests effectués. L'étude expérimentale divisée en quatre parties fondamentales : La première partie traite des méthodes d'extraction, la deuxième est dédiée à l'optimisation selon le plan de Box-Behnken, la troisième évalue les activités biologiques, et la dernière partie se concentre sur la formulation et la caractérisation de la crème.

### **II.1. Matériel**

#### **II.1.1. Matériel du laboratoire**

- Verrerie (entonnoir, erlenmeyers, béchers, éprouvettes, pipette graduée, entonnoirs en verre, tubes à essai, spatule, ...).
- Micropipette (100  $\mu$ l et 1000  $\mu$ l).
- Embouts jaune et bleu.
- Eppendorf.
- Microplaque 96 puits.
- Barrots magnétiques.
- Tamis.
- Support de burette.
- Disques en papier Whatman N°1 stériles.
- Papier aluminium.
- Ecouvillons.
- Boites de pétrie.
- Mortier et pilon en porcelaine
- Milieux de culture (Miller-Hinton, Sabouraud, Gélose nutritive)
- Seringues Hamilton (Bonaduz, Suisse)

### II.1.2. Equipements

**Tableau II. 1.**Différent matériel utilisé avec leur référence.

| Equipements                               | Référence                                        |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Balance KERN                              | PCB 350-3                                        |
| Réfrigérateur                             | KIR-10444                                        |
| Cuves à ultrasons                         | ELMASONIC P 30 H                                 |
| Etuve                                     | US Pat 4585923                                   |
| Balance de précision                      | PR224                                            |
| Autoclave                                 | HVE-50                                           |
| Broyeur                                   | KSW 445 CB                                       |
| Spectrophotomètre UV-visible              | UV-1601 220V                                     |
| Plaques chauffante agitatrice             | MS-H-S                                           |
| Bain-marie chauffant.                     | 1021 – BAIN-MARINE KOTTERMANN<br>3043 D'OCCASION |
| Bec Benzène                               | 116.117154.16                                    |
| PH mètre                                  | AB23PH                                           |
| Lecteur microplaque                       | MCV0422                                          |
| Appareil à filtration sous vide en verre. | VDE 0530                                         |
| Clevenger                                 | EM0500/CE                                        |
| Viscosimètre                              | DV-I prime                                       |
| Centrifugeuse                             | DM0412                                           |
| Agitateur à tige numérique                | os40-pro                                         |

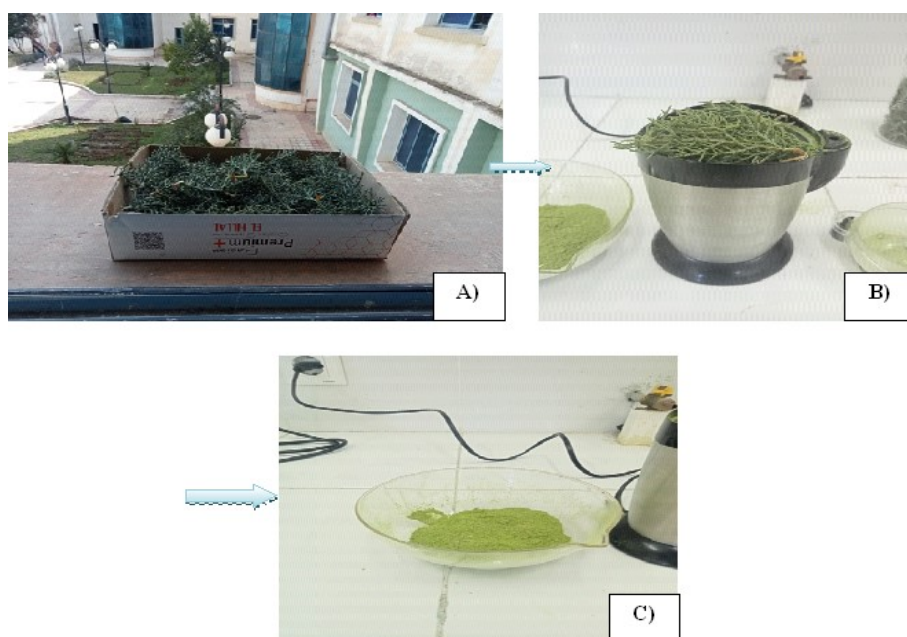
### II.1.3. Logiciels

- ✓ Design.Expert 0.8
- ✓ Microsoft office excel 2007

### II.1.4. Matière végétale

La récolte des feuilles du cyprès a été effectuée au mois de février 2024. Les racines de la deuxième plante la cardoncelle bleue ont été achetées auprès d'un herboriste. Les feuilles et

les racines sont lavées à l'eau du robinet, puis rincées à l'eau distillée. Les racines sont épluchées puis ont été découpées en petits morceaux avant d'être séchées à l'ombre. Une fois séchée, la matière végétale de chaque plante est broyée, puis tamisée à l'aide d'un tamis de 560 mm. La poudre obtenue de chaque plante est conservée à l'abri de la lumière et de l'humidité dans des flacons en verre stériles hermétiquement fermés. Les figures II.1. Et II.2. illustrent les étapes de préparation de la matière végétale de chaque plante.



**Figure II. 1.** Préparation de la drogue du cyprès [A) Récolte ; B) Broyage ;C) Poudre].



**Figure II. 2.** Préparation de la drogue de la cardoncelle bleue [A) Récolte ; B) Epluchage ; C) Découpage ; D) Poudre].

### II.1.5. Produits

Tous les solvants, réactifs et produits avec leurs caractéristiques sont regroupés dans le **Tableau II.2.**

**Tableau II. 2.** Solvants, réactifs et produits utilisés.

| Produits                                                            | Masse molaire (g/mol) | Pureté (%)          | CAS                 |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
| Folin-Ciocalteu                                                     | 260.20                | 260.20              | 260.20              |
| Acide gallique                                                      | 170.12                | -                   | 149-91-7            |
| Carbonate de sodium (NaCO <sub>3</sub> )                            | 105.99                | ≥ 99                | 497-19-8            |
| 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle (DPPH)                               | 394.32                | /                   | 1898-66-4           |
| acide 2,2'-azino-bis (3-éthyl benzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) | 514.62                | /                   | 30931-67-0          |
| Phénantroline                                                       | 180.21                | ≥ 99                | 9966-71-7           |
| Chlorure de fer (FeCl <sub>3</sub> )                                | 162.20                | ≥ 99                | 7705-08-0           |
| Tri-chloro acetic acid (TCA)                                        | 163.38 ≥ 99 76-03-9   | 163.38 ≥ 99 76-03-9 | 163.38 ≥ 99 76-03-9 |
| Huile de paraffine                                                  | -                     | ≥ 98 8042-47-5      | ≥ 98 8042-47-5      |
| Acidestéarique                                                      | 284.48                | -                   | 57-11-4             |
| Span 80                                                             | 428.60                | -                   | 1338-43-8           |
| Glycérol                                                            | 90.09382              | ≥ 99                | 56-81-5             |
| Acidebenzoïque (C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> )      | 122                   | ≥ 99                | 65-85-0             |
| Tween 20                                                            | 1227.54               | -                   | 9005-64-5           |
| HPMC K 4M                                                           | -                     | 99.99               | 9004-65-3           |
| Ethanol                                                             | 46.07                 | ≥ 95                | 789                 |
| Méthanol                                                            | 32.04                 | ≥ 99                | 732                 |
| sulfate de sodium anhydre                                           | 142.04                | ≥ 99                | 7757-82-6           |

### II.1.6. Produits Souches bactériennes, fongiques et milieu de culture

L'activité antibactérienne des deux plantes est évaluée sur trois souches bactériennes à savoir : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. En plus, l'activité antifongique a été évaluée sur deux souches fongiques : *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* (FOL) qui provient de la collection d'unité de microbiologie appliquée du centre de recherche en biotechnologie (CRBT) et *Candida albicans* provenant du laboratoire de microbiologie du département de génie

pharmaceutique, Université Constantine 3. (Tableau II.3.)

**Tableau II. 3.** Souches bactériennes et fongiques utilisées.

|                   | Souche bactérienne           |                         |                               | Souche fongique         |                           |
|-------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Souche            | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> |
| Milieu de culture | Mueller-Hinton               | Mueller-Hinton          | Mueller-Hinton                | Sabouraud               | PDA*                      |
| Gram              | Positif                      | Négatif                 | Négatif                       | /                       | /                         |

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Extractions des huiles essentielles

#### a. Huile de cyprès

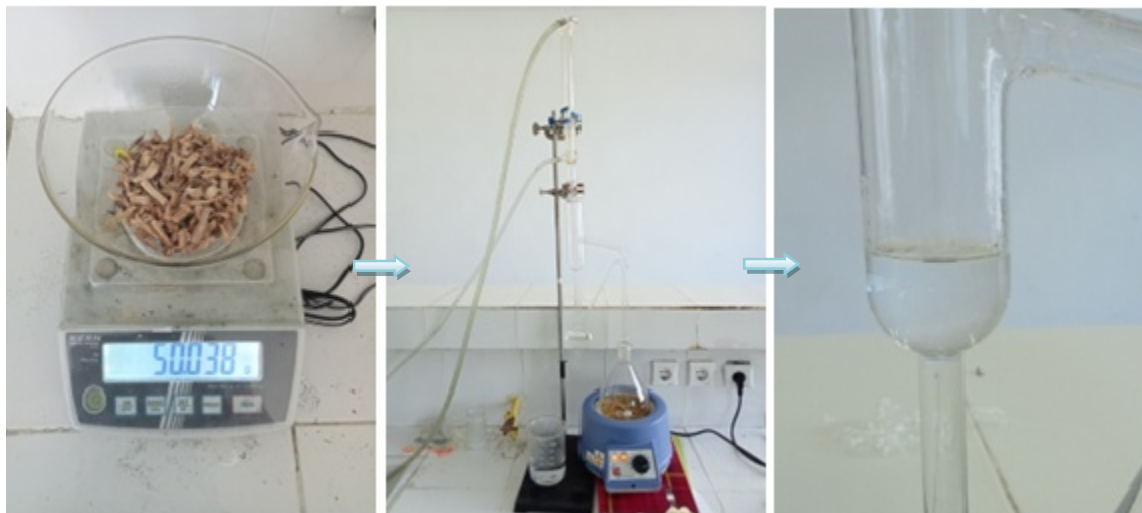
L'HE des feuilles de cyprès a été extraite à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger (**Figure II.3**). Pour cela, 70 g de matière végétale fraîche est mis en contact avec 750 ml de l'eau distillée dans un ballon (1L). Cette extraction a duré trois heures. L'HE obtenue a été desséchée en utilisant le sulfate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), puis stockée à l'obscurité à 4°C dans des flacons en verre opaque. Ce montage est constitué d'une chauffe ballon, un ballon de 1L, une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant) et un collecteur en verre qui reçoit les extraits de la distillation. Le procédé fonctionne à la pression atmosphérique et il est équipé d'un système de recyclage permettant de maintenir le rapport masse/eau à son niveau initial.



**Figure II. 3.** Procédé d'extraction des huiles essentielles du cyprès.

### b. Huile de la cardoncelle

La même procédure a été utilisée pour l'extraction de la cardoncelle. (**Figure II.3**) et 50 g de matière végétale fraîche a été mise en contact avec 750 ml de l'eau distillée dans un ballon (1L).



**Figure II. 4.**Procédé d'extraction des huiles essentielles de *Carthamus caeruleus* L.

### Calcul du rendement

Le rendement en HE ( $R_{HE}$ ) est défini comme étant le rapport entre la masse de l'HE obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé en utilisant la formule suivante :

$$R_{HE} = \frac{M'}{M} \times 100 \dots\dots (II.1)$$

$R_{HE}$  : Rendement en huile essentielle en % ;  
 $M'$  : Masse d'huile essentielle en gramme ;  
 $M$  : Masse de la plante en gramme.

## II.2.2.Extractions par macération

### II.2.2.1.Préparation des extraits de plantes par macération

L'extraction des plantes *Cupressus sempervirens* L. et *Carthamus caeruleus* L. a été réalisée par macération de la poudre de chaque plante dans un mélange de solvant organique et d'eau.

Afin d'optimiser les rendements d'extraction, un plan d'expérimentation Box-Behnken a été employé. Trois variables ont été examinées : le pourcentage de solvant d'extraction (éthanol), le temps de contact et la quantité de poudre utilisée. Voici les étapes suivies lors de la procédure de macération :

- **Pesée** : Mesurer la quantité précise de matière végétale requise selon les paramètres définis par le plan Box-Behnken pour chaque test.
- **Préparation du solvant** : Utiliser une éprouvette pour préparer le mélange de solvant
- **Macération** : Mettre la poudre de plante dans 20 ml de la solution (éthanol : eau) dans un erlenmeyer. Agiter le mélange à une vitesse de 500 rpm à une température constante de 25°C pour une durée déterminée par les besoins de l'expérience.
- **Filtration** : Après la période d'agitation spécifiée, filtrer le mélange à l'aide d'un papier filtre pour séparer les solides des liquides.
- **Séchage** : Déposer le filtrat dans une boîte de Pétri et le laisser sécher jusqu'à évaporation complète du solvant.
- **Récupération** : La récupération de l'extrait s'effectue à l'aide d'une spatule, puis on le place dans un flacon pour la conservation à une température comprise entre 4°C et 6°C.

Les figures II.5 et II.6 représentent les étapes suivies lors de la macération des feuilles de cyprès et des racines de la cardoncelle, respectivement.



Figure II. 5. Procédure de la macération effectuée pour la plante *Cupressus sempervirens* L.



Figure II. 6. Procédure de la macération effectuée pour la plante *Carthamus caeruleus* L.

### II.2.2.1.1. Détermination du rendement de la masse extraite

Le rendement d'extraction peut être calculé à l'aide de la formule suivante :

$$R\%_{EX} = \frac{m}{m_0} \times 100 \dots\dots (II.2)$$

$R\%_{EX}$  : le rendement en pourcentage.

$m$  : la masse sèche de chaque extrait (g).

$m_0$  : la masse initiale (g).

Cette formule permet de déterminer l'efficacité de l'extraction en exprimant le poids de l'extrait obtenu en pourcentage du poids initial de la matière utilisée pour l'extraction.

### II.2.2.1.2. Optimisation du rendement de la macération par le plan Box Behnken

Dans le but de déterminer les conditions optimales pour obtenir un meilleur rendement d'une part et d'évaluer la signification des paramètres opératoires d'autre part, le plan de surface de réponse Box-Behnken a été réalisé en étudiant trois facteurs à trois niveaux chaque.

#### ✓ La matrice d'expérience

La matrice d'expérience générée par le plan Box-Behnken (**Tableau II.4**) a donné lieu à des résultats pour trois facteurs en appliquant la formule suivante :

$$N = k^2 + k + C_p \dots\dots (II.3.)$$

$$k = 3$$

$$C_p = 3, \text{ Donc}$$

$$N = 15 \text{ expériences}$$

**Tableau II. 4.** Matrice d'expérience générée par le plan Box-Behnken.

| Expériences | Valeurs codées |    |    |
|-------------|----------------|----|----|
|             | X1             | X2 | X3 |
| 1           | -1             | -1 | 0  |
| 2           | 1              | -1 | 0  |
| 3           | -1             | 1  | 0  |
| 4           | 1              | 1  | 0  |
| 5           | -1             | 0  | -1 |
| 6           | 1              | 0  | -1 |

|    |    |    |    |
|----|----|----|----|
| 7  | -1 | 0  | 1  |
| 8  | 1  | 0  | 1  |
| 9  | 0  | -1 | -1 |
| 10 | 0  | 1  | -1 |
| 11 | 0  | -1 | 1  |
| 12 | 0  | 1  | 1  |
| 13 | 0  | 0  | 0  |
| 14 | 0  | 0  | 0  |
| 15 | 0  | 0  | 0  |

### II.2.3. Caractérisation des huiles essentielles et des extraits des plantes

#### II.2.3.1. Analyse chromatographique des huiles essentielles

Les HEs des plantes étudiées peuvent être caractérisés de manière précise par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette technique permet d'identifier et de quantifier les différents composés présents dans l'huile, même en très faibles quantités. Lors de l'analyse GC-MS, l'échantillon de l'HE est vaporisé puis entraîné à travers une colonne chromatographique par un gaz vecteur inerte. Les différents composés de l'huile traversent la colonne à des vitesses différentes selon leur affinité avec la phase stationnaire. À la sortie de la colonne, un spectromètre de masse détecte et identifie chaque composé en fonction de son rapport masse/charge. Les résultats sont affichés sous forme de pics sur un chromatogramme, où chaque pic correspond à un composé spécifique, avec sa quantité relative représentée par la hauteur et l'aire du pic. L'analyse des HEs par GC-MS a été effectuée au niveau de l'École Nationale Polytechnique de Constantine. Les conditions opératoires détaillées de cette analyse sont répertoriées dans le **Tableau II.5**.

**Tableau II. 5.** Conditions opératoires des analyses par GC-MS pour les huiles essentielles.

|                                   |                                                                     |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>Colonne capillaire</b>         | En silice fondu, de longueur 60m et de diamètre intérieur de 0,25mm |
| <b>Phase stationnaire</b>         | DB5, épaisseur du film 0,25µm                                       |
| <b>Gaz vecteur</b>                | Hélium                                                              |
| <b>Détecteur</b>                  | MSD                                                                 |
| <b>Débit de gaz vecteur</b>       | 0,5ml/mn                                                            |
| <b>Température de colonne</b>     | 60 à 220°C à raison de 3°C/mn                                       |
| <b>Température de l'injecteur</b> | 220°C                                                               |
| <b>Volume injecté</b>             | 1µl                                                                 |

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| <b>Mode d'injection</b>     | Split 1/25 |
| <b>Energie d'ionisation</b> | 70 eV      |
| <b>Vide</b>                 | 35 mtorrs  |

#### II.2.4.Détermination du taux des polyphénols totaux des extraits

La détermination des concentrations des polyphénols s'effectue à l'aide de la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu qui est composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). La méthode de Folin-Ciocalteu repose sur l'oxydation des cycles phénoliques, associée à la réduction de l'acide phosphomolybdique [49].

Les propriétés colorimétriques du réactif de Folin-Ciocalteu changent lorsqu'il est complexé à certaines molécules. En réagissant avec les fonctions  $-OH$  des phénols, cette réaction entraîne le développement d'une coloration bleu foncé, permettant de déterminer la concentration en polyphénols en se référant à une courbe d'étalonnage établie à partir de concentrations connues [50].

La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par Müller et ses collaborateurs [51], avec quelques modifications.

✓ Pour tracer la courbe d'étalonnage, on suit les étapes suivantes :

- Des solutions étalons (10.25, 50, 75 et 100,  $\mu g/ml$ ) ont été préparées à partir d'une solution mère de l'acide gallique dans d'eau distillée (0.2 mg/ml).
- Une quantité de 400  $\mu l$  de chaque dilution est mélangée avec 2 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (1 ml de réactif dans 9 ml d'eau distillée)
- Après 3 minutes, ajout de 1,5 ml de carbonate de sodium ( $NaCO_3$ ) à 7,5%.
- Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 2 heures.
- L'absorbance est mesurée contre un blanc, à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 765 nm. (**Annexe 1**)

✓ Pour mesurer la teneur des extraits en polyphénols, on remplace les dilutions d'acide gallique par la solution d'extrait (1 mg d'extrait dans 1 ml d'eau distillée).

✓ Le blanc est également préparé de la même manière, en remplaçant l'extrait par l'eau distillée.

#### II.2.5.Détermination du taux des flavonoïdes des extraits

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) citée par Djeridane et al., [52] et Boudiaf, 2006 [53] est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits

✓ Pour tracer la courbe d'étalonnage, on suit les étapes suivantes :

- Des solutions étalons (10.25, 50, 75 et 100, µg/ml) ont été préparées à partir d'une solution mère de quercétine dans du méthanol (0.2 mg/ml).
  - 2 ml de chaque de chaque dilution est ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> (2% dans le méthanol).
  - Le mélange a été vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm a été lue après 10 minutes d'incubation.
- ✓ Pour mesurer la teneur des extraits en flavonoïdes, on remplace les dilutions de quercétine par la solution d'extrait (1 mg d'extrait dans 1 ml de méthanol)
- ✓ Le blanc est également préparé de la même manière, en remplaçant l'extrait par le méthanol.

### II.2.6. Etude de l'effet antioxydant

L'étude de l'effet antioxydant des extraits et des huiles obtenus de deux plantes, est effectuée *in vitro* en utilisant des réactions colorimétriques quantitatives. Les méthodes utilisées pour évaluer le pouvoir antioxydant incluent DPPH, ABTS, phénantroline et FRAP. Dans chaque cas, la capacité antioxydant est comparée à celle d'un antioxydant standard Trolox. (**Annexe 2**).

#### II.2.6.1. Méthode de DPPH

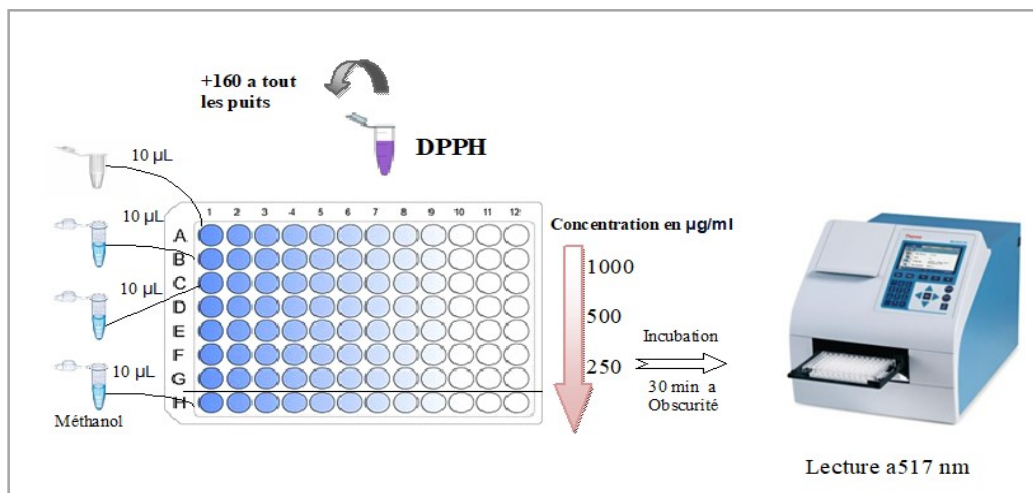
La méthode de DPPH (**Figure II.7**) consiste à mesurer l'activité de piégeage de DPPH des différents extraits et huiles. Dans une microplaque, 40 µl de l'extrait à différentes concentrations sont ajoutées à 160 µl de la solution de DPPH. Après incubation à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité, l'absorbance est lue à 517 nm et la capacité de piégeage du DPPH est déterminée par rapport au blanc en appliquant l'équation suivante :

$$DPPH_{Inhibition\%} = \frac{A_{blanc} - A_{échantillon}}{A_{blanc}} \times 100 \dots (II.4)$$

$A_{bla}$ : l'absorbance du blanc.

$A_{échantillon}$  : l'absorbance de l'échantillon.

La concentration inhibitrice 50 (CI<sub>50</sub>) (µg/ml) est déterminée graphiquement à partir de la droite de régression du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration.



**Figure II. 7.** Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydant "DPPH".

### II.2.6.2. Méthode d'ABTS

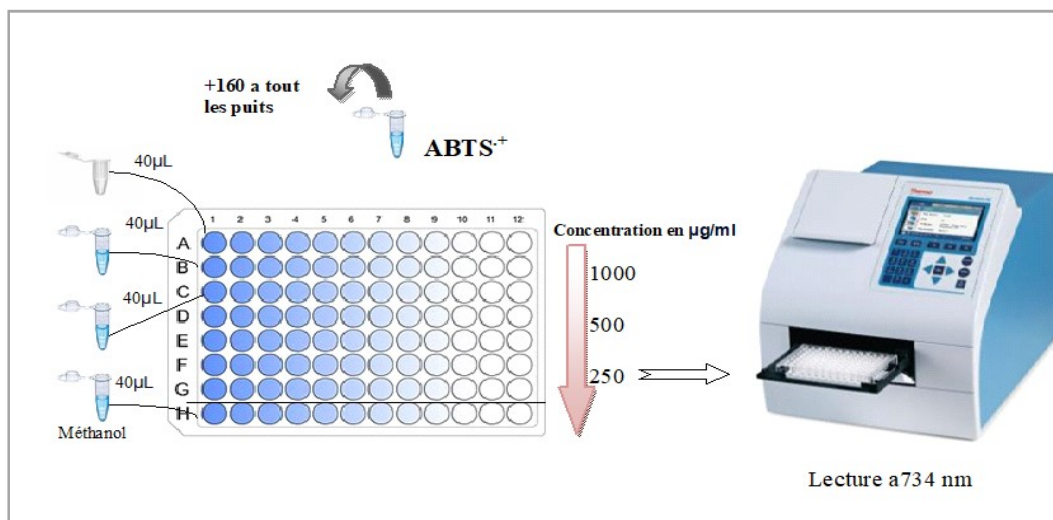
La méthode d'ABTS (**Figure II.8**) consiste à mesurer la capacité de piégeage de l'ABTS•+ des différents extraits et huiles. Dans une microplaque, 40 µl de l'extrait à différentes concentrations sont mélangés avec 160 µl de la solution d'ABTS•+. L'absorbance est lue à 734 nm après 5 min d'incubation à température ambiante, et la capacité de piégeage de l'ABTS•+ est déterminée par rapport au blanc en appliquant l'équation suivante :

$$ABTS_{Inhibition\%} = \frac{A_{blanc} - A_{échantillon}}{A_{blanc}} \times 100 \dots\dots (II.5)$$

$A_{bla}$ : l'absorbance du blanc.

$A_{échantillon}$  : l'absorbance de l'échantillon.

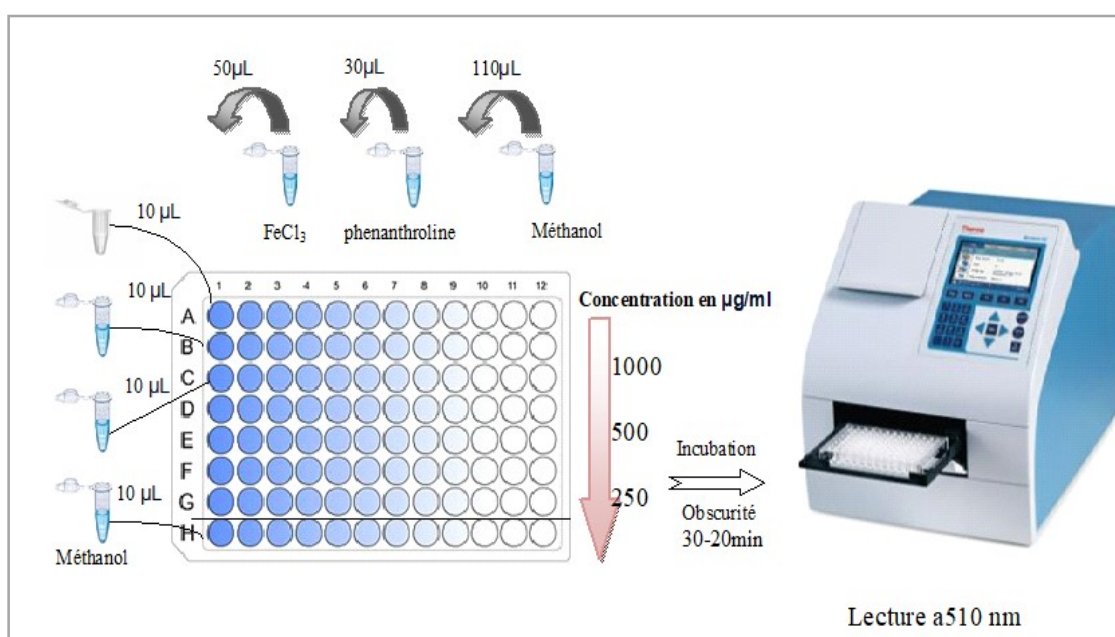
Les CI50 sont mesurées et comparées à celle du standard.



**Figure II. 8.** Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydant "ABTS"

### II.2.6.3.Méthode de la phénantroline

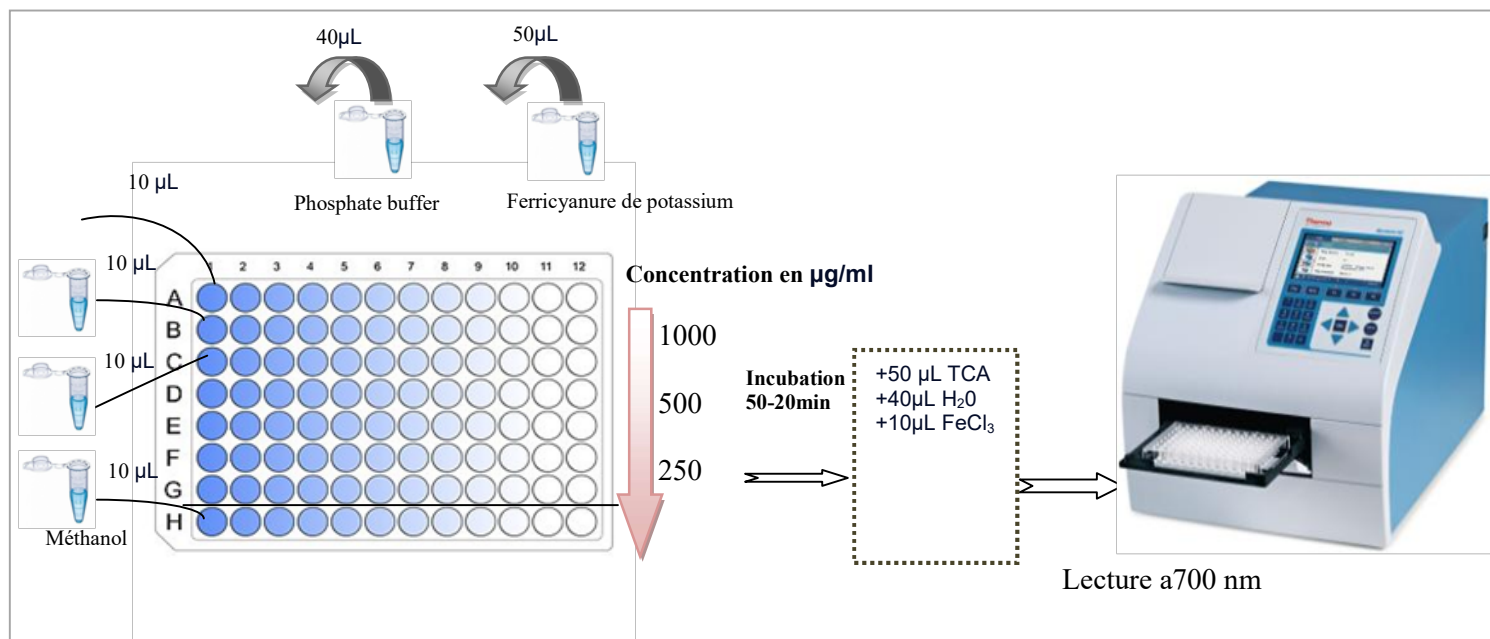
La méthode de la phénantroline (**Figure II.9**) consiste à mesurer l'activité phénantroline des différents extraits et des huiles. Dans une microplaque, 10  $\mu$ l de l'extrait à différentes concentrations sont mélangés avec 50  $\mu$ l de  $\text{FeCl}_3$ , 30  $\mu$ l de phénantroline et 110  $\mu$ l de méthanol. Le tout est incubé à l'obscurité à 30 °C pendant 20 min. L'absorbance est lue à 510 nm et l'activité phénantroline est évaluée à titre de  $A_{0,5}$  indiquant la concentration correspondant à 0.50 d'absorbance. Ces méthodes permettent d'évaluer la capacité antioxydant des extraits et de comparer leur efficacité avec celle d'un antioxydant standard (BHT).



**Figure II. 9.**Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydante phénantroline.

### II.2.6.4.Pouvoir réducteur d'ions ferriques (FRAP)

La méthode est représentée dans la **Figure II.10**. Dans une microplaque, 10 $\mu$ l de chaque extrait dilué est ajouté à 40 $\mu$ l du tampon phosphate (pH 6.6) et 50  $\mu$ l de ferricyanure de potassium. Après incubation à 50C° pendant 20 min, 50  $\mu$ l de l'acide trichloroacétique (TCA), 40  $\mu$ l d'eau distillée et 10  $\mu$ l de chlorure de fer sont ajoutés. L'absorbance est lue à 700 nm. L' $A_{0,5}$  de l'extrait et des huiles est mesurée et comparée à celle des standards.



**Figure II. 10.** Protocole suivi pour l'étude de l'activité antioxydant FRAP.

### II.2.7. Test de cytotoxicité

Ce test a été effectué pour évaluer la toxicité de certaines substances ou préparations envers Larves de vers de farine (*Ténébrion meunier*).

Après une expérimentation préliminaire avec plusieurs modèles d'arthropodes, les larves de vers de farine ont été choisies en raison de leur disponibilité, de leur robustesse et de leur petite taille relative. Elles ont été réparties en cinq lots : le lot 1 contient un extrait de cyprès, le lot 2 un extrait de cardencelle, le lot 3 de l'huile de cyprès, le lot 4 de l'huile de cardencelle, et le lot 5 sert de témoin (méthanol). Chaque lot comprend cinq larves avec des poids moyens respectifs de 0,178, 0,060, 0,067, 0,064, et 0,068 g.

Des solutions d'échantillons (extrait ou HE) d'un volume allant jusqu'à 3 ml ont été injectées à l'aide d'une seringue Hamilton. La quantité injectée a été ajustée à la masse de la larve individuelle ( $140 \pm 9,6$  mg). Des injections ont été faites caudalement sur la ventrale des larves, latéralement à la ligne médiane, car cela évite les systèmes organiques les plus essentiels. Les larves ont ensuite été incubées à température ambiante pendant entre 5 et 7 jours. La mortalité a été évaluée par la décoloration des larves. Seize larves ont été utilisées pour chaque concentration testée (**Figure II.11.**).



**Figure II. 11.** Procédés d'évaluation de la cytotoxicité des extraits et des huiles.

## II.2.8. Activités biologiques

### II.2.8.1. Activité anti bactérienne

#### ➤ Préparation de milieu de culture

Le milieu de culture Miler Hinton a été préparé (**Annexe 4**) et utilisé dans les étapes qui suivent.

#### ➤ Réactivation des souches

Repiquez les souches bactériennes sur gélose nutritive en utilisant la technique des stries (**Figure II.12**).

Incubez les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 heures pour favoriser la croissance en phase exponentielle.

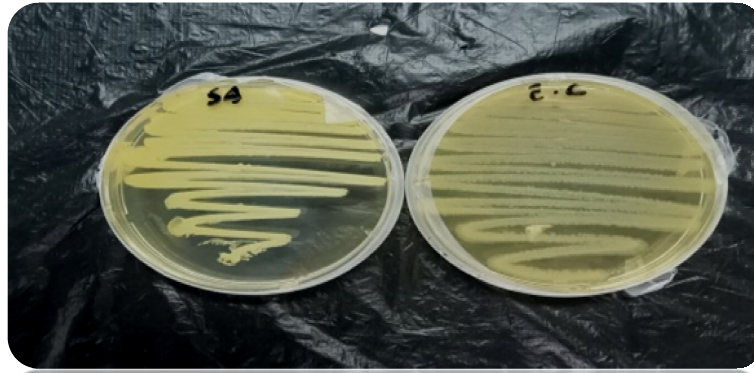


Figure II. 12. Technique des stries pour réactivation des souches antibactérienne.

### ➤ Préparation de l'inoculum

Pour préparer l'inoculum, 1 à 2 colonies similaires bien isolées sont prélevées à l'aide d'une anse en platine puis déchargées dans de l'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée à l'aide d'un vortex et la densité optique doit être entre 0.08 et 0.10, lue à une longueur d'onde de 620 nm correspondant à  $10^8$  UFC/ml. (Figure II.13).

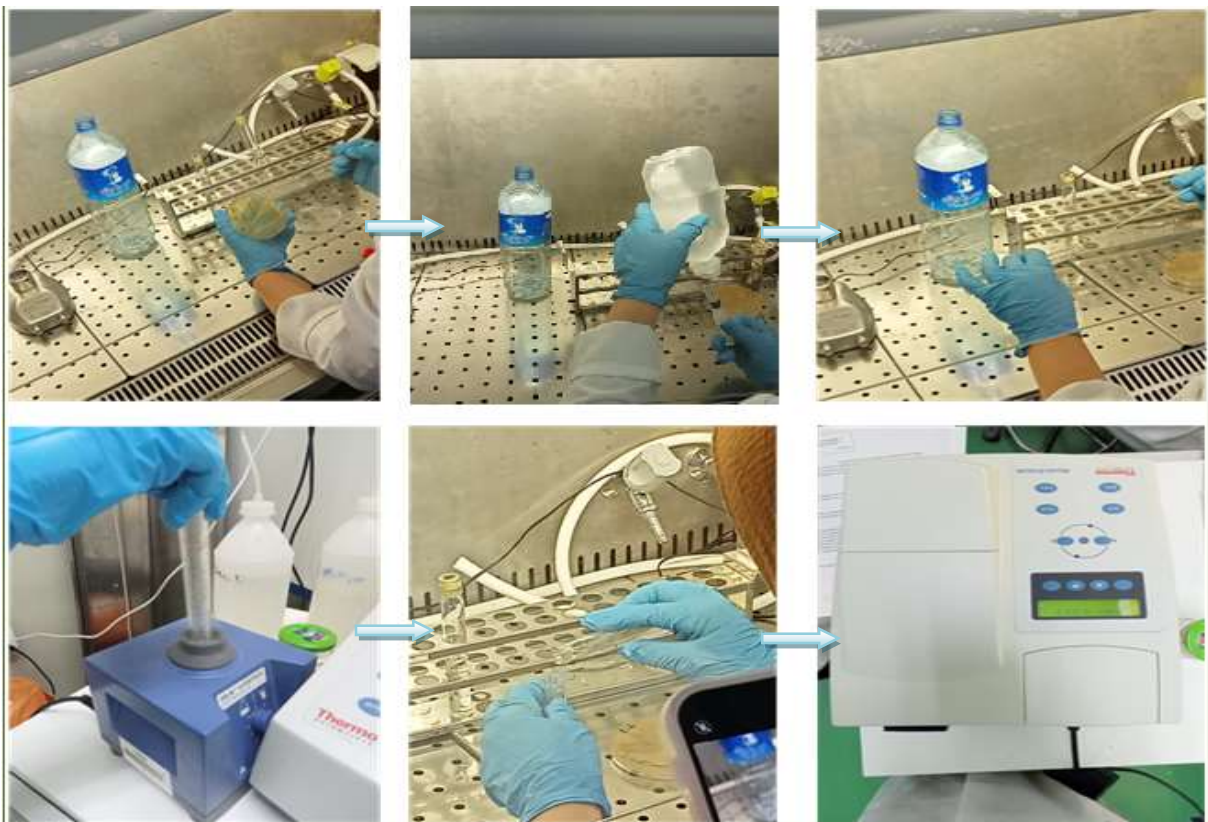


Figure II. 13. Préparation de l'inoculum.

### ➤ Ensemencement

A partir de différentes suspensions bactériennes, les boîtes de pétri contenant la gélose Mueller-Hinton ont été ensemencées par la méthode des quatre quadrants à l'aide des écouvillons stériles puis incubées à 37°C (**Figure II.14.**).



**Figure II. 14.**Ensemencement des boites par différentes souches bactériennes.

### ➤ Préparation des extraits à tester

Des solutions de concentration 20 mg/mL ont été préparé pour chaque extrait dilué dans l'éthanol 70%.

#### ✓ Méthode de diffusion des disques

La technique utilisée pour évaluer la sensibilité des souches microbiennes au différent extraits et HE s'est décrite par Tsirinirindravo et al. [102] avec quelques modifications.

- Des disques de papier Whatman N°1 ont été découpés avec un diamètre égal à 6 mm, puis stérilisés dans une boîte en verre, ils ont été ensuite imprégnés par une micropipette avec 5-20µl des différentes solutions mères (Extraits et HEs),
- Les disques préparés sont déposés à l'aide d'une pince stérile, sur la surface des milieux qui sont déjà ensemencés.
- Les boîtes ont été incubées à 37 °C à l'étuve pendant 24-48 h.
- Des disques d'antibiotiques standards (gentamicine) ont été également utilisés pour servir de témoins positifs.

#### ✓ Méthode des puits

Cette technique (**Figure II.15**) contient les étapes suivantes :

Une fois la gélose inoculée et sèche, utilisez un perforateur de bouchon stérile pour créer

Des puits d'environ 6 à 8 mm de diamètre, en les espaçant suffisamment pour éviter toute interférence entre les zones d'inhibition. Assurez-vous que les puits sont bien formés et que la gélose autour des puits ne présente aucune fissure. Cette méthode est privilégiée pour les crèmes, car la capacité des disques est limitée.

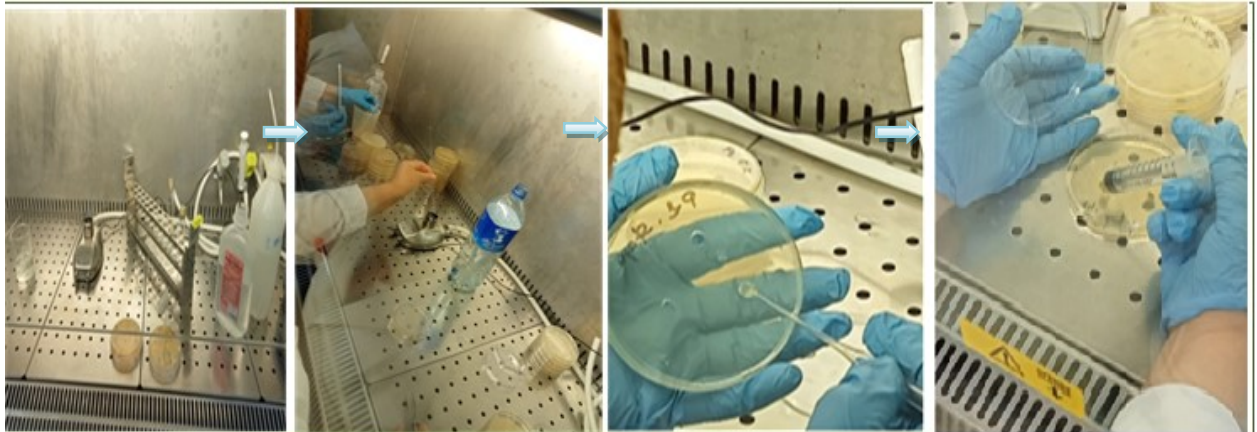


Figure II. 15. Méthode des puits.

### II.2.8.2. Activité antifongique

Les mêmes opérations ont été effectuées avec le candidat es. Dans ce cas, le milieu de culture Sabouraud a été utilisé, tandis que le milieu PDA a été utilisé pour le *Fusarium oxysporum* (FOL). L'objectif de notre expérience est d'évaluer l'activité fongicide des extraits et des HES des plantes étudiées. La méthode utilisée pour évaluer l'activité antifongique est la technique de diffusion par puits pour le FOL et la méthode des diffusions des disques pour le candidat, qui permet de mesurer l'impact des extraits et de l'huile sur les champignons, ainsi que d'évaluer leur résistance ou sensibilité.

#### ➤ *Fusarium oxysporum*

Le genre *Fusarium* est largement reconnu pour son rôle significatif dans la pathologie végétale, englobant de nombreuses espèces. *Fusarium oxysporum* est un champignon commun et répandu, particulièrement présent dans le sol où il survit grâce aux chlamydospores pendant les mois froids. En tant qu'agent pathogène des plantes, il se présente sous de nombreuses formes spécialisées (plus de 72 sont connues). Ces formes sont adaptées à des espèces végétales spécifiques et à des races physiologiques ciblant des variétés particulières de plantes hôtes.

➤ Les étapes suivies pour l'étude de l'activité anti-FOL sont les suivantes :

- Le bec Bunsen a été allumé pour créer une zone stérile (flamme bleue).
- Les boîtes de Pétri neuves ont été étiquetées avec les informations nécessaires (date, code de la souche, nom des manipulateurs).
- Le PDA a été sorti de l'autoclave et laissé refroidir sous la hotte jusqu'à atteindre une température de surfusion (45 °C). Il a ensuite été versé dans les boîtes de Pétri et laissé se solidifier sur la paillasse.
- Un disque de culture fongique de 5 mm de diamètre a été soigneusement placé au centre de chaque boîte de Pétri à l'aide d'une pipette Pasteur stérile contenant un milieu de culture PDA. Chaque puits a été rempli avec 30 µl de chaque concentration (3 répétitions pour chaque extrait).
- Une dilution d'éthanol a été utilisée comme contrôle positif (+). Le contrôle négatif (-) ne contenait que du milieu PDA, sans aucun produit.
- Les boîtes de Pétri ont été scellées et placées dans un incubateur à 25 °C pendant 48 heures.

Après deux jours d'incubation à 25 °C, la croissance mycélienne de *Fusarium oxysporum* a été mesurée en millimètres. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la croissance pour comparer l'efficacité des extraits et de l'huile essentielle en utilisant la formule suivante :

Taux d'inhibition (I) =  $((C-T)/C) \times 100$ .....**II.6.**

Où :

- I : taux d'inhibition du champignon testé.
- C : diamètre moyen de la croissance du champignon sur le milieu témoin (+).
- T : diamètre moyen de la croissance du champignon en présence de l'huile essentielle/extrait.

Le disque déposé à l'origine a un diamètre de 5 mm. La croissance est mesurée à partir de ce diamètre initial.

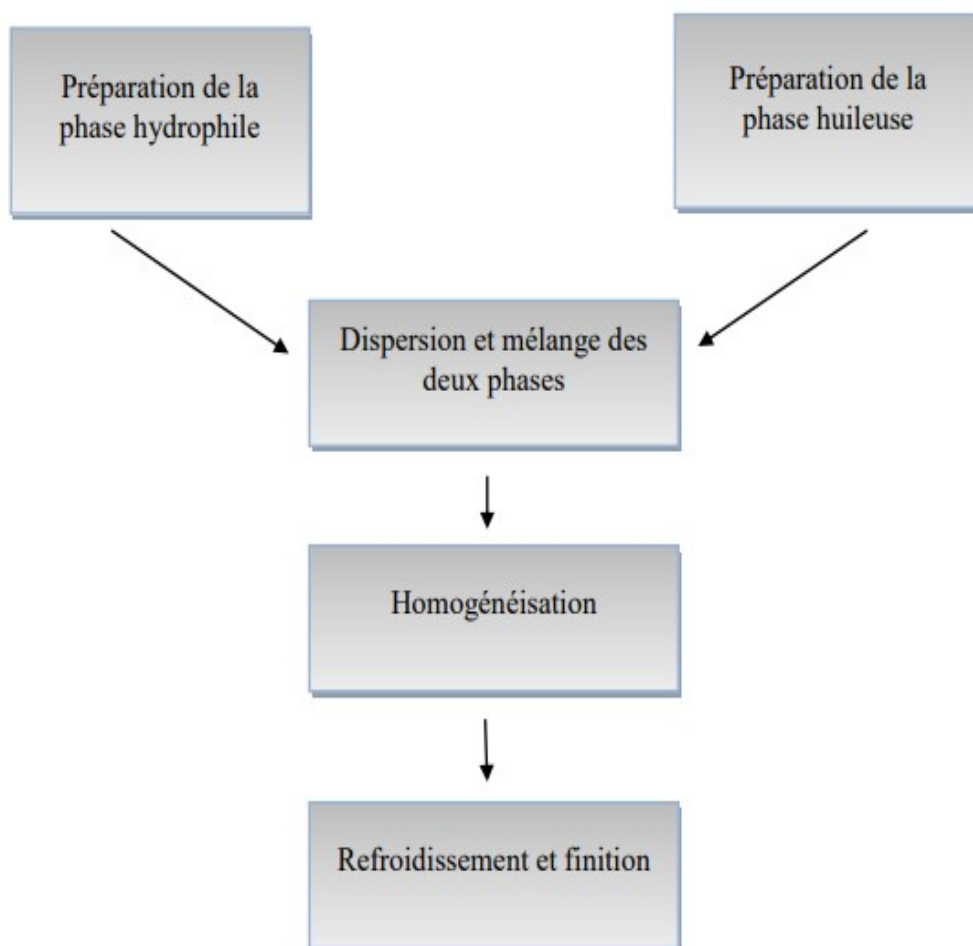
### II.2.9. Formulation et caractérisation de la crème

Cette partie présente les différentes étapes de la fabrication d'une émulsion semi-solide (crème). En effet, en fonction de la nature de l'émulsion, lipophile (E/H) ou hydrophile (H/E), la fabrication implique une série de choix tels que :

- Les ingrédients (nature des 2 phases, tensioactifs émulsifiants, concentration, additifs, etc.) ;
- Les tests biologiques sur les deux types de crème afin de déterminer la plus efficace

#### II.2.9.1. Etapes de la formulation

Deux types de crème ont été formulés, un hydrophile (H/E) et l'autre lipophile (E/H), selon les étapes schématisées dans la **Figure II.16**.



**Figure II. 16.** Diagramme du procédé de fabrication d'une émulsion.

Les activités antimicrobiennes (antibactérienne et antifongique) ont été effectuées afin d'évaluer la qualité des crèmes préparées.

### II.2.9.2. Optimisation de la formulation

Afin de choisir la formulation la plus efficace, une étude paramétrique a été réalisée. Le premier paramètre à optimiser est le type d'émulsion. Pour cela, deux types de crème ont été formulés, un hydrophile (H/E) et l'autre lipophile (E/H).

Le deuxième paramètre à optimiser est le dosage de la crème. Donc dans ce cas, des crèmes hydrophiles (H/E) ont été préparées et caractérisées, il s'agit de :

- Crème 1 contient 0.2% de teneur en Principe actif.
- Crème 2 contient 0.3% de teneur Principe actif.
- Crème 3 contient 0.5% de teneur Principe actif.

La crème qui donne une activité biologique plus prononcée sera choisie pour le reste du travail.

### II.2.9.3. Contrôle de qualité de la crème formulée

Différents essais sont réalisés afin d'évaluer la qualité de la crème obtenue, il s'agit de :

#### ➤ Caractéristiques organoleptiques

Les crèmes ont été évaluées visuellement pour leur aspect, couleur et odeur.

#### ➤ Mesure du pH

Le PH a été mesuré à température ambiante par un PH mètre.

#### ➤ Examen microscopique

Une goutte de crème a été observée au microscope pour évaluer la forme et la dispersion des gouttelettes.

#### ➤ Type d'émulsion

Le type d'émulsion (huile dans eau H/E ou eau dans huile E/H) a été déterminé par la méthode de dilution :

- 2,5g de crème mélangés à 3ml d'eau distillée
- Si le mélange est homogène, l'émulsion est de type H/E (hydrophile)

#### ➤ Mesure de la viscosité

La consistance de la crème est évaluée grâce à un viscosimètre rotatif. La mesure se fait à une température ambiante et une vitesse de 0.6 rpm.

#### ➤ Étude de stabilité

La stabilité des émulsions cosmétiques est effectivement déterminée par le test du vieillissement

accéléralé qui permet un suivi de la stabilité physico-chimique au cours du temps. Ce test consiste à stocker les émulsions à une température élevée (généralément 40°C) pendant 2h afin d'accélérer le vieillissement et d'évaluer leur stabilité.

Ce test a pour objectif d'appréhender la résistance du produit cosmétique au stockage et à l'expédition. Il est réalisable par deux méthodes :

- **Le vieillissement en enceinte climatique** : qui fait subir aux émulsions des cycles de chaud-froid répétés ;
- **La sédimentation forcée** : en utilisant une centrifugeuse pour accélérer la sédimentation.

Dans notre étude, on a stocké les crèmes à différentes températures (4°, 40° et 60°) pendant 2h ; En plus, la sédimentation forcée a été réalisée comme suit :

- Prélever 1.5 ml des crèmes préparées.
- Mettre les échantillons dans une centrifugeuse à 2000 rpm pendant 10min.
- Evaluer l'aspect de l'émulsion obtenue.

#### ➤ **Etude de l'irritation cutanée**

L'étude de l'irritation cutanée a été évaluée en appliquant la crème préparée en couche mince sur les bras ou les mains de dix volontaires et les résultats sont notés 12h et 24h après.

#### ➤ **Etude in-vivo de l'effet anti-brûlure et cicatrisant**

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité anti-brûlure et cicatrisante de la crème produite sur un modèle animal afin pour prouver et évaluer l'efficacité de la crème pour accélérer la cicatrisation des brûlures du deuxième degré, éliminer les cicatrices et pour prouver la sécurité du produit afin qu'il puisse être utilisé pour traiter les brûlures chez l'homme, notamment chez l'enfant. De même, en comparant l'effet de la crème avec celle commercialisée : Biafine Pour indiquer laquelle des deux crèmes est la plus efficace pour traiter les brûlures.

#### - **Protocole expérimental**

L'expérience in vivo a été réalisé sur 10 rats de laboratoire de souche Wistar âgés de 6 mois, de sexe male et de poids compris entre 260 et 300 g (poids moyen= 294,38 g) fournit par le Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques (CRSP). L'ensemble de l'expérimentation a été réalisée dans le service d'exploitation animale. Ces rats sont utilisés après une période d'adaptation au sein de laboratoire dans des cages en plastiques, dont ils ont l'accès libre à l'eau et à l'alimentation. Ils ont réparti en 3 lots comme récapitulé dans le **Tableau II.6** et représenté dans la **Figure II.16**.

Tableau II. 6.Répartition des rats en lots.

| Lot    | Dénomination                 | Caractéristiques                                                       |
|--------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| Lot 01 | Témoin (contrôle négatif)    | Deux rats, les rats de ce lot n'ont reçu aucun traitement              |
| Lot 02 | Référence (contrôle positif) | Quatre rats reçoivent une crème anti-brûlure commercialisée (BIAFINE®) |
| Lot 03 | Test                         | Quatre rats reçoivent la crème préparée.                               |



Figure II. 17.Répartition des rats.

### - Induction des brûlures et des plaies

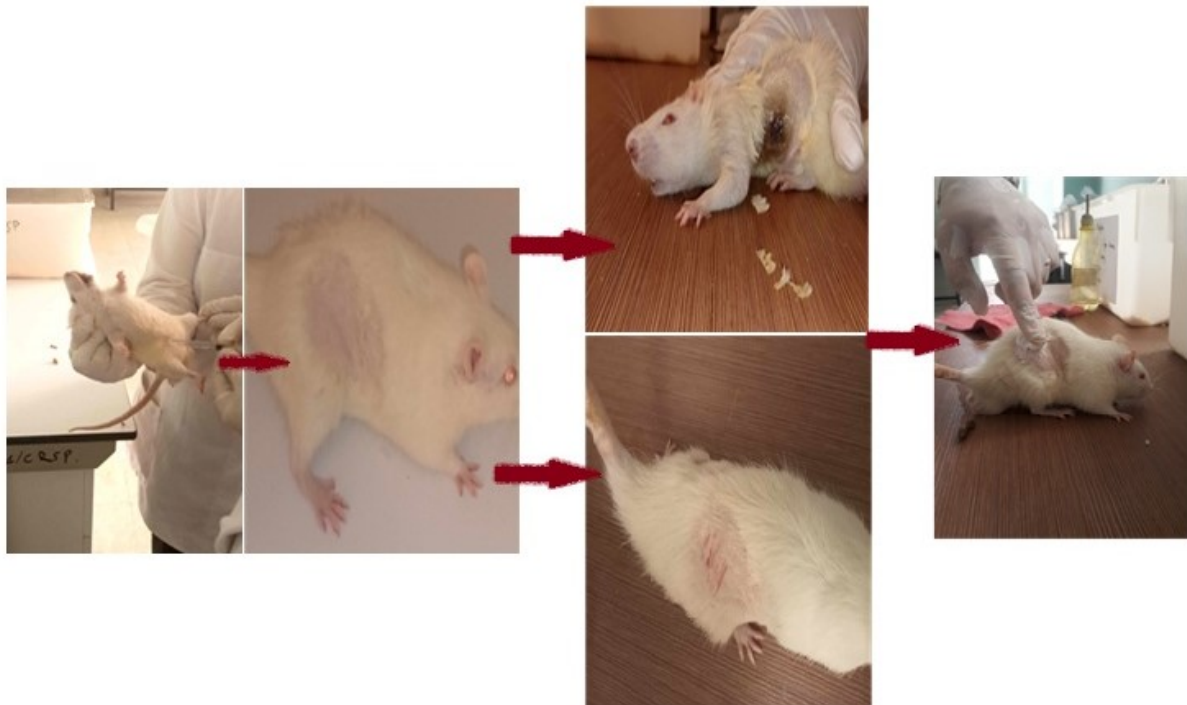
Les rats ont été anesthésiés par la kétamine, puis leurs peaux ont été rasées sur les deux coté à l'aide d'une lame de rasoir électrique. La peau rasée a été désinfectée par l'alcool éthylique à 70%. Ensuite, une spatule en métal de 22,89 cm<sup>2</sup> (5,4 cm de diamètre) a été chauffée à 97°C dans une plaque chauffante. Sur le premier côté, nous appliquons la spatule chaude sur la peau du rat pendant un temps suffisant pour créer une brûlure de pleine épaisseur sur environ 20% de la surface corporelle totale. Sur l'autre coté et a l'aide d'un bistouri, des plaies de 2 cm ont été induites sur les même rats (Figure II.17).

### - Application topique des traitements

Les crèmes sont appliquées quotidiennement pendant 14jours (à raison de deux fois par jour). L'observation macroscopique est réalisée avant chaque nouvelle application par

immobilisation de l'animal sur paille. L'évolution des lésions est effectuée en utilisant comme paramètres :

- ✓ La surface brûlée et la surface de la plaie.
- ✓ La profondeur de la plaie.
- ✓ L'apparition ou non d'un œdème.
- ✓ La taille des rats
- ✓ La réapparition des poiles



**Figure II. 18.**Induction des brûlures et des plaies sur les rats.

# Chapitre III

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

## CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans cette partie, nous allons présenter et discuter les résultats obtenus des différentes expériences et analyses exposées dans le chapitre précédent. Tout d'abord, nous examinerons les résultats de l'optimisation de la macération par le plan Box-Behnken, la teneur en polyphénols des extraits des deux plantes et l'analyse des HEs par GCMS. Ensuite, nous décrirons les résultats des activités biologiques. Enfin, la dernière partie porte sur les résultats des essais réalisés sur la crème préparée.

### III.1. Extraction par macération et par hydrodistillation

#### III.1.1. Rendement de la macération par Box Benken

Dans le présent travail, le plan "Box-Behnken" a été exécuté afin d'optimiser le rendement de l'extraction par macération pour chaque plante étudiée. De ce fait, trois facteurs ont été étudiés : la durée d'extraction, la composition du solvant d'extraction et la quantité de la matière végétale. Après avoir fixé les niveaux d'étude pour chaque facteur, on a réalisé 15 expériences et les résultats du rendement d'extraction sont illustrés dans le **Tableau III.1**.

**Tableau III. 1.**Résultats des essais du plan Box Benken.

| N<br>expérienc<br>e | Cypres |          |             |                      | Cardoncelle bleue |          |             |                     |
|---------------------|--------|----------|-------------|----------------------|-------------------|----------|-------------|---------------------|
|                     | Durée  | quantité | Solvan<br>t | Rendemen<br>t % (Y1) | Temp<br>s         | quantité | solvan<br>t | Rendemen<br>t% (Y2) |
| 1                   | -1     | -1       | 0           | 10.2                 | -1                | -1       | 0           | 12.4                |
| 2                   | 1      | -1       | 0           | 14.2                 | 1                 | -1       | 0           | 8.3                 |
| 3                   | -1     | 1        | 0           | 3.09                 | -1                | 1        | 0           | 5.84                |
| 4                   | 1      | 1        | 0           | 1.8                  | 1                 | 1        | 0           | 1.34                |
| 5                   | -1     | 0        | -1          | 7.68                 | -1                | 0        | -1          | 7.43                |
| 6                   | 1      | 0        | -1          | 6.76                 | 1                 | 0        | -1          | 6.73                |
| 7                   | 0      | 0        | 1           | 4.8                  | 0                 | 0        | 1           | 5.9                 |
| 8                   | 0      | 0        | 1           | 3.08                 | 0                 | 0        | 1           | 5.86                |
| 9                   | 0      | -1       | -1          | 11.1                 | 0                 | -1       | -1          | 10.6                |
| 10                  | 0      | 1        | -1          | 2.22                 | 0                 | 1        | -1          | 4.06                |
| 11                  | 0      | -1       | 1           | 5.2                  | 0                 | -1       | 1           | 12.6                |
| 12                  | 0      | 1        | 1           | 3.4                  | 0                 | 1        | 1           | 6.2                 |
| 13                  | 0      | 0        | 0           | 12.12                | 0                 | 0        | 0           | 9.1                 |
| 14                  | 0      | 0        | 0           | 11.84                | 0                 | 0        | 0           | 7.1                 |
| 15                  | 0      | 0        | 0           | 11.6                 | 0                 | 0        | 0           | 8.966               |

##### III.1.1.1. Etablissement de l'équation de modèle

La réponse du plan (le rendement de l'extraction) est établie sous forme d'équation polynomiale en tenant compte de l'influence des variables et leurs interactions. Pour chaque plante on a l'équation

du modèle :

$$Y1 = 11.8533 + 0.0988A - 3.7737B - 1.3200C - 2.1254A * A - 2.14054B * B - 3.9679C * C - 1.3225A * B - 0.02A * C + 1.77B * C.$$

$$Y2 = 11.5867 - 1.3900A - 4.6525B - 1.5975C - 1.0158A * A - 0.6408B * B - 1.38081C * C + 0.39A * B - 0.53A * C + 0.415B * C.$$

Avec Y1: Rendement de cyprès (%)

Y2: Rendement de cardoncelle bleu (%)

### III.1.1.2. Analyse statistique

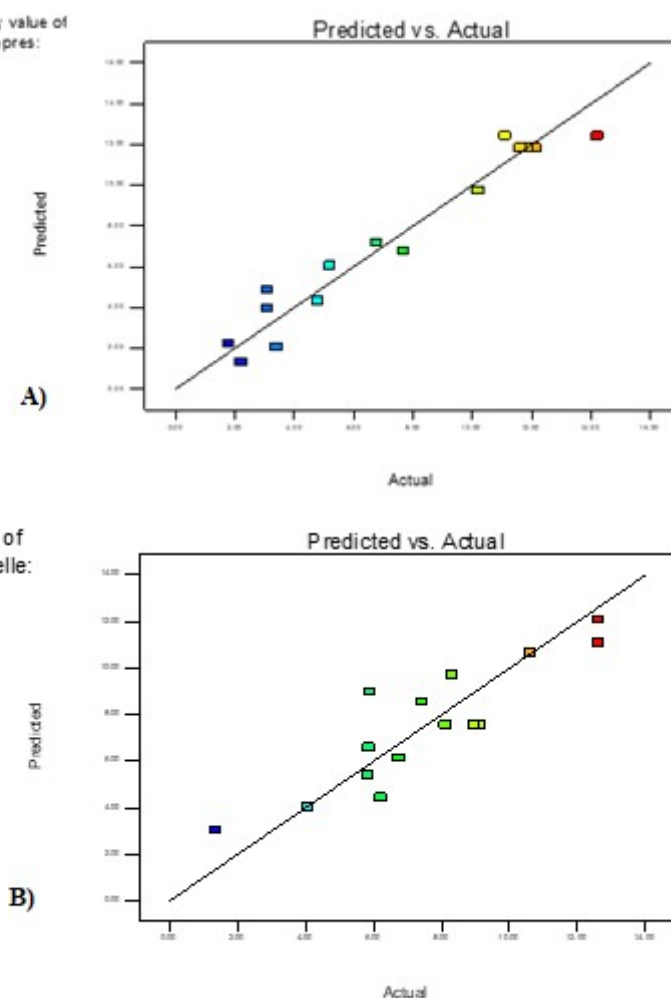
Afin d'estimer la pertinence du modèle et de déterminer les paramètres influençant significativement sur l'extraction, une analyse de variance ANOVA est réalisée. La validité de modèle est exprimée par le coefficient de détermination  $R^2$  et la valeur de F observé.

La table d'analyse de la variance pour le rendement d'extraction est représentée dans le **Tableau III. 2.**

**Tableau III. 2.** Table d'ANOVA pour le rendement d'extraction.

| Variance        | SCE     |         | DDL | Fobs |      | $R^2$  |        | $R^2$ ajusté |        |
|-----------------|---------|---------|-----|------|------|--------|--------|--------------|--------|
|                 | Y1      | Y2      |     | Y1   | Y2   | Y1     | Y2     | Y1           | Y2     |
| <b>Linéaire</b> | 222.397 | 129.835 | 9   | 5.52 | 9.48 | 94.46% | 89.05% | 84.49%       | 86.06% |
| <b>Résidu</b>   | 22.394  | 13.883  | 5   |      |      |        |        |              |        |
| <b>Total</b>    | 244.791 | 250.678 | 14  |      |      |        |        |              |        |

D'après le **Tableau III.2**, nous constatons que la valeur de  $R^2$  est de 94.46% et 89.05%, ce qui signifie qu'il existe seulement 5.54% et 9.155% des variations qui ne sont pas expliquées par le modèle. De plus, nous notons que la valeur du coefficient de détermination  $R^2$  ajusté est égale à 84.49% et 86.06% (> 80%), et que Fobs (5.52 et 9.48) sont supérieurs à F critique (4.77) tirée à partir du tableau en **Annexe 6**, ce qui révèle que le modèle est valide et linéaire. Une comparaison des valeurs réelles et prédites du rendement d'extraction a été réalisée et les résultats sont illustrés dans la **Figure III.1**. Nous notons que les valeurs réelles et les prédites sont presque similaires, donc on peut déduire que le modèle mathématique suggéré a effectivement reproduit les valeurs observées du rendement.



**Figure III. 1.** Comparaison des valeurs réelles et prédites du rendement d'extraction du cyprès (A) et de la cardoncelle (B).

### III. 1.1.3. Analyse des effets des facteurs

Un effet d'un facteur ou d'une interaction sera dit significatif s'il est pour un risque ( $\alpha=0,05$ ), significativement différent de 0, en suivant la règle du test : Si  $|t_i| > t$  critique, l'effet est significatif. Sinon, l'effet n'est pas significatif.

La valeur de  $t_{critique} = 2.5$  (ddl=5) est tirée du tableau de test de student bilatéral inséré en **Annexe 5**. Les résultats de l'étude de la signification des effets des facteurs et leurs interactions sur le rendement sont illustrés dans le **Tableau III.3**.

**Tableau III. 3.** Effets des facteurs et leurs interactions sur le rendement

| Terme     | Y1      |       | Y2     |       |
|-----------|---------|-------|--------|-------|
|           | Ti      | P     | Ti     | p     |
| Constante | 11.8533 | 0.000 | 9.483  | 0.000 |
| A         | 0.0088  | 0.989 | -1.858 | 0.122 |
| B         | -3.7738 | 0.001 | -6.218 | 0.002 |

|     |         |       |        |       |
|-----|---------|-------|--------|-------|
| C   | -1.4100 | 0.062 | -2.135 | 0.086 |
| A*A | -2.2154 | 0.051 | -0.922 | 0.399 |
| B*B | -2.3154 | 0.044 | -0.582 | 0.586 |
| C*C | -4.0579 | 0.005 | -1.254 | 0.265 |
| A*B | -1.3225 | 0.173 | 0.369  | 0.728 |
| A*C | -0.200  | 0.820 | -0.501 | 0.638 |
| B*C | 1.7700  | 0.087 | 0.392  | 0.711 |

#### ■ Effet significatif

L'analyse du tableau ci-dessus indique que la quantité de poudre affecte de manière significative le rendement de l'extraction du cyprès et de la cardoncelle.

Des résultats similaires ont été trouvés par Fernández-Ronco et al qui ont trouvés que le rapport poudre : solvant montre une influence statistiquement significative sur le rendement d'extraction de l'oléorésine[54].

En plus, le facteur solvant\*solvant a un effet négatif sur le rendement de l'extraction du cyprès. Cet effet était négatif pour les deux plantes.

Les autres facteurs et les interactions étudiés n'ont pas d'effet significatif sur le rendement d'extraction des deux plantes.

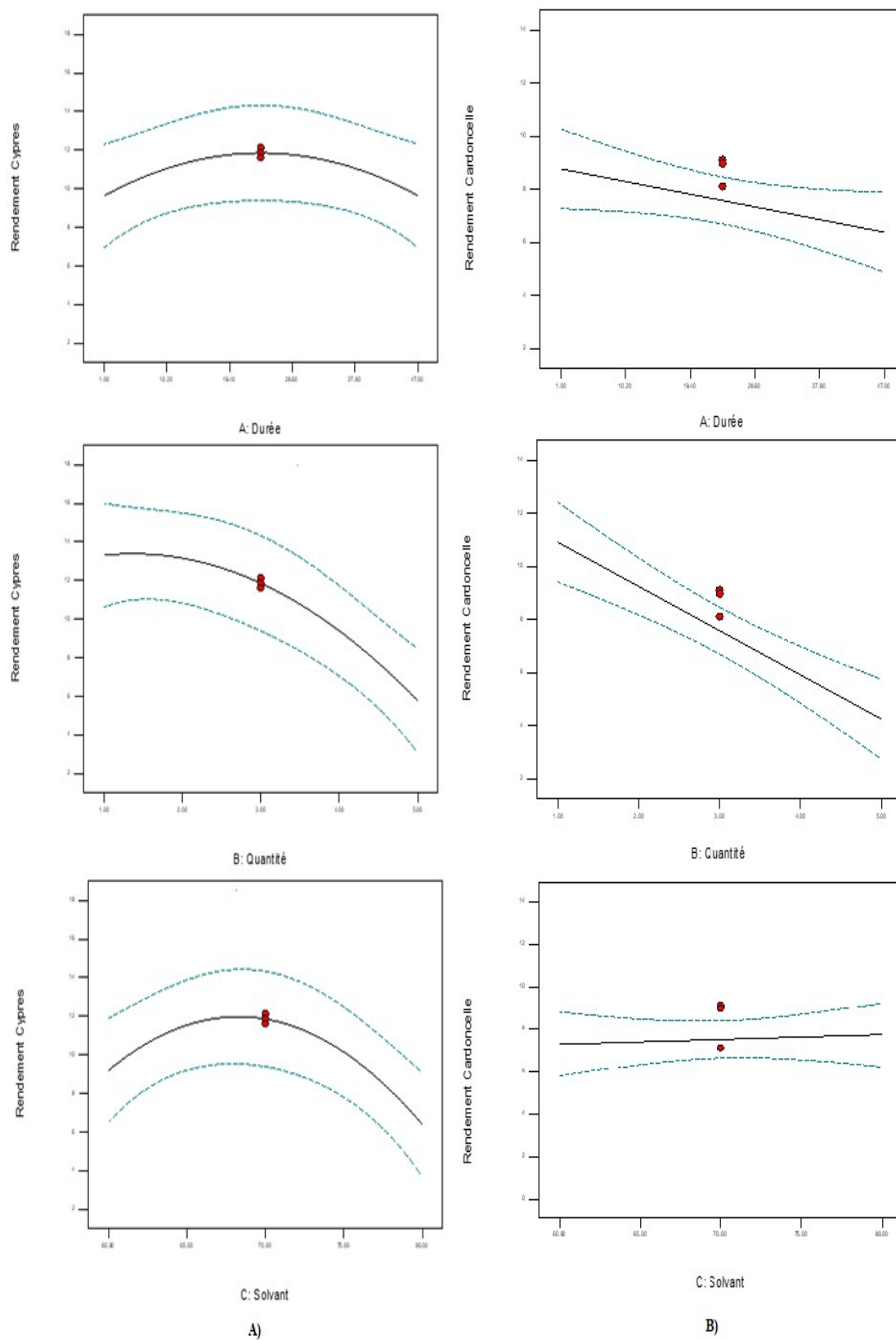
Par ailleurs, Kouwelton et al. Ont montré que l'effet des conditions opératoires sur le rendement de la macération varie en fonction de la plante utilisée. Deux facteurs (la quantité de la poudre végétale et le type du solvant) étaient significatifs sur l'extraction d'*Alchornea cordifolia* alors que quatre facteurs étaient significatifs sur le rendement de l'extraction du *Tridax procumbens* à savoir la quantité de la poudre végétale, la granulométrie, le type du solvant et le temps de macération; alors que seulement [55].

On peut conclure donc que l'effet des facteurs ainsi que leurs significations dépendent de plusieurs paramètres tels que le type de la plante étudiée, la technique d'extraction utilisée, les niveaux des facteurs et les possibles interactions entre eux, etc.

#### III.1.1.4. Analyse graphique

##### III.1.1.4.1. Tracés des effets principaux

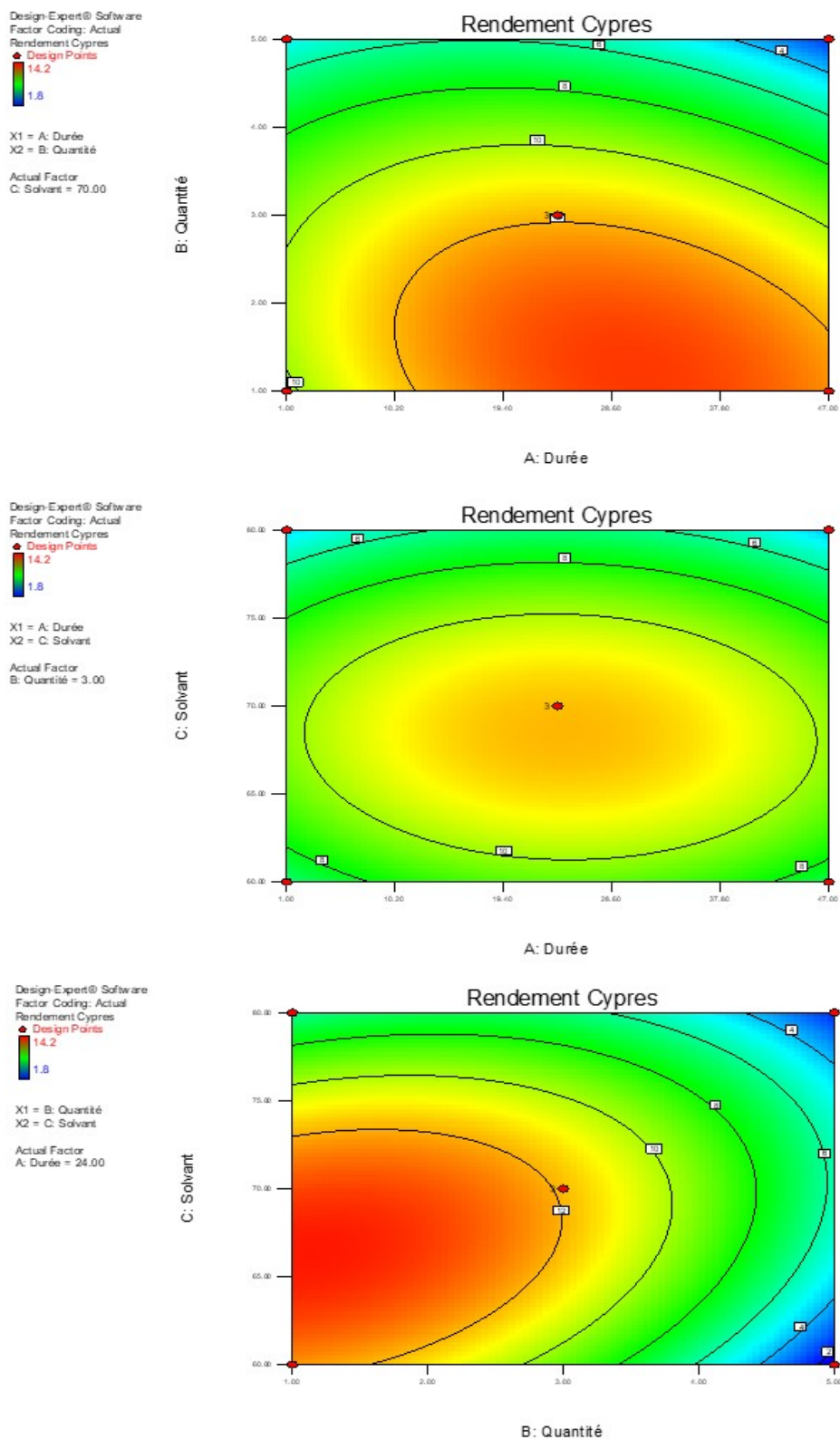
La quantité de la poudre a un effet négatif sur le rendement des deux plantes (**Figure III.2**). Ceci est expliqué par le fait qu'en augmentant la quantité de poudre, le solvant ne peut facilement pénétrer dans la matière ce qui gêne l'extraction et minimise le rendement d'extraction, il s'agit de la saturation du solvant par la poudre de la plante[56].



**Figure III. 2.**Tracés des effets principaux des facteurs sur le rendement. A) du cyprès; B) de la cardoncelle.

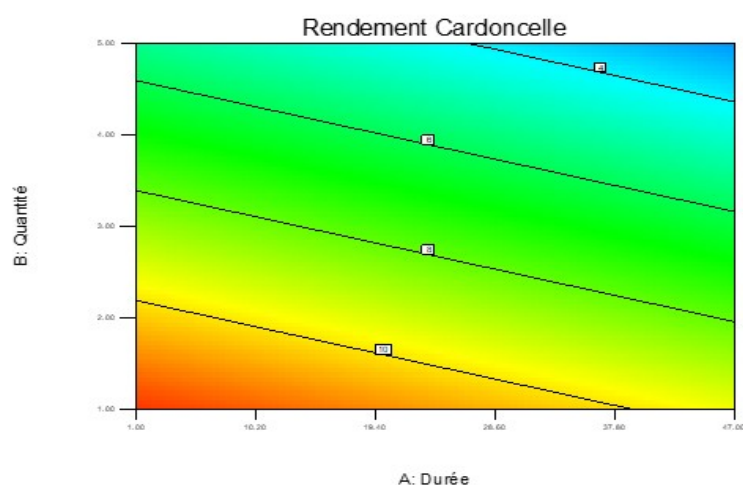
### III.1.1.4.1. Tracés de contour

Les contours plot et les surfaces plots sont représentés sur les **Figures III.3 et III.4**

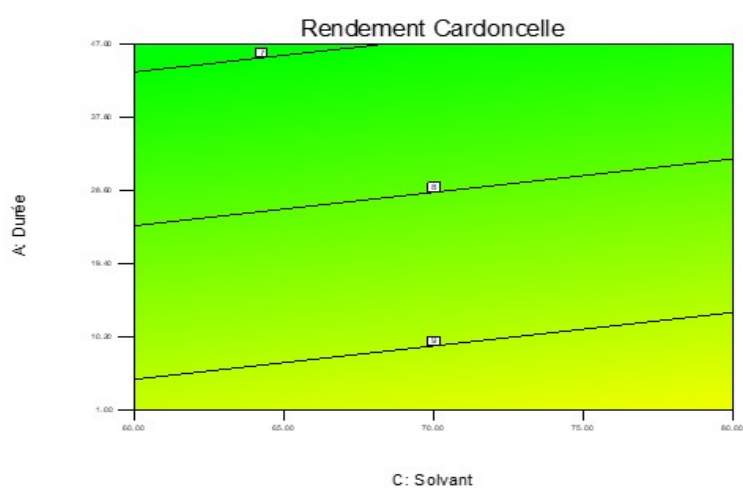


**Figure III. 3.**Tracé de contour du rendement d'extraction du cyprés.

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Rendement Cardoncelle  
 12.6  
 1.34  
 X1 = A: Durée  
 X2 = B: Quantité  
 Actual Factor  
 C: Solvant = 67.84



Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Rendement Cardoncelle  
 12.6  
 1.34  
 X1 = C: Solvant  
 X2 = A: Durée  
 Actual Factor  
 B: Quantité = 2.57



Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Rendement Cardoncelle  
 12.6  
 1.34  
 X1 = B: Quantité  
 X2 = C: Solvant  
 Actual Factor  
 A: Durée = 24.00

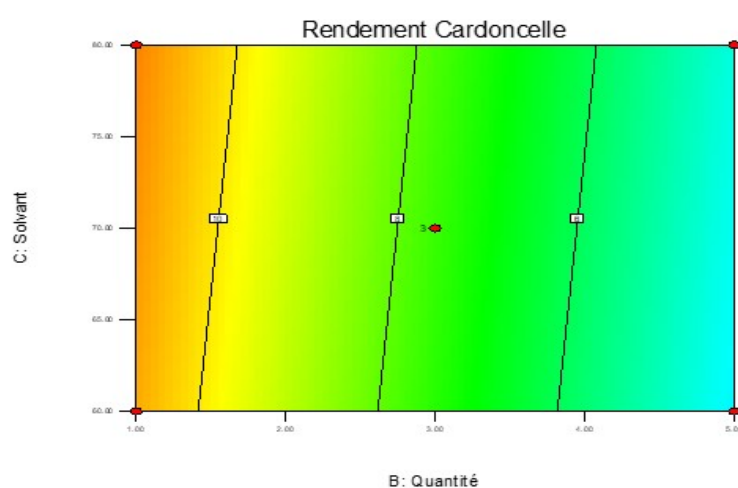


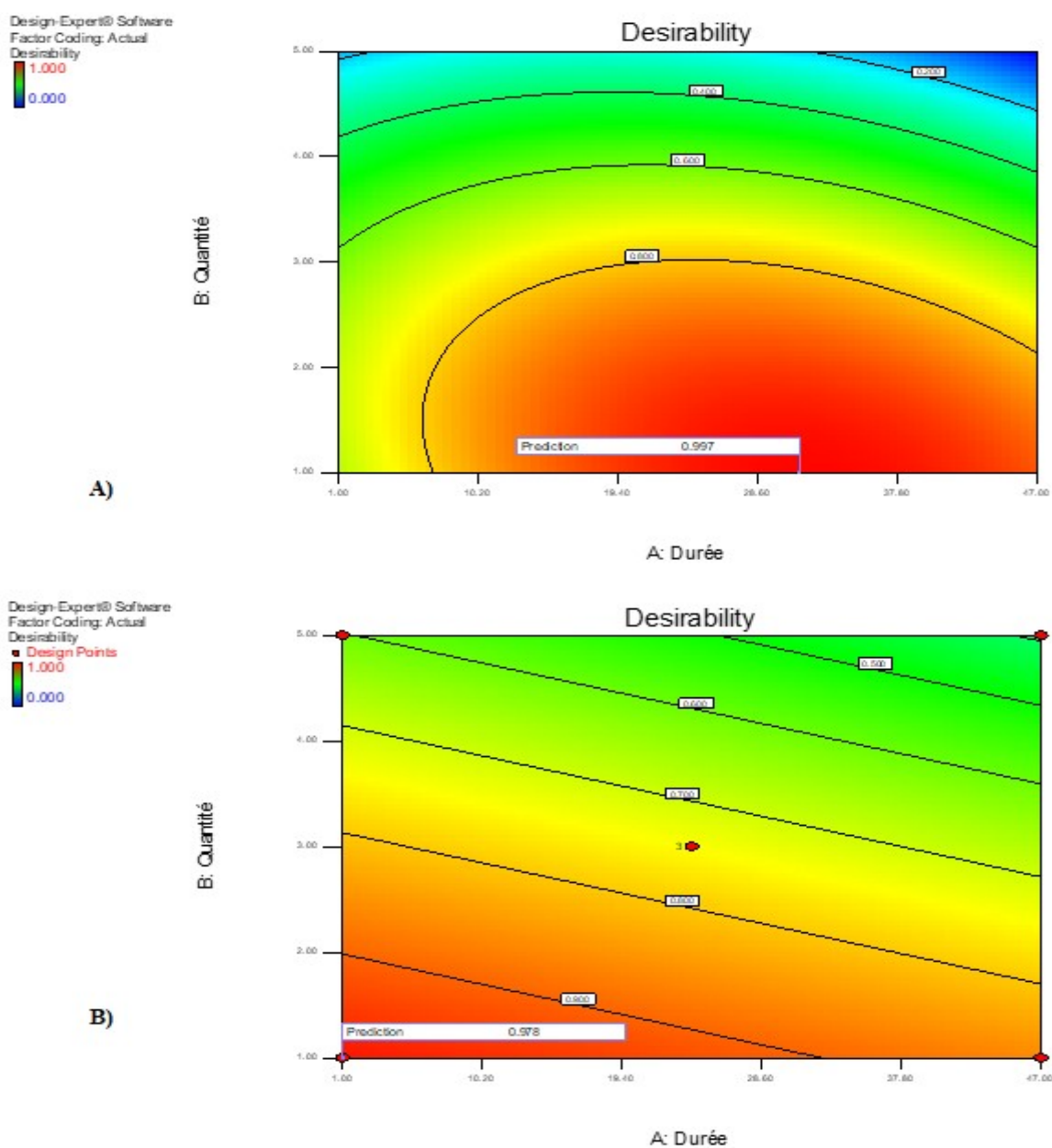
Figure III. 4. Tracé de contour du rendement d'extraction de la cardoncelle.

D'après les figures III.3 et III.4, nous constatons une récupération maximale de l'extrait au niveau bas de la quantité de matière. Dans le cas du cyprès, la composition du solvant et la durée d'extraction donnent un rendement élevé à leur niveaux moyen, tandis que dans le cas

de la cardoncelle, un rendement élevé est peut être observé avec une courte durée d'extraction avec un pourcentage élevé du solvant.

### III.1.6. Détermination des paramètres optimaux

Après optimisation du rendement par plan d'expérience et afin de confirmer l'efficacité du model ; les conditions optimales de l'extraction de chaque plante ont été appliquées, les masses grattées de chaque extrait ont été pesées, et les rendements ont été calculés.



**Figure III. 5.**Optimisation des paramètres pour le cyprès (A) et la cardoncelle (B).

La **Figure III.5** représente la fonction de désirabilité du rendement de l'extraction du cyprès et de la cardoncelle et. La désirabilité était 0.997 et 0.978 pour le rendement de l'extraction du cyprès et de la cardoncelle, respectivement donc l'optimum a été confirmé expérimentalement. Le **Tableau III.4.** Représente le pourcentage d'erreur entre les valeurs observées et les valeurs prédites. Le rendement de l'extraction du cyprès a une valeur de 11.6 % et celui du cardoncelle a une valeur de 12.04 % et les pourcentages d'erreurs étaient dans les deux cas  $< 10 \%$  ce qui confirme la validité du plan réalisé.

**Tableau III. 4.** Rendements théorique et expérimentale de l'extraction des plantes sous conditions optimales.

| Produit        | Extrait cyprès |               | Extrait cardoncelle |               |
|----------------|----------------|---------------|---------------------|---------------|
| Type de valeur | Théorique      | Expérimentale | Théorique           | Expérimentale |
| Rendement (%)  | 11.11          | 11.6          | 12.09               | 12.4          |
| Erreur (%)     | 4.4            |               | 2.5                 |               |

La figure ci-dessous représente les extraits obtenus par macération.



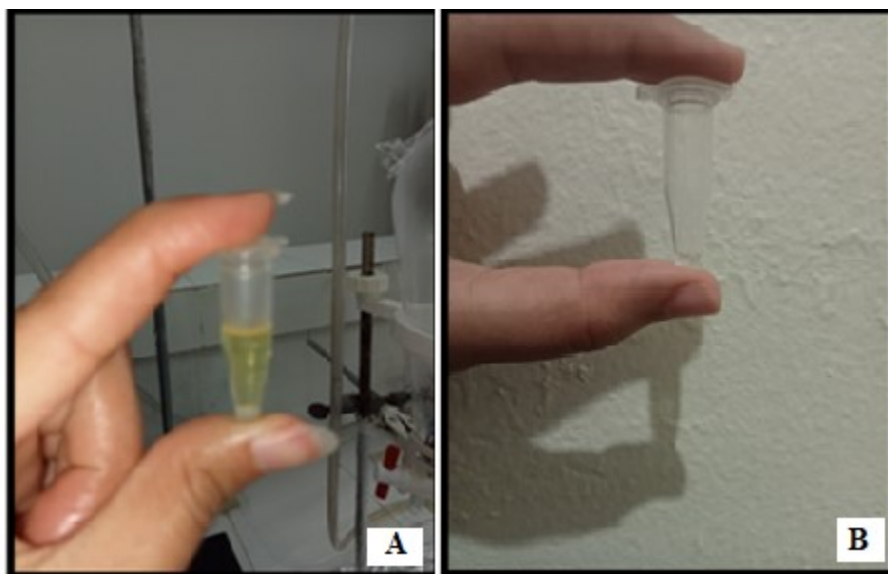
**Figure III. 6.** Extraits des plantes : cyprès (A) et cardoncelle (B).

Le rendement d'extraction dépend de plusieurs facteurs, notamment du choix du solvant. Des études montrent que l'extraction à partir d'un mélange d'eau et d'éthanol donne un meilleur rendement que l'utilisation d'éthanol pur ou d'eau seule. Cette observation suggère que la combinaison de ces solvants organique et aqueux facilite le processus d'extraction, accélérant ainsi la dissolution des composés polaires et non polaires solubles dans les solvants éthanol et eau. De plus, l'extraction éthanol/eau augmente la teneur en phénols, attribuée à la polarité accrue et aux liaisons hydrogène plus fortes par rapport à l'extraction à l'éthanol seul.[57]

### III.1.2. Rendement de l'extraction des huiles essentielles

Les résultats numériques du rendement obtenu HEs sont récapitulés dans le **Tableau III.5.** Les HEs obtenues (**Figure III.7.**) par le procédé de Clevenger pour le cyprès est plus élevé que l'hydro distillation incluse dans le travail [58] . Mais il présente un rendement faible par

rapport aux extraits obtenus par macération dans l'éthanol. La cardoncelle présente un rendement très faible, cela peut être expliqué par l'utilisation de la partie souterraine de la plante (rhizomes).



**Figure III. 7.** Huiles essentielles des plantes (: cyprès (A) et cardoncelle B).

**Tableau III. 5.** Rendement des huiles essentielles pour chaque plante.

| Plante      | Cyprès | Cardoncelle |
|-------------|--------|-------------|
| Rendement % | 0.635  | 0.03        |

Les HEs obtenues ont été des liquides limpides avec une odeur agréable chacune. L'HE du cyprès a une couleur jaunâtre et celle du cardoncelle est incolore (Figure III.8. A et B). Les caractéristiques des HEs obtenues sont en corrélation avec la norme AFNOR [59], qui définit les HEs comme des liquides volatiles à température ambiante.

### III.2. Caractérisation des huiles essentielles

Les résultats de l'analyse par GCMS, révèlent que l'HE du cyprès contient un total 45 composants chimiques (**Tableau III. 6**). Parmi eux, certains n'ont pas pu être identifiés car ils ne figurent pas dans la base de données de la plateforme utilisée pour l'analyse.

Le principal constituant est le (+)-epi-Bicyclosesquiphellandrene (20.16%), suivi de (E)-N-(4 Hydroxyphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)-4-oxohex-5-enamide (9.38 %) et de Terpinen-4-ol (5 %). Les mêmes composants sont trouvés dans [58] avec le Alpha-pinène a été trouvé comme composé majoritaire avec un taux de (41, 07%) [58].

**Tableau III. 6.**Analyse qualitative et quantitative de l'HE du cyprès par GC-MS.

| Numéro | Composant                                                                | TR (min) | Aire % |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|----------|--------|
| 1      | Alpha.-Phellandrene                                                      | 7.867    | 0.78   |
| 2      | Alpha.-Pinene                                                            | 8.136    | 4.16   |
| 3      | Sabinene                                                                 | 9.460    | 2.80   |
| 4      | Beta.-Myrcene                                                            | 9.995    | 0.96   |
| 5      | Terpinene alpha                                                          | 11.073   | 1.71   |
| 6      | Cymene <para>                                                            | 11.397   | 1.75   |
| 7      | D-Limonene                                                               | 11.613   | 5.83   |
| 8      | Gamma. Terpinene                                                         | 12.813   | 2.38   |
| 9      | 2-Carene                                                                 | 14.094   | 1.37   |
| 10     | 1.2.3-Trimethyl-cyclopent-2-enecarboxaldehyde                            | 15.249   | 0.65   |
| 11     | 1H-Imidazole-4-ethanamine, beta...beta.-dimethyl-                        | 15.478   | 0.22   |
| 12     | 2-Cyclohexen-1-ol. 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, trans-                   | 15.613   | 0.25   |
| 13     | Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1.alpha. 2.alpha | 16.445   | 0.27   |
| 14     | (E)-N-(4-Hydroxyphenyl)-6-(4-methoxyphenyl)-4-oxohex-5-enamide           | 18.169   | 9.38   |
| 15     | Terpinen-4-ol                                                            | 18.356   | 5.00   |
| 16     | Bicyclo[3.1.0]hexan-3-one, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-. [1S-(1 alpha..4. | 18.564   | 3.43   |
| 17     | L-alpha. Terpineal                                                       | 18.845   | 0.42   |
| 18     | 2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethyl)-                          | 21.784   | 0.16   |
| 19     | Thymol                                                                   | 23.450   | 0.20   |
| 20     | 4-Terpinenyl acetate                                                     | 23.828   | 0.46   |
| 21     | NI*                                                                      | 26.080   | 0.97   |
| 22     | NI                                                                       | 29.084   | 0.16   |
| 23     | (1S,4S,4aS)-1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,4,4a,5-hexahydronaphthale     | 30.601   | 5.07   |
| 24     | NI                                                                       | 30.897   | 1.07   |
| 25     | (+)-Epi-Bicyclosesquiphellandrene                                        | 31.531   | 20.16  |
| 26     | Alpha. Cubebene                                                          | 31.998   | 0.25   |
| 27     | Silphiperfol-6-en-5-one                                                  | 32.878   | 6.93   |
| 28     | NI                                                                       | 33.538   | 0.43   |
| 29     | Cadinene <delta->                                                        | 33.842   | 2.96   |
| 30     | NI                                                                       | 34.365   | 1.99   |
| 31     | NI                                                                       | 34.689   | 0.34   |
| 32     | NI                                                                       | 36.158   | 0.41   |
| 33     | Retinol, acetate                                                         | 36.883   | 0.20   |
| 34     | Cedrol                                                                   | 37.242   | 1.84   |
| 35     | NI                                                                       | 37.651   | 0.87   |
| 36     | Acorenol calpha->                                                        | 38.419   | 8.31   |
| 37     | NI                                                                       | 38.776   | 1.23   |
| 38     | NI                                                                       | 39.231   | 1.08   |
| 39     | NI                                                                       | 39.549   | 0.33   |

|    |                                                                      |        |      |
|----|----------------------------------------------------------------------|--------|------|
| 40 | NI                                                                   | 39.759 | 0.37 |
| 41 | NI                                                                   | 39.990 | 0.22 |
| 42 | NI                                                                   | 40.304 | 0.82 |
| 43 | Muurool-5-en-4-one <cis-14-nor->                                     | 40.641 | 1.30 |
| 44 | 2-Benzofuranmethanol, 2.4.5.6.7.7a-hexahydro-4.4.7a-trimethyl-, cis- | 41.789 | 0.36 |
| 45 | NI                                                                   | 42.975 | 0.16 |

NI\* : Non identifié

Contrairement à la première plante, l'analyse de l'HE par GCMS de la *Carthamus caeruleus* L. Issu de la région de la Mitidja n'a donné aucun résultat, ce qui pourrait être dû à la présence des gouttelettes d'eau dans son HE.

### III.3. Dosage des polyphénols et flavonoïdes

Pour déterminer la teneur en composés phénoliques dans les extraits, on a utilisé les courbes d'étalonnage spécifiques mentionnées dans l'annexe 1 et 2. Les résultats de la teneur en composés phénoliques dans les extraits du cyprès et de cardoncelle obtenus par macération sont présentés dans le **Tableau III. 7**.

**Tableau III. 7.**Résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes.

| Plantes                                   | Cyprès | Cardoncelle |
|-------------------------------------------|--------|-------------|
| Taux des polyphénols (mg EAG/g d'extrait) | 152.92 | 8.764       |
| Taux des flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait)  | 5.709  | 3.47        |

On constate que le taux des polyphénols de cardoncelle est supérieur à celui de flavonoïdes même résultat inclus en [6] Mais le taux des polyphénols et flavonoïdes reste faible devant les feuille de cyprès.

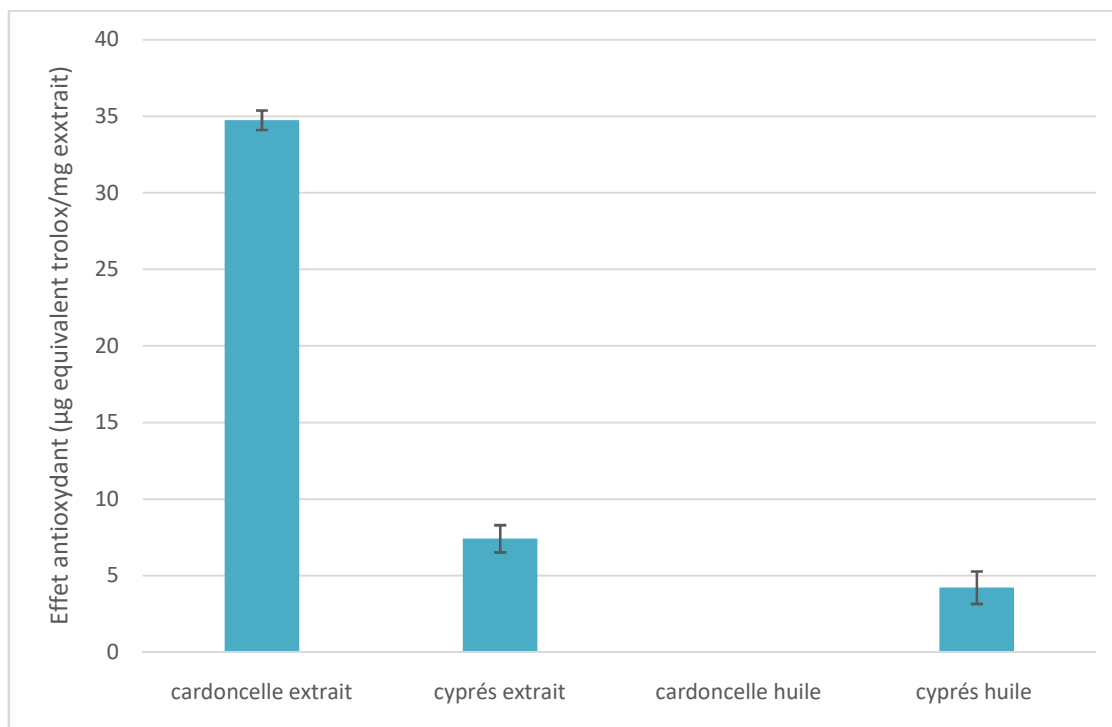
### III.4. Activité Antioxydante

Afin d'évaluer l'activité antioxydant des différents extraits, plusieurs méthodes ont été utilisées à savoir : DPPH, ABTS et phénantroline et FRAP. Les calculs sont effectués par la méthode d'équivalence et le standard Trolox est utilisé pour déterminer le composant qui un le pouvoir réducteur le plus élevé. Les microplaques sont représentées en **Annexe 3**.

#### III.4.1. Méthode du DPPH

Les résultats de l'activité antioxydant par la méthode du DPPH sont regroupés dans le **Tableau III.8**. On a trouvé que l'activité antioxydant varie même pour une même plante (**Figure III.8**). L'extrait de la cardoncelle montre une forte activité antioxydante, tandis que

son huile n'en présente aucune. En plus, pour le cyprès, l'activité antioxydante est présente dans l'extrait mais absente dans l'huile.



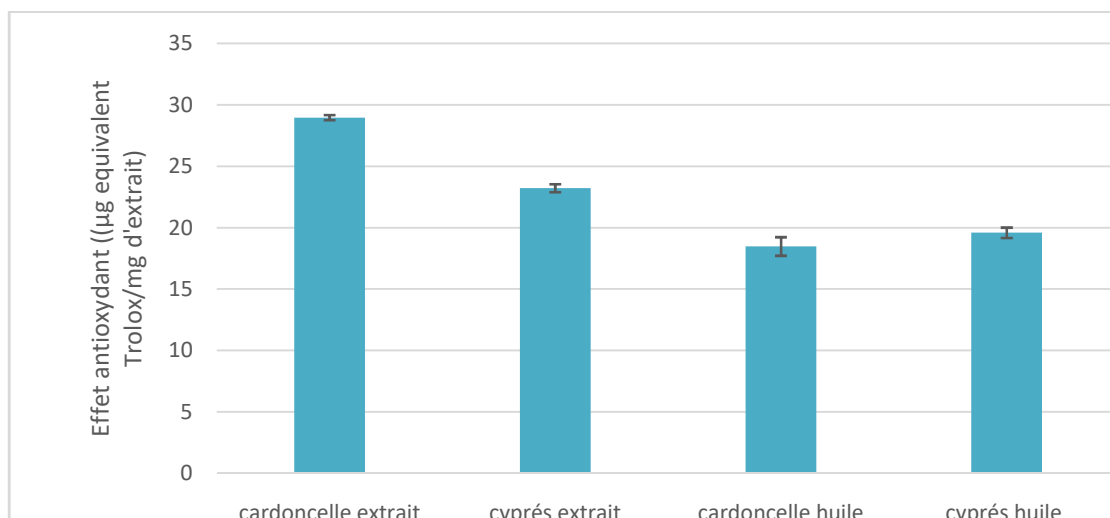
**Figure III. 8.**Activité anti-radicalaire des huiles et des extraits contre le radical DPPH.

**Tableau III. 8.**Valeurs des IC50 obtenues des huiles et des extraits contre le radical DPPH.

| Plante      | Produit | Moyenne ± écart type | IC50 (µg/mL) |
|-------------|---------|----------------------|--------------|
| Cyprès      | Extrait | 7,41±0,88            | 14,83        |
|             | HE      | 4,22±1,06            | 8,44         |
| Cardoncelle | Extrait | 34,74±0,63           | 69,48        |
|             | HE      | 0                    | -10,13       |

#### III.4.2. Méthode d'ABTS

L'histogramme présenté dans la **Figure III.9**, illustre la répartition des valeurs d'activité antioxydante (ABTS) de différentes espèces de plantes, mesurées en microgramme (µg) équivalent de Trolox par milligramme (mg) d'extrait. En plus, le **Tableau III.9**. Représente la répartition des valeurs d'activité antioxydante ABTS. Les extraits ont une activité plus prononcée que les HEs des deux plantes.



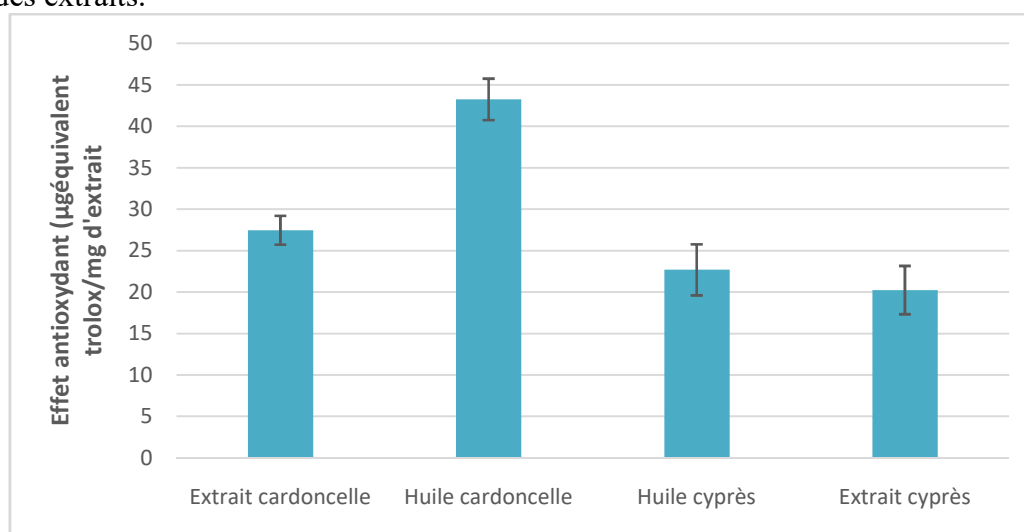
**Figure III. 9.**Activité antiradicalaire des huiles et des extraits contre le radical ABTS.

**Tableau III. 9.**Valeurs des IC50 obtenues des huiles et des extraits contre le radical ABTS.

| Plante      | Produit | Moyenne ± écart type | IC50 (µg/mL) |
|-------------|---------|----------------------|--------------|
| Cyprés      | Extrait | 23,21±0,32           | 92,87        |
|             | HE      | 19,58±0,42           | 78,34        |
| Cardoncelle | Extrait | 28,96±0,20           | 115,86       |
|             | HE      | 18,47±0,75           | 73,89        |

#### III.4.3. Méthode à la phénantroline

Les résultats (**Tableau III.10.** et **Figure III. 10**) indiquent que l'activité antioxydante par la méthode de phénantroline de l'huile de cardoncelle est plus élevée que celle de l'huile du cyprés et des extraits.



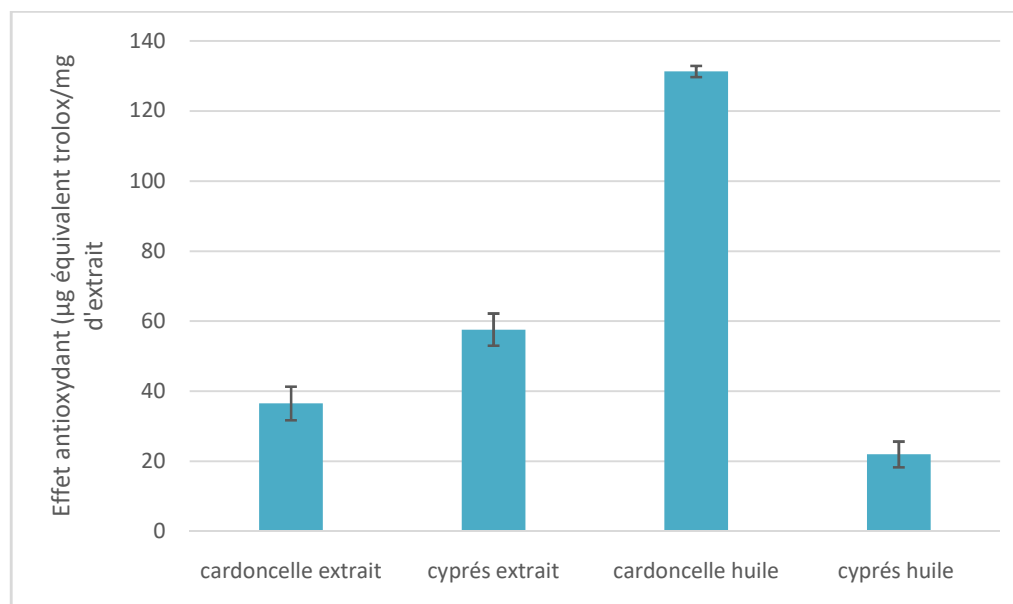
**Figure III. 10.**Activité antiradicalaire des huiles et des extraits par la méthode de phénantroline

**Tableau III. 10.** Valeurs des IC<sub>50</sub> obtenues des huiles et des extraits par la méthode de phénantroline.

| Plante      | Produit | Moyenne $\pm$ écart type |
|-------------|---------|--------------------------|
| Cyprés      | Extrait | 20,24 $\pm$ 2,91         |
|             | HE      | 22,68 $\pm$ 3,07         |
| Cardoncelle | Extrait | 27,46 $\pm$ 1,73         |
|             | HE      | 43,24 $\pm$ 2,50         |

### III.4.4. Méthode de FRAP

Les résultats (**Tableau III.11.** et **Figure III. 11**) indiquent que l'activité antioxydante par la méthode de FRAP que l'huile de cardoncelle a l'effet antioxydant le plus élevé avec une valeur 131.28  $\mu$ g équivalent trolox/mg d'extrait, alors que l'huile de cyprès a une activité plus faible avec une valeur de 21.98  $\mu$ g équivalent trolox/mg d'extrait.

**Figure III. 11.** Activité antiradicalaire des huiles et des extraits par la méthode FRAP.**Tableau III. 11.** Valeurs des IC<sub>50</sub> obtenues des huiles et des extraits par la méthode de FRAP.

| Plante      | Produit | Moyenne $\pm$ écart type |
|-------------|---------|--------------------------|
| Cyprés      | Extrait | 57,59 $\pm$ 4,59         |
|             | HE      | 21,98 $\pm$ 3,69         |
| Cardoncelle | Extrait | 36,54 $\pm$ 4,77         |
|             | HE      | 131,28 $\pm$ 1,60        |

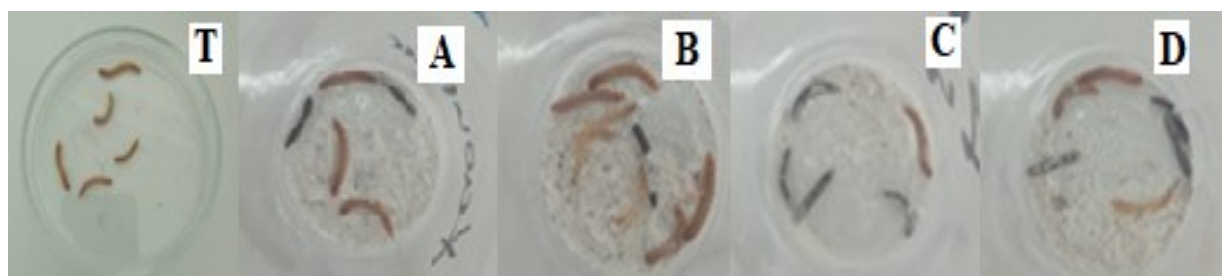
### III.5. Test de cytotoxicité

Les résultats de suivi de vie des larves de vers de farine sont comparés à un standard et sont récapitulés dans le **Tableau III. 12**.

**Tableau III. 12.** Pourcentages de survivants des larves de *Tenebrio Molitor* après 5 jours de surveillance.

| Nombre de vers de farine morts |   |   |   |   |   | Taux de survivant (%) | Nombre de vers développés |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|-----------------------|---------------------------|
| Jours                          | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |                       |                           |
| Extrait cardoncelle            | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 60                    | 1                         |
| Extrait cyprès                 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 80                    | 4                         |
| HE cardoncelle                 | 2 | 3 | 4 | 4 | 4 | 20                    | /                         |
| HE cyprès                      | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 60                    | 1                         |
| Standard (méthanol)            | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100                   | /                         |

La plus faible cytotoxicité a été obtenue avec l'extrait du cyprès avec un taux, suivi par l'HE de la même plante et par l'extrait de cardoncelle. Néanmoins, l'HE de cardoncelle adonné la cytotoxique la plus élevée. En plus, quelques vers survivants ont changé leur revêtement externe ainsi ils sont grossi de taille surtout dans le cas de l'HE du cyprès (**Figure III.12**), ou on a constaté un taux de développement de 100%. Cela est expliqué par la maturation des larves vers des nymphes, qui sont une forme plus évoluée du cycle de vie des vers de farine [60]. On peut conclure de l'HEs est un milieu riche en éléments nutritifs nécessaires aux développements des larves et qu'elle ne présente qu'un très faible degré de cytotoxicité [60].



**Figure III. 12.** Résultats de suivi pendant le cinquième jour de cytotoxicité des : (T) Témoin, (A) Extrait cardoncelle, (B) Extrait cyprès, (C) HE cardoncelle, (D) HE cyprès.

### III.6. Activité anti bactérienne

L'activité antibactérienne est évaluée en mesurant la zone d'inhibition des bactéries autour du disque d'extrait ou d'huile (**Figure III.13**). Selon L'échelle de Poncé [61], les diamètres d'inhibition sont classés en quatre classes (**Tableau III. 13.**)

**Tableau III. 13.** Echelle de Poncé des diamètres d'inhibition.

| Sensibilité du germe | Degré de sensibilité | Diamètre (mm) |
|----------------------|----------------------|---------------|
| Extrêmement sensible | +++                  | > 20          |
| Très sensible        | ++                   | 15-19         |
| Sensible             | +                    | 8-14          |
| Résistant            | -                    | <8            |

Les résultats de l'activité antibactérienne sont les extraits et huiles sont récapitulées dans **Tableau III.14.**

**Tableau III. 14.** Résultats de l'activité antibactérienne des extraits et des huiles.

| Souche testée                 | Produit                | Zone d'inhibition |                      | Sensibilité du germe |
|-------------------------------|------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
|                               |                        | Diamètre (mm)     | Degré de sensibilité |                      |
| <i>Staphylocoque aureus</i>   | Huile de cardoncelle   | -                 | -                    | Résistant            |
|                               | Huile cyprès           | 11.6              | +                    | Sensible             |
|                               | Extrait de cardoncelle | 17.6              | ++                   | Très sensible        |
|                               | Extrait de cyprès      | 15.3              | ++                   | Très sensible        |
| <i>Escherichia coli</i>       | Huile de cardoncelle   | -                 | -                    | Résistant            |
|                               | Huile de cyprès        | 12.6              | +                    | Sensible             |
|                               | Extrait de cardoncelle | 15                | ++                   | Très sensible        |
|                               | Extrait de cyprès      | 16                | ++                   | Très sensible        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Huile de cardoncelle   | 10                | +                    | Sensible             |
|                               | Huile de cyprès        | -                 | -                    | Résistant            |
|                               | Extrait de cardoncelle | 17                | ++                   | Très sensible        |
|                               | Extrait de cyprès      | 13.6              | +                    | Sensible             |

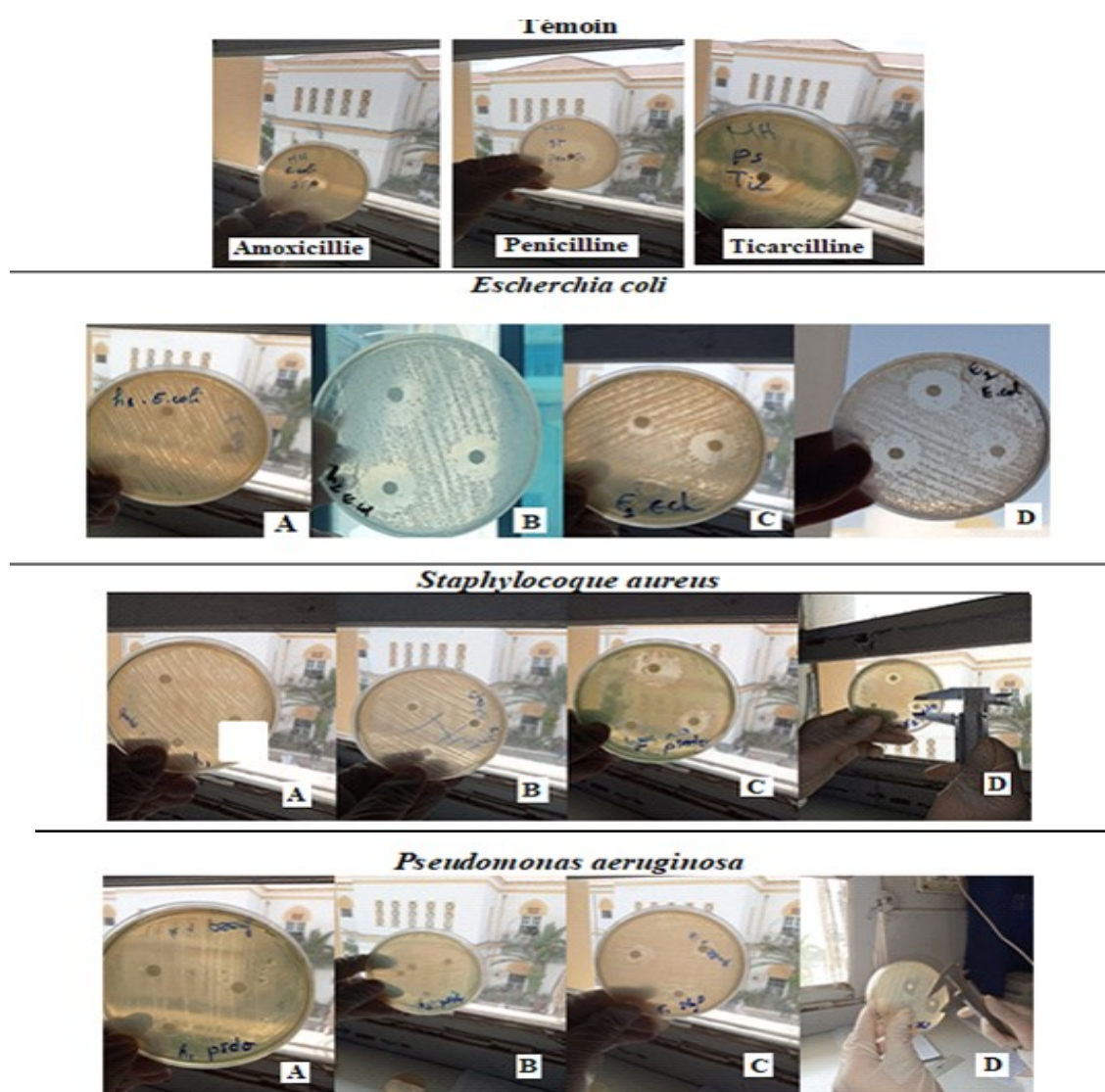
D'après les résultats mentionnés dans le **Tableau III.14.**, l'huile de cardoncelle n'a aucune activité contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, mais elle montre une activité contre *Pseudomonas aeruginosa*. Donc l'activité de cette huile n'as pas de relation avec le type de la bactérie Gram (+) ou (-) mais son activité est plutôt spécifique à la bactérie testée bien qu'elle soit moindre par rapport à celle de son extrait, qui présente une activité significativement plus élevée. L'huile du cyprès présente une activité antibactérienne acceptable sur le *Staphylocoque aureus* et l'*Escherichia Coli* mais elle n'a aucune activité sur le *Pseudomonas aeruginosa* donc son activité est spécifique à la bactérie testée. Les extraits des deux plantes possèdent des activités significatives sur la croissance des trois germes, surtout sur le *Staphylocoque aureus* et l'*Escherichia coli*. Les antibiotiques témoins utilisés sont l'amoxicilline pour l'*Escherichia coli*, la pénicilline pour *Staphylocoque aureus* et la ticarcilline pour le *Pseudomonas aeruginosa* (**Figure III. 13**).

Ces résultats nous conduisent à tester les mélanges binaires ternaires des huiles et des extraits. Quatre types des mélanges ont été testés : mélange des huiles, mélange des extraits, mélange de l'extrait de cardoncelle avec l'huile du cyprès et mélange des extraits avec l'huile du cyprès. Les résultats de l'activité antibactérienne des mélanges préparés sont récapitulés dans le **Tableau III.15**.

**Tableau III. 15.**Résultats de l'activité antibactérienne des mélanges des extraits et des huiles.

| Souche testée               | Produit                                     | Zone d'inhibition |                      | Sensibilité du germe |
|-----------------------------|---------------------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
|                             |                                             | Diamètre (mm)     | Degré de sensibilité |                      |
| <i>Staphylocoque aureus</i> | Mélange des huiles                          | 15.6              | ++                   | Très sensible        |
|                             | Mélanges des extraits                       | 17.3              | ++                   | Très sensible        |
|                             | Extrait de cardoncelle avec huile de cyprès | 19                | ++                   | Très sensible        |
|                             | Mélange des extraits et l'huile du cyprès   | 24.6              | +++                  | Extrêmement sensible |
| <i>Escherichia coli</i>     | Mélange des huiles                          | -                 | -                    | Résistant            |
|                             | Mélange des extraits                        | 17.3              | ++                   | Très sensible        |
|                             | Extrait de cardoncelle avec huile de cyprès | 20                | +++                  | Extrêmement sensible |

|                               |                                             |      |     |                      |
|-------------------------------|---------------------------------------------|------|-----|----------------------|
|                               | Mélange des extraits et l'huile du cyprès   | 32   | +++ | Extrêmement sensible |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Mélange des huiles                          | -    | -   | Résistant            |
|                               | Mélange des extraits                        | 12   | +   | Sensible             |
|                               | Extrait de cardoncelle avec huile de cyprès | 17.3 | ++  | Très sensible        |
|                               | Mélange des extraits et l'huile du cyprès   | 20.5 | +++ | Extrêmement sensible |



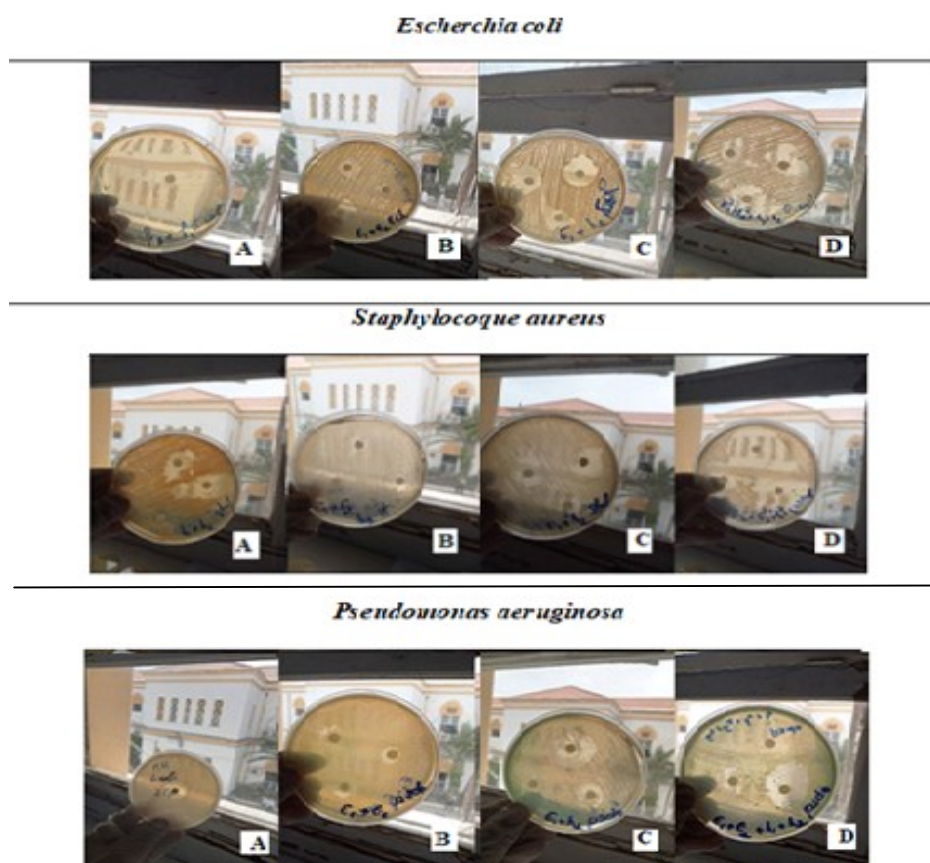
**Figure III. 13.** Diamètres d'inhibition de la croissance des différentes souches bactériennes après application du témoin, des huiles de cardoncelle (A) et du cyprès (B) et des extraits de cardoncelle (C) et du cyprès (D).

Les mélanges des huiles étaient bénéfiques seulement pour inhiber la croissance du *Staphylocoque aureus*, et cette inhibition est attribuée à l'huile du cyprès. On suppose que l'absence d'activité du mélange des huiles sur l'*Escherichia coli* est due à l'activité faible de l'huile de cardoncelle ainsi d'une possible interaction entre les deux huiles. Par conséquent, l'huile de cardoncelle n'a pas été utilisée pour les tests qui suivent.

Les mélanges des extraits montrent une activité légèrement supérieure ou égale à celle des extraits seuls. En plus, les mélanges des extraits montrent une activité supérieure à celle des mélanges d'huiles.

Un effet synergique est observé lorsque l'extrait de cardoncelle et d'huile du cyprès sont utilisés, avec une sensibilité élevée des souches testées.

Le mélange ternaire des extraits des deux plantes avec l'huile du cyprès montre l'activité antibactérienne la plus prononcée sur toutes les souches étudiées, donc ce mélange est utilisé a une forte activité antibactérienne (Figure III.14).



**Figure III. 14.** Diamètres d'inhibition de la croissance des différentes souches bactériennes après application des : mélange des huiles (A), mélange des extraits (B), mélange de l'huile du cyprès avec l'extrait du cardoncelle (C) et mélange de l'huile du cyprès avec les extraits des deux plantes (D)

### III.7. Activité antifongique

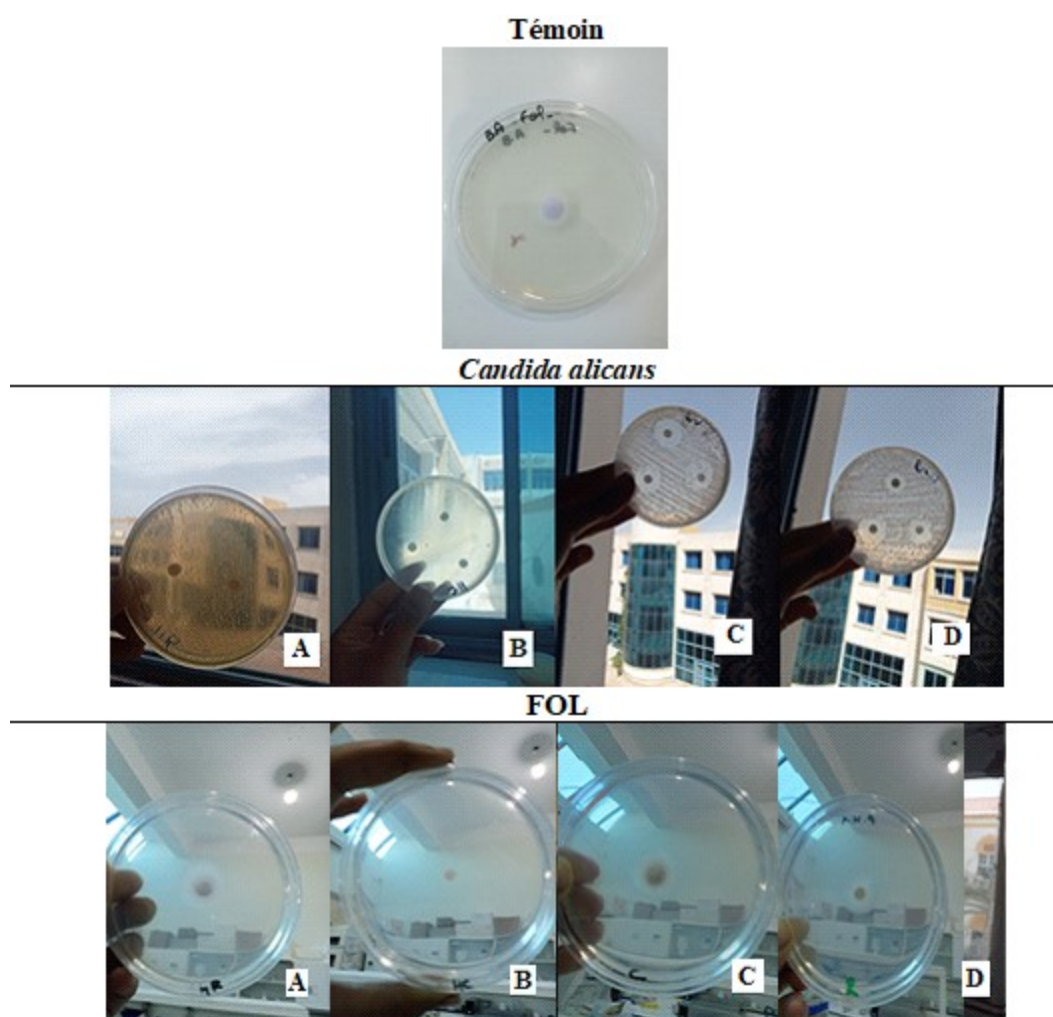
L'activité antifongique est évaluée de la même manière que l'activité antibactérienne, en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition (méthode de diffusion par disque).

**Tableau III. 16.** récapitule les résultats de l'activité antibactérienne sur les extraits et huiles.

**Tableau III. 16.**Résultats de l'activité antifongique des extraits et des huiles.

| Souche testée           | Produit                | Zone d'inhibition |                      | Sensibilité du germe |
|-------------------------|------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
|                         |                        | Diamètre (mm)     | Degré de sensibilité |                      |
| <i>Candida albicans</i> | Huile de cardoncelle   | 12.5              | +                    | Sensible             |
|                         | Huile cyprès           | Diffusion totale  | +++                  | Extrêmement sensible |
|                         | Extrait de cardoncelle | 20.6              | +++                  | Extrêmement sensible |
|                         | Extrait de cyprès      | 18.6              | ++                   | Très sensible        |
| <b>FOL</b>              | Huile de cardoncelle   | 18                | ++                   | Très sensible        |
|                         | Huile de cyprès        | 95                | +++                  | Extrêmement sensible |
|                         | Extrait de cardoncelle | 12                | +                    | Sensible             |
|                         | Extrait de cyprès      | 10                | +                    | Sensible             |

On constate que l'activité antifongique est remarquable, surtout pour le sapin, qui présente une très forte activité antifongique. Cette efficacité est observée tant pour son huile, qui est totalement diffusée, que pour son extrait (**Figure III.15.**).



**Figure III. 15.** Diamètres d'inhibition de la croissance des différentes souches fongiques après application du témoin, des huiles de cardoncelle (A) et du cyprès (B) et des extraits de cardoncelle (C) et du cyprès (D).

Comme dans le cas de l'activité antibactérienne, les résultats nous conduisent à tester les mélanges binaires et ternaires des huiles et des extraits. Trois types des mélanges ont été testés : mélange des huiles, mélange des extraits et mélange des extraits avec l'huile du cyprès. Les résultats de l'activité antifongique des mélanges préparés sont récapitulés dans le **Tableau III. 17.**

**Tableau III. 17.** Résultats de l'activité antifongique des mélanges des extraits et des huiles.

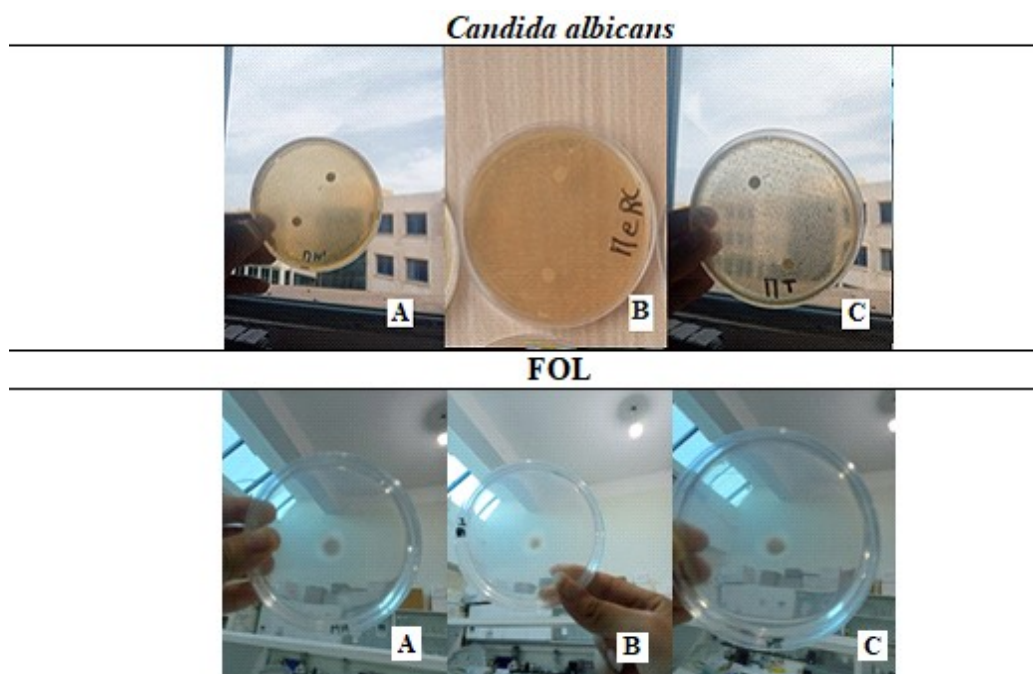
| Souche testée | Produit               | Zone d'inhibition |                      | Sensibilité du germe |
|---------------|-----------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
|               |                       | Diamètre (mm)     | Degré de sensibilité |                      |
|               | Mélange des huiles    | 15                | ++                   | Très sensible        |
|               | Mélanges des extraits | 21                | +++                  | Extrêmement          |

|                         |                                              |    |     |                      |
|-------------------------|----------------------------------------------|----|-----|----------------------|
| <i>Candida albicans</i> |                                              |    |     | sensible             |
|                         | Mélange des extraits et de l'huile du cyprès | 14 | ++  | Très sensible        |
| <b>FOL</b>              | Mélange des huiles                           | 20 | +++ | Extrêmement sensible |
|                         | Mélange des extraits                         | 25 | +++ | Extrêmement sensible |
|                         | Mélange des extraits et de l'huile du cyprès | 50 | +++ | Extrêmement sensible |

Le mélange des huiles conduit à une diminution de l'activité antifongique. Cela est peut être due à un antagonisme dans l'activité des deux huiles. Donc l'huile de cardoncelle n'est plus utilisée dans le reste du travail.

Les mélanges des extraits donnent une activité légèrement supérieure à celle des extraits seuls et à celle des mélanges d'huiles.

Le mélange des extraits et de l'huile du cyprès montre une activité acceptable pour le *Candida* et une activité satisfaisante pour le FOL (**Figure III.16.**).



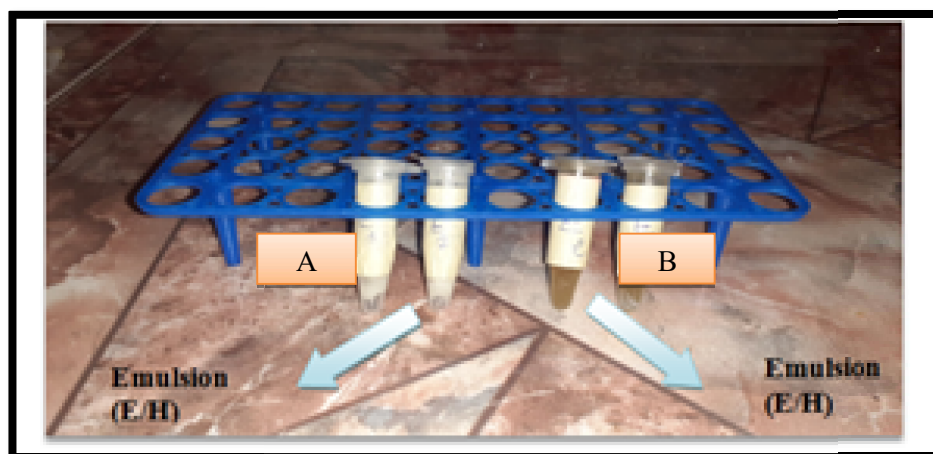
**Figure III. 16.**Diamètres d'inhibition de la croissance des différentes souches fongiques après application des : mélange des huiles (A), mélange des extraits (B), et mélange de l'huile du cyprès avec les extraits des deux plantes (C).

### III.8. Optimisation de la formulation des crèmes

#### III.8.1 Type de la crème

Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits et des huiles, permettent de choisir le meilleur composant actif à intégrer dans la formulation de la crème. Le mélange qui contient l'huile de cyprès et les extraits des plantes en quantités équivalentes montre une activité antibactérienne et antifongique très satisfaisante donc il a été choisi comme principe actif de la crème à formuler.

Afin d'optimiser le type de cette crème, on a préparé deux formulations de la même concentration (0.2%), une hydrophile par émulsion H/E (Crème 1), l'autre lipophile par émulsion E/H (Crème 2) (**Figure III. 17**).



**Figure III. 17.**Crème hydrophile (A) et crème lipophile (B).

Les activités antibactérienne et antifongique des crèmes formulées ont été évaluées. L'activité anti bactérienne est évaluée pour les crèmes par la méthode des puits et l'antifongique à l'aide de la méthode de diffusion des disques. La crème commerciale Biafine a été utilisée comme témoin. **Tableau III.18.** Résume les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents types.

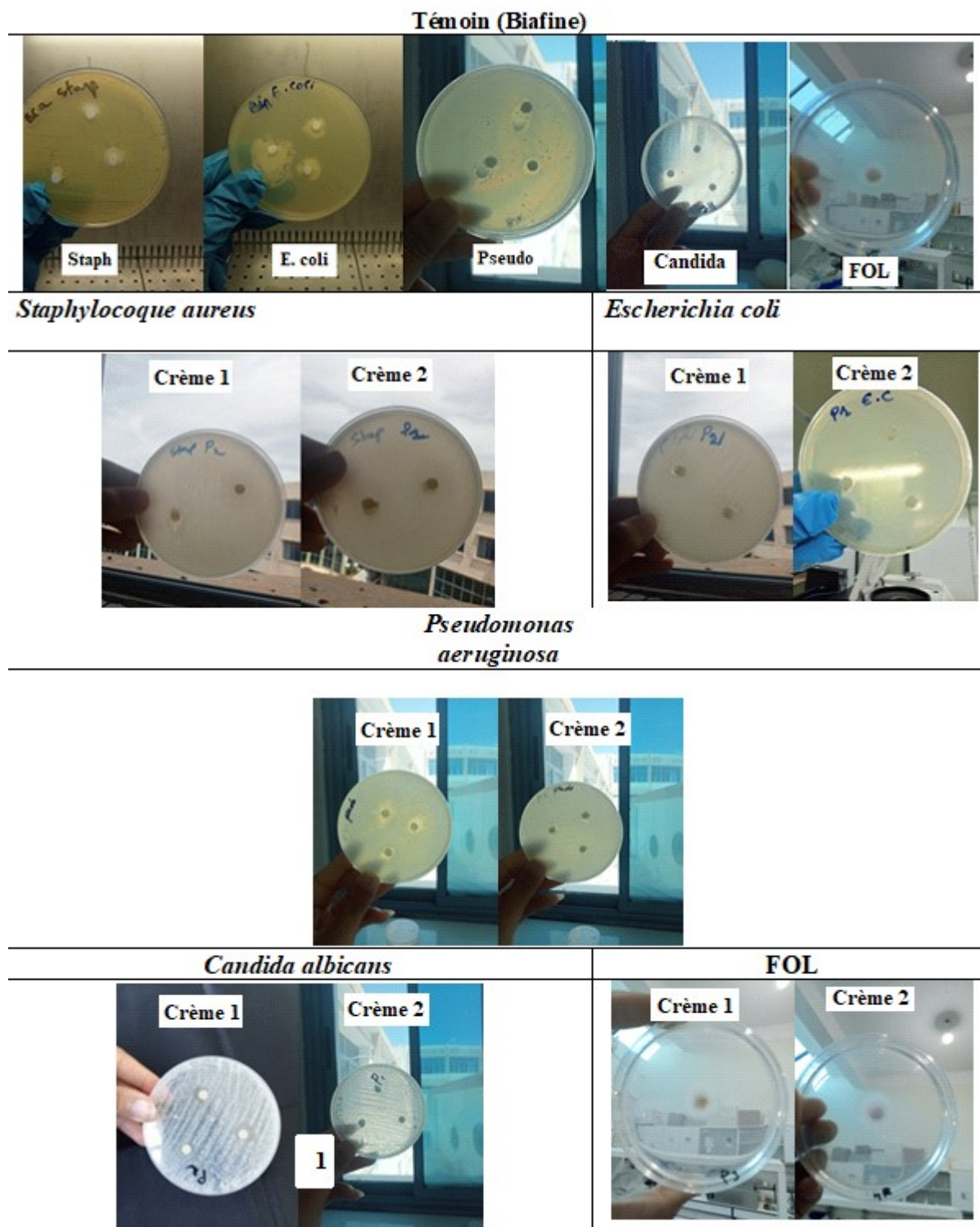
**Tableau III. 18.**Résultats de l'activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents types.

| Souche testée               | Type de la souche | Produit | Zone d'inhibition |                      | Sensibilité du germe |
|-----------------------------|-------------------|---------|-------------------|----------------------|----------------------|
|                             |                   |         | Diamètre (mm)     | Degré de sensibilité |                      |
| <i>staphylocoque aureus</i> | Bactérie          | Crème 1 | 24.3              | +++                  | Extrêmement sensible |

|                               |            |         |      |     |                      |
|-------------------------------|------------|---------|------|-----|----------------------|
|                               |            | Crème 2 | 7.5  | -   | Résistant            |
|                               |            | Biafine | 14.6 | ++  | Très sensible        |
| <i>Escherichia coli</i>       | Bactérie   | Crème 1 | 31   | +++ | Extrêmement sensible |
|                               |            | Crème 2 | -    | -   | Résistant            |
|                               |            | Biafine | 16.6 | ++  | Très sensible        |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bactérie   | Crème 1 | 11.3 | +   | Sensible             |
|                               |            | Crème 2 | 7.3  | -   | Résistant            |
|                               |            | Biafine | 11.6 | +   | Sensible             |
| <i>Candida albicans</i>       | Champignon | Crème 1 | 16.6 | ++  | Très sensible        |
|                               |            | Crème 2 | -    | -   | Résistant            |
|                               |            | Biafine | 11   | +   | Sensible             |
| FOL                           | Champignon | Crème 1 | 43.3 | +++ | Très sensible        |
|                               |            | Crème 2 | 8    | +   | Sensible             |
|                               |            | Biafine | 5    | -   | Résistant            |

La crème hydrophile (Crème 1) a donné la meilleure activité antibactérienne et antifongique avec une sensibilité extrême de *Staphylocoque aureus* d'*Escherichia coli*. L'activité de la Crème 1 était supérieure à celle de la Crème 2 et du Témoin pour toutes les souches étudiées, à l'exception de *Pseudomonas* ou elle était presque égale à celle de la Biafine. Ces résultats peuvent être expliqués du fait que la crème hydrophile a bien diffusée dans le disque. En plus elle présente plusieurs avantages par rapport à la crème hydrophobe.

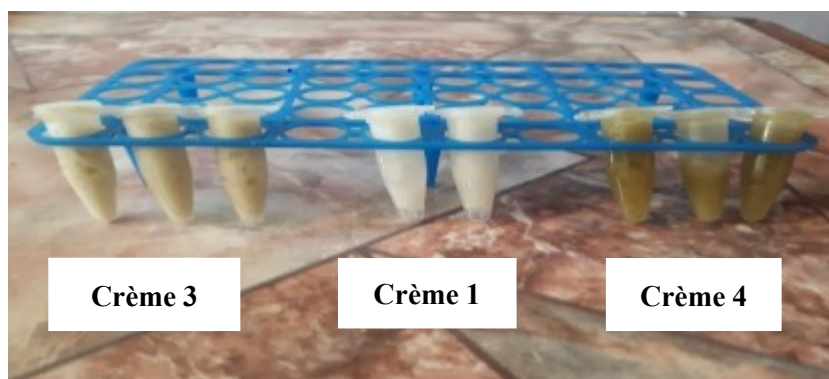
Les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique des deux crèmes préparés sont illustrés dans la **Figure III.18**.



**Figure III. 18.** Résultats de l'activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents types.

### III.8.2. Dosage de la crème

Afin d'optimiser le dosage de la crème, trois teneurs en principe actif ont été choisis 0.2%, 0.35% et 0.5% (**Figure III.19.**) et les crèmes formulées ont été désignées comme : Crème 1, Crème 3 et Crème 4.



**Figure III. 19.**Crèmes hydrophiles à différentes concentrations (1) 0.2%, (2) 0.35% et (3) 0.5%.

La **Figure III. 20** et le **Tableau III.19.** Présentent les résultats de l'activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents dosages.

**Tableau III. 19.**Résultats de l'activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents dosages.

| Souche testée                 | Type de la souche | Produit | Zone d'inhibition |                      | Sensibilité du germe |
|-------------------------------|-------------------|---------|-------------------|----------------------|----------------------|
|                               |                   |         | Diamètre (mm)     | Degré de sensibilité |                      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | Bactérie          | Crème 1 | 24.3              | +++                  | Extrêmement sensible |
|                               |                   | Crème 3 | 9                 | +                    | Sensible             |
|                               |                   | Crème 4 | 11                | +                    | Sensible             |
| <i>Escherichia Coli</i>       | Bactérie          | Crème 1 | 31                | +++                  | Extrêmement sensible |
|                               |                   | Crème 3 | -                 | -                    | Résistant            |
|                               |                   | Crème 4 | -                 | -                    | Résistant            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bactérie          | Crème 1 | 11.3              | +                    | Sensible             |
|                               |                   | Crème 3 | 14                | ++                   | Très sensible        |
|                               |                   | Crème 4 | 15.3              | ++                   | Très sensible        |

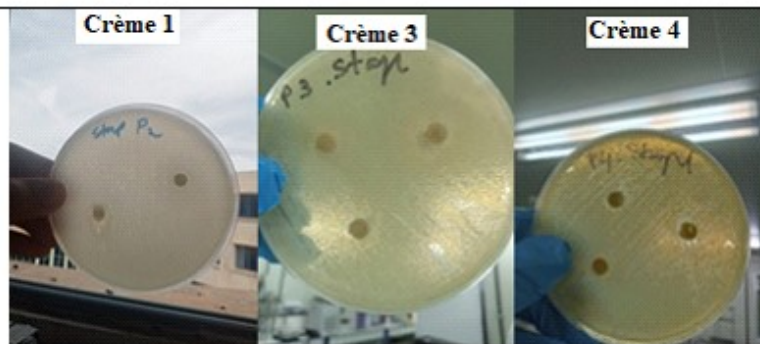
|                         |            |         |      |     |                      |
|-------------------------|------------|---------|------|-----|----------------------|
| <i>Candida albicans</i> | Champignon | Crème 1 | 16.6 | ++  | Très sensible        |
|                         |            | Crème 3 | -    | -   | Résistant            |
|                         |            | Crème 4 | -    | -   | Résistant            |
| FOL                     | Champignon | Crème 1 | 43.3 | +++ | Extrêmement sensible |
|                         |            | Crème 3 | 3.5  | -   | Résistant            |
|                         |            | Crème 4 | 23.5 | +++ | Extrêmement sensible |

Nous constatons que la crème à 2%, à une zone d'inhibition de croissance pour toutes les souches testées et un effet supérieur par rapport aux autres formulations et au témoin. Une zone d'inhibition plus grande autour de l'application de la crème sur une culture bactérienne ou fongique indique que la crème empêche la croissance microbienne de manière très efficace.

En plus, on a noté une diminution de l'activité pour les dosages de 3.5 et 5 % dans la plus part des souches testées. On suppose que cela est dû à une diminution dans la solubilité des extraits incorporés dans les crèmes à 3.5 et à 5 %, ce qui provoque un problème dans l'homogénéité et de distribution des composants actifs au sein de la crème.

On constate aussi que la crème hydrophile à 2 % présente une activité antifongique supérieure à celle de la crème commercialisée.

Par conséquent, la crème hydrophile à 2 % est une approche intéressante dans l'inhibition de croissance des souches testées et elle possède un effet antibactérien et antifongique notable. Elle a été choisie comme formule optimale.

*Staphylocoque aureus**Escherichia coli**Pseudomonas aeruginosa**Candida albicans***FOL**

**Figure III. 20.** Résultats de l'activité antibactérienne et antifongique sur les crèmes de différents dosages.

### III.9. Contrôle qualité de la crème

#### III.9.1.Caractéristique organoleptique de la crème

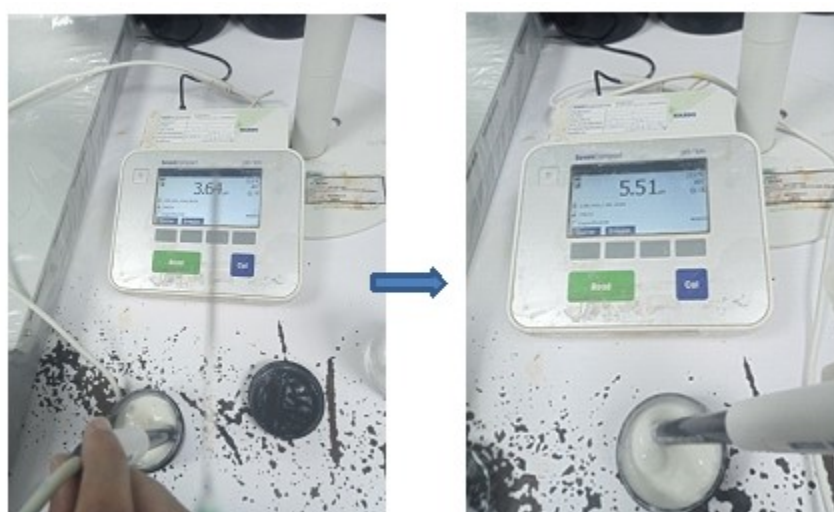
La crème a une couleur blanche et une odeur agréable, sa consistance est pâteuse. (**Figure III. 21**).



**Figure III. 21.**Aspect de la crème.

#### III.9.1 pH de la crème

La première mesure du pH du crème a donné une valeur de 4,39. Donc pour l'ajuster, une solution de bicarbonate de sodium a été utilisée. Le pH final a une valeur de 5,5 (**Figure III. 22**) qui est plus proche au pH naturel de la peau[62].



**Figure III. 22.**pH de la crème.

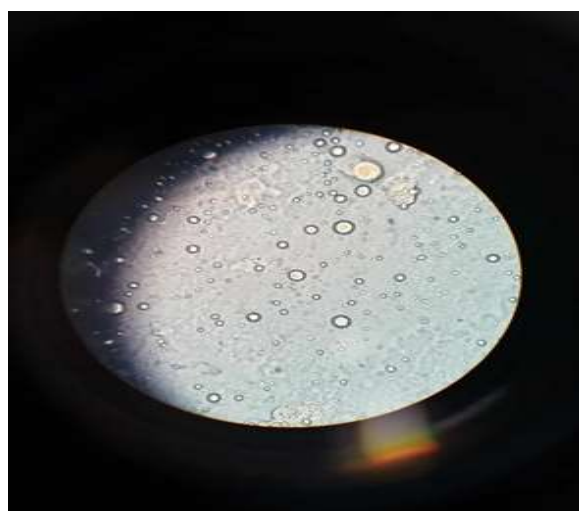
### III.9.2 Type de l'émulsion

Pour confirmer le type d'émulsion préparée, on a utilisé la méthode de dilution [63]. en ajoutant un petit volume d'eau à la crème. L'obtention d'un mélange homogène indique que l'émulsion est de type huile dans l'eau (H/E). (**Figure III.23**).



**Figure III. 23.**Type d'émulsion par dilution.

L'observation microscopique d'une gouttelette des crèmes préparées a révélé une dispersion idéale des gouttelettes de la phase huileuse dans la phase aqueuse, avec une taille presque similaire et acceptable, comme le montre la **Figure III.24**.



**Figure III. 24.**Type d'émulsion par microscope.

### III.9.3 Viscosité

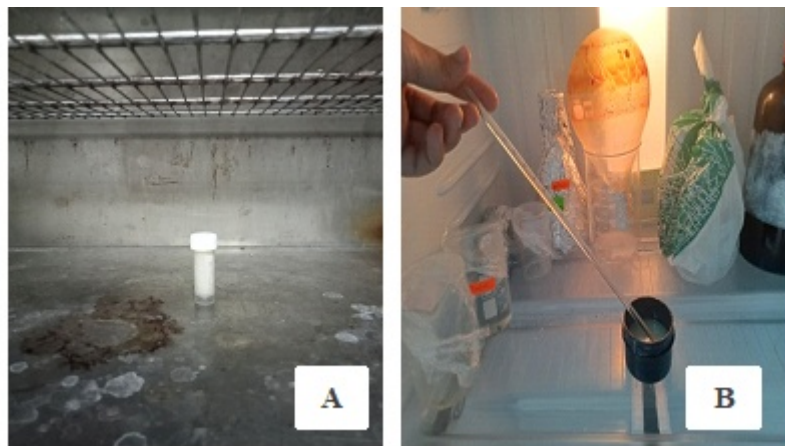
À l'aide d'un viscosimètre, on a mesuré la viscosité de la crème et on l'a comparé à celle de la

Biafine. Les deux valeurs sont très proches (5.18 Pa.s pour la crème et pour 5.52 Pa.s pour la Biafine), ce qui montre la bonne consistance de la crème formulée.

#### III.9.4 Etude de stabilité

##### a) Vieillessement en enceinte climatique:

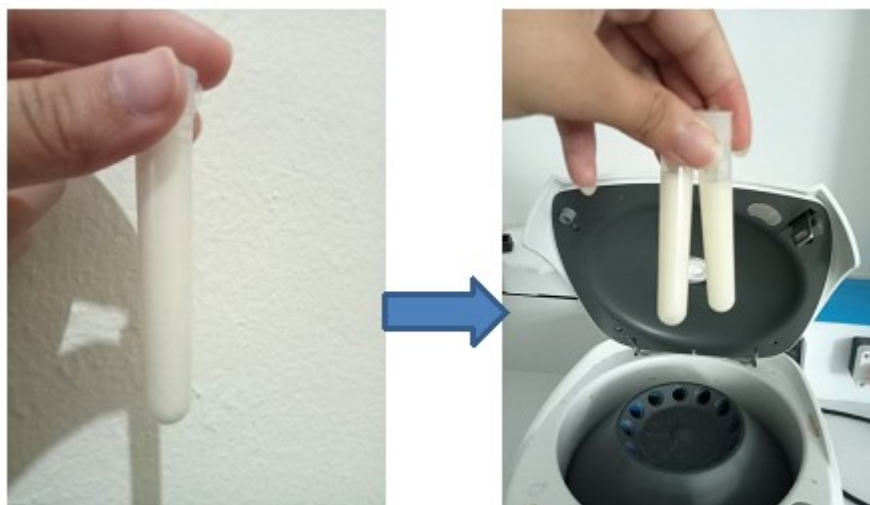
Ce test est effectué sous 3 températures différentes 4°C, 40°C et 60°C pendant deux heures de temps [62]. Aucune séparation de phase n'a été observée. Dons la crème est stable (**Figure III.25.**).



**Figure III. 25.**Vieillessement en enceinte climatique (A) Vieillessement au chaud (B) Vieillessement à froid.

##### b) Sédimentation forcée

Après la centrifugation de la crème pendant 10 min à 1000 rpm, la crème ne montre aucune séparation de phases, donc elle est stable (**Figure III.26.**).



**Figure III. 26.**Sédimentation forcée.

### III.9.6. Etude *In vivo*

#### III.9.6.1. Test d'irritation sur la peau humaine

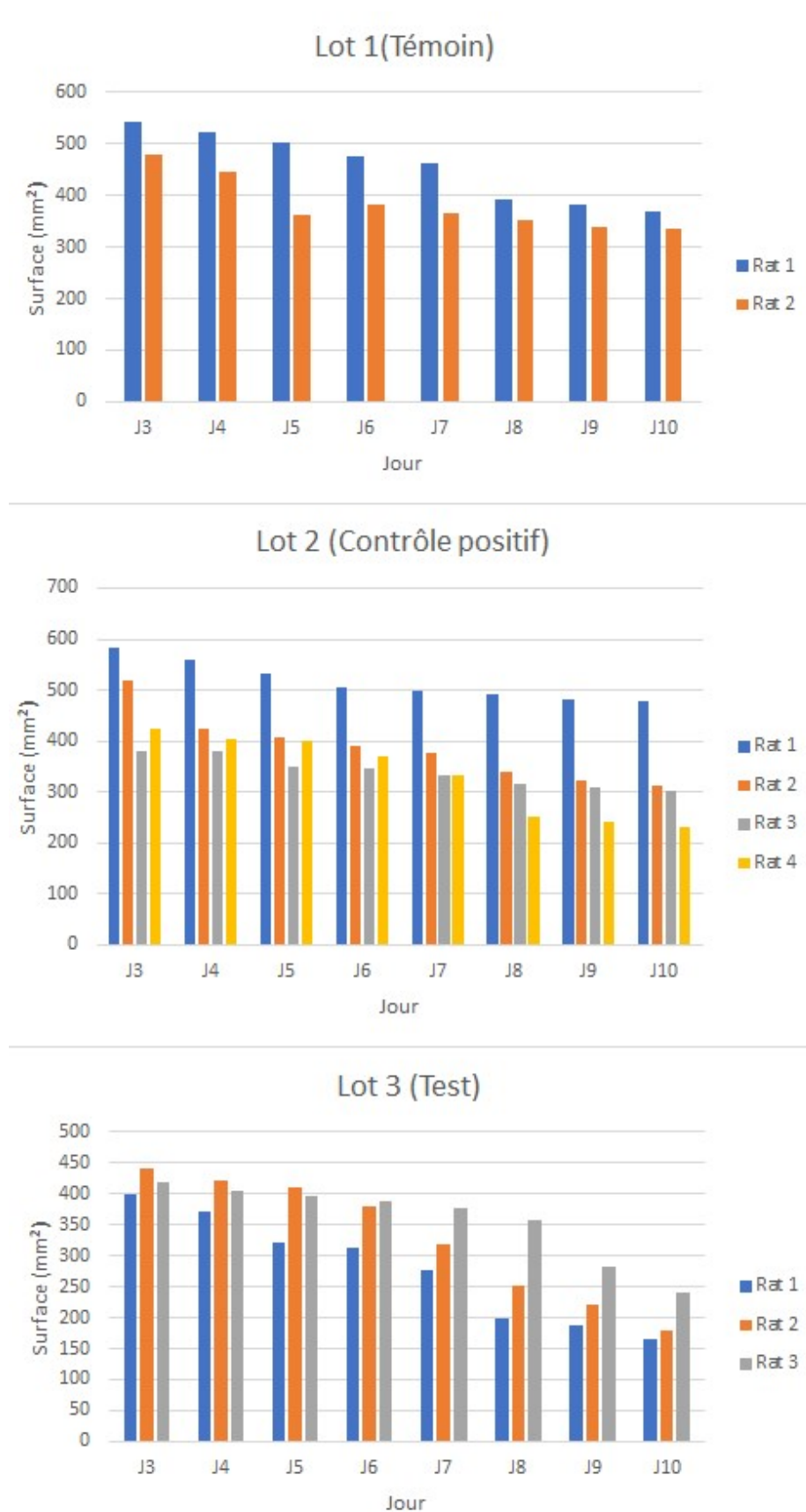
Le test d'irritation réalisé sur 10 volontaires a démontré qu'aucune rougeur ou irritation n'étaient présentes 24 heures après l'application de la crème sur la peau (**Figure III.27**). Ces résultats indiquent que la crème ne présente aucune irritation sur la peau.



**Figure III. 27.** Avant et Après application de la crème.

#### III.9.6.2. Test des brûlures et de cicatrisation chez les animaux

Après l'introduction de brûlures, les rats ont été partagés en 3 lots. Pendant le suivi, il a été remarqué qu'un rat était blessé, possiblement à cause des autres rats dans la même cage. Après avoir nettoyé la blessure avec du sérum physiologique suivi de la Bétadine pour désinfecter sa brûlure profonde (3<sup>ème</sup> degré) et laisser sécher, le rat a été isolé dans une cage individuelle pour éviter toute autre accident. Les surfaces des brûlures ont été notées à partir de troisième jours, sauf pour le rat souffrant de la brûlure au 3<sup>ème</sup> degré. Les histogrammes représentant ces surfaces ont été tracées (**Figures III.28**). En plus, la **Figure III. 29.** représente l'évolution des plaies et des brûlures des rats pendant une période de 10 jours.



**Figure III. 28.** Evolution de la surface des brûlures appliquées sur différents lots de rats.

On constate que l'effet cicatrisant est pareil après 10 jours pour les deux crèmes. Ainsi la surface de brûlure est diminuée pour lot de la crème plus vite que lot de Biafine et de témoin. Nous notons pour tous les lots testés, la réduction de la surface et la profondeur des plaies à des intervalles de temps différents. La diminution de la surface était plus prononcée dans le lot 3 recevant la crème formulée avec absence d'œdème (**Figure III.1**). Cela est constaté aussi pour le rat isolé à cause de sa brûlure profonde. Son état général a été amélioré après le troisième jour d'application de la crème avec reprise des mouvements normaux. Après le 10<sup>ème</sup> jour d'application, nous constatons une cicatrisation totale des plaies pour les rats de lot 2 et 3 et une cicatrisation partielle pour les rats témoins négatifs (lot 1).



**Figure III.29.** Résultats de l'étude *In vivo* de l'évolution des brûlures (A) et des plaies (B).

# CONCLUSION GENERALE

### CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail est de développer une crème à base des huiles essentielle et des extraits végétales pour application parapharmaceutique. Nous nous sommes intéressés à étudier deux plantes médicinales: la cardoncelle bleue (*Carthamus caeruleus L.*) et le cyprès (*Cupressus semprevirens L.*). Ce travail consiste préalablement à faire une optimisation par le plan d'expériences Box Behnken dans le but d'étudier l'effet de la quantité de solvant, du temps et de la quantité de matière sur le rendement de la macération des deux plantes ; parallèlement, à une autre méthode conventionnelle d'extraction qui s'agit de l'hydrodistillation afin d'obtenir les huiles essentielles des deux plantes. Une analyse par GC-MS a été faite afin de déterminer la composition des HEs.

Ensuite, la cytotoxicité des extraits et des HEs a été testée sur la base d'un modèle d'arthropode, les larves de vers de farine (Ténébrion meunier). En plus d'autres études ont été réalisées à savoir l'activité antioxydant (DPPH, ABTS, FRAP et phénanthroline), antibactérienne et antifongique afin de caractériser les extraits et les HEs obtenus.

Enfin, des crèmes ont été préparées, optimisées en termes d'activité antibactérienne et antifongique, caractérisées par étude des paramètres physico-chimiques et analysées *In vivo* pour évaluer leur activité anti brûlure et cicatrisante.

Les résultats de l'optimisation par Box Behnken révèlent que le modèle trouvé pour chaque plante est valide ainsi que les rendements d'extraction de la cardoncelle sont de 12.4 % et 11.6% ceux du cyprès sont 0.03 % et 0.635% en utilisant la macération et l'hydrodistillation, respectivement. L'analyse de l'HE du sapin par GC-MS illustre la présence d'epi-Bicyclosesquiphellandrene comme constituant majoritaire (20.16%).

L'étude de l'activité antimicrobienne illustre la présence de zones d'inhibition contre toutes les bactéries et les champignons testés. En plus, les tests de l'activité antioxydants par la méthode au DPPH et la méthode à l'ATBS montrent que les extraits présentent une activité plus prononcée que les HEs pour les deux plantes, tandis que les tests par la méthode à la phénantroline et la méthode de FRAP ont trouvés que les HEs possèdent aussi une activité satisfaisante surtout pour le cas de l'huile de cardoncelle.

La crème hydrophile à 2 % montre le meilleur diamètre d'inhibition de croissance microbienne. Les tests de contrôle de qualité sur cette crème sont conformes à savoir le pH, la viscosité, le type d'émulsion, la stabilité et l'irritation cutanée.

Enfin, l'étude *In vivo* de l'effet anti-brûlure et cicatrisant montre que la crème préparée procure un

## CONCLUSION GENERALE

effet réparateur de la peau plus prononcé que celui de la crème commercialisée Biafine.

Le présent travail nous a permis de développer une crème à base de substance naturelles ayant un potentiel prometteur dans le secteur parapharmaceutique vue ses effets antimicrobiens, antioxydants, anti-brûlure et cicatrisants équivalent ou plus importants par rapports aux standards.

Comme perspectives, une analyse chromatographique des extraits est recommandée afin de déterminer la composition. Ainsi, nous espérons faire l'étude de stabilité à long terme et les essais pharmacologique et toxicologiques afin d'étudier le profil pharmacocinétique, pharmacodynamique et toxicologique de notre crème.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. M. Soudreet *al.*, « Profil de l'ionogramme sanguin chez les enfants brûlés du Centre Hospitalier Universitaire Pédiatrique Charles de Gaulle de Ouagadougou (Burkina Faso) », *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, vol. 15, n° 2, p. 426-436, 2021.
- [2] R. Moatti, « La phytothérapie », *Revue des Deux Mondes*, p. 80-89, 1990.
- [3] M. El Khasmi et M. Farh, « Impact des plantes médicinales sur le rein », *Revue Marocaine de Néphrologie*, vol. 2, n° 5, p. 32-40, 2022.
- [4] F. MERAD et T. MAHIOUT Tassadit, « Contribution à l'étude de conformité des drogues pour tisanes vendues en officines », 2019, Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ummto.dz/dspace/bitstream/handle/ummto/10495/M%C3%A9moire%202019.pdf?sequence=1>
- [5] L. Moussaoui et L. Chabane, « Effet antimutotique et cytotoxique des flavonoïdes des feuilles de *Peganumharmala* L. », PhD Thesis, Université Mouloud Mammeri, 2019. Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://dspace.ummto.dz/items/1fc38698-bb36-4e10-8d13-4280053e73b2>
- [6] W. GACEM, « Analyse des paramètres morphologiques et des caractéristiques biochimiques du cartham bleu « *carthamuscaeruleus* L. » Issu de la région de la Mitidja », 2020.
- [7] F. Dalia et M. Benkhemissa, « L'aromathérapie: exploration du potentiel antiinfectieux des huiles essentielles », *Bulletin de santé Hospitalo-Universitaire*, p. 07, 2020.
- [8] F. Z. SADOU, N. HEMOUDI, N. RABHI, et F. KECILI, « Formulation d'une crème anti-brûlure à base de plante *Carthamuscaeruleus* L. », 2020, Consulté le: 7 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://dspace.ummto.dz/items/0d8ce3ec-4c4c-4ca3-9b2e-5bb8f5c7ed50>
- [9] A. Djidda et L. Nait Chalal, « Extraction de biomolécules actives à partir d'une plante médicinale: *Carthamuscaeruleus* L », PhD Thesis, Université Mouloud Mammeri, 2020. Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://dspace.ummto.dz/items/dd990ed4-7f0a-4650-ba15-2c5c8713e2ab>
- [10] « *Carthamuscaeruleus* », juin 2024, [En ligne]. Disponible sur: « *Carthamuscaeruleus* » <https://www.google.com/imgres?imgurl=https://api.tela-botanica.org/img:000056084O.jpg&tbnid=LyeJykjpy40kiM&vet=1&imgrefurl=https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-14664->
- [11] K. Saffidine, « Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *carthamuscaeruleus* L. et de *plantago major* L. », PhD Thesis, 2018. Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/1680>
- [12] L. Ben Amara et M. Kabene, « Etude de l'activité anti-inflammatoire et anti bactérienne de l'extrait aqueux de la racine de *Carthamuscaeruleus* L. », PhD Thesis, Université Mouloud Mammeri, 2021. Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://fsbsa.ummto.dz/items/3d5a164d-38e1-4466-a699-ecaa21d55d45>

- [13] D. E. POPULAIRE, « REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE », 2020, Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.ency-education.com/uploads/3/0/9/3/309326/circulaire\\_2021\\_2022\\_fr.pdf](https://www.ency-education.com/uploads/3/0/9/3/309326/circulaire_2021_2022_fr.pdf)
- [14] C. DEKICHE et M. BENZAID, « Activités biologiques des huiles essentielles de *Cupressus sempervirens* L », 2023, Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <http://dspace.univ-tissem.silt.dz/bitstream/handle/123456789/2791/MM572-068.pdf>
- [15] « Le sapin de Numidie, relique de la sapinière méditerranéenne », juin 2024, [En ligne]. Disponible sur: <https://images.app.goo.gl/1u8KesaWgiftcPn7A>
- [16] « TH.M.SNV.2023.104.pdf ».
- [17] A. MADENE et A. SAFI, « Évaluation des activités biologiques des extraits et des huiles essentielles des aiguilles du cyprès vert », PhD Thesis, Université Ibn Khaldoun, 2023. Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <http://dspace.univ-tiaret.dz/handle/123456789/13810>
- [18] « BELGHARBI\_HADIL\_Génie des procédés..\_Génie des procédés des matériaux.pdf ».
- [19] N. Herzi, « Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO<sub>2</sub>-supercritique et des techniques conventionnelles », 2013.
- [20] M. Sebai et M. Boudali, « La phytothérapie entre la confiance et mefiance », *InstForm paramédical CHETTIA Mem Prof*, p. 7-8, 2012.
- [21] D. Ayouné, « Préparation d'une pommade à base de racines de *Carthamus caeruleus* L et évaluation de quelques activités biologiques de ses extraits », 2022.
- [22] N. KABOUR, I. KAMLA, et M. KAOUACHE, « Evaluation des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de l'*Atriplex halimus* », 2021.
- [23] *distillation*. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.aromabio.fr/media/label/distillation\\_procedure.jpg](https://www.aromabio.fr/media/label/distillation_procedure.jpg)
- [24] F. Bouaoune, R. Bouguetof, et I. Rahmani, « Etude de rendement et caractères organoleptiques de l'huile essentielle d'une plante à activité anti microbienne importante *Rosmarinus officinalis* », 2020.
- [25] *Extraction par hydro-distillation*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.researchgate.net/publication/343615181/figure/fig3/AS:923805757239298@1597263864918/Montage-d'extraction-par-Hydrodistillation.png>
- [26] A. KEMASSI et M. MERIGA, « Comparaison des méthodes d'extraction des principes actifs de quelques plantes médicinales ».
- [27] *macération*. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.maxicours.com/se/media/img/1/8/2/2/182241.gif>
- [28] F. Z. SADOU, N. HEMOUDI, N. RABHI, et F. KECILI, « Formulation d'une crème anti-brûlure à

base de plante *Carthamus caeruleus* L. », 2020.

[29] A.-F. Thomyris, « Dermatologie et cosmétologie des peaux noires et métissées: conseils en officine et analyses d'enquêtes », 2018.

[30] *structure de la peau*. [En ligne]. Disponible sur:

<https://www.researchgate.net/publication/340253388/figure/fig1/AS:874067225763841@1585405274421/Structure-generale-de-la-peau-humaine-saine-La-peau-est-composee-de-trois-couches.png>

[31] A. L. Faivre, « Administration de substances actives dans la peau: rôle de la composition hydrophile de nanoparticules polymériques », 2019.

[32] L. BOURENDJA, S. MISSOUM, et M. B. RABEH, « Caractérisation de quelque plante médicinale en vue de leur valorisation en cosmétologie », 2020.

[33] L. CAULLET, A. Dos Santos, G. Knipper, M. Rusalen, et M. Seigneur, « Les émulsions alimentaires et cosmétiques », *Projet Professionnel*, vol. 2018, p. 1-50, 2017.

[34] N. Pierat, « Préparations d'émulsions par inversion de phase induite par agitation », 2010.

[35] *Les différents types d'émulsions*. [En ligne]. Disponible sur:

<https://www.researchgate.net/publication/356373571/figure/fig1/AS:1094497945554946@1637960053621/Different-types-of-emulsions-found-in-crude-oil-production-and-transport.ppm>

[36] R. ISSAM, « M, «Formulation d'une émulsion a base d'huile d'argan en utilisant un plan de mélange» », *Université Mohammed v-RABAT*, 2016.

[37] *Schéma d'un tensioactif*[30]. [En ligne]. Disponible sur:

<https://www.researchgate.net/publication/291985788/figure/fig3/AS:613907416764417@1523378342136/a-Structure-generale-dun-tensioactif-molecule-amphiphile-composee-dune-tete.png>

[38] TOÉ SiessinaLawaldlia Natacha Tchaida Martine, « ESSAIS DE MISES AU POINT DE FORMULATION DE CREMES ET LAITS CORPORELS A BASE DU BEURRE DE KARITE DU BURKINA FASO », OUAGADOUGOU, 2004. [En ligne]. Disponible sur:  
<https://beep.ird.fr/collect/uouaga/index/assoc/M09686.dir/M09686.pdf>

[39] « SAAIDANI\_AHLEM\_F1.pdf ».

[40] *étapes de cicatrisation de peau*. [En ligne]. Disponible sur:

<https://legacyfileshare.elsevier.com/assets/image/0011/849422/phase-de-cicatrisationG.jpg>

[41] N. Berkane, « Développement et caractérisation de nouveaux adsorbants pour l'élimination des polluants organiques en solution aqueuse », 2019.

[42] S. AMRANI, A. FOUGER, et H. AGUEDAL, « Optimisation du processus d'adsorption à l'aide d'un plan d'expérience », 2023.

[43] S. Vivier, « Stratégies d'optimisation par la méthode des Plans d'Expériences, et Application aux

dispositifs électrotechniques modélisés par Eléments Finis », 2002.

- [44] J. Goupy et L. Creighton, *Introduction aux plans d'expériences-3ème édition-Livre+ CD-Rom*. Hachette, 2006.
- [45] F. BENDAHMA, H. BENMEKKI, et B. ABSAR, « MEMOIRE DE FIN D'ETUDES DE MASTER ACADEMIQUE ».
- [46] N. Aslan et Y. Cebeci, « Application of Box–Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals », *Fuel*, vol. 86, n° 1-2, p. 90-97, 2007.
- [47] *Plan Box-Behnken à 3 facteurs*. [En ligne]. Disponible sur: <https://develve.net/files/Box-Behnken%20designs%20Number.png>
- [48] L. Lebssisseet sendesAichaoui, « Modélisation d'expérience et étude du phénomène d'adsorption des métaux lourds par l'utilisation d'un adsorbant à base de la biomasse ».
- [49] A. MIRA-Bejaia, « Mémoire de Master », Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.academia.edu/download/99658459/Activit\\_C3\\_A9s\\_20antioxydant\\_20et\\_20antibact\\_C3\\_A9rie\\_nne\\_20des\\_20polyphenols\\_20des\\_20feuilles\\_20de\\_20Citrus\\_20reticulata\\_20blanco\\_20mand.pdf](https://www.academia.edu/download/99658459/Activit_C3_A9s_20antioxydant_20et_20antibact_C3_A9rie_nne_20des_20polyphenols_20des_20feuilles_20de_20Citrus_20reticulata_20blanco_20mand.pdf)
- [50] O. Khatabi, H. Hanine, D. Elothmani, et A. Hasib, « Extraction and determination of polyphenols and betalain pigments in the Moroccan Pricklypear fruits (*Opuntia ficus indica*) », *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 9, p. S278-S281, 2016.
- [51] L. Müller, S. Gnoyke, A. M. Popken, et V. Böhm, « Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations », *LWT-Food Science and Technology*, vol. 43, n° 6, p. 992-999, 2010.
- [52] A. Djeridane, M. Yousfi, B. Nadjemi, D. Boutassouna, P. Stocker, et N. Vidal, « Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds », *Food chemistry*, vol. 97, n° 4, p. 654-660, 2006.
- [53] K. Boudiaf, « Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de *Nigella sativa* », *Mémoire de magister en biologie, Université de Ferhat Abbas Sétif*, 2006.
- [54] M. P. Fernández-Ronco, I. Gracia, A. De Lucas, et J. F. Rodríguez, « Extraction of *Capsicum annuum* Oleoresin by Maceration and Ultrasound-Assisted Extraction: Influence of Parameters and Process Modeling », *J Food Process Engineering*, vol. 36, n° 3, p. 343-352, juin 2013, doi: 10.1111/j.1745-4530.2012.00702.x.
- [55] K. P. F. O. Koné, Y. Soro, et S. Siaka, « Détermination des paramètres influençant le rendement d'extraction hydro-alcoolique des métabolites secondaires de *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae) et *Tridax procumbens* Linn (Asteraceae) », *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, vol. 44, p. 15-22, 2017.
- [56] N. Lebovka, E. Vorobiev, et F. Chemat, *Enhancing extraction processes in the food industry*.

CrcPress Boca Raton, 2012. Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur:

<https://api.taylorfrancis.com/content/books/mono/download?identifieurName=doi&identifieurValue=10.1201/b11241&type=googlepdf>

[57] A. Lamouri, « Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of *Hypericum timentosum* L. leaves extracts », PhD Thesis, 2024. Consulté le: 6 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/4265>

[58] N. Amara et Y. Boughérara, « Activité Antimicrobienne de l'Huile Essentielle du Cypres Vert (*Cupressus sempervirens* L.) », *Algerian Journal of Natural Products*, vol. 5, n° 2, p. 455-462, 2017.

[59] « AFNOR. « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris, 2000, 661-663. 2. ANO ».

[60] N. HAMMADI et A. DJEBAILI, « Activité antioxydante et anti-inflammatoire et toxicité et cytotoxicité d'une espèce du genre *Asphodelus* », 2022 2021.

[61] A. A. O. DOUSSEN, « EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE », Consulté le: 8 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur:

[https://www.researchgate.net/profile/Benmeddour-](https://www.researchgate.net/profile/Benmeddour-Tarek/publication/273885644_EVALUATION_DE_L'ACTIVITE_ANTIBACTERIENNE_ET_ANTIFONGIQUE_DES_EXTRAITS_DE_TROIS_ESPECES_DU_GENRE_Allium_A_cepa_fistulosum_ET_sativum_CULTIVEES_DANS_LE_PERIMETRE_AGRICOLE_DE_DOUSSEN_WILAYA_DE_BISKRA/links/550f20e0cf21287416b02a5/EVALUATION-DE-L'ACTIVITE-ANTIBACTERIENNE-ET-ANTIFONGIQUE-DES-EXTRAITS-DE-TROIS-ESPECES-DU-GENRE-Allium-A-cepa-fistulosum-ET-sativum-CULTIVEES-DANS-LE-PERIMETRE-AGRICOLE-DE-DOUSSEN-WILAYA-DE-BISKRA.pdf)

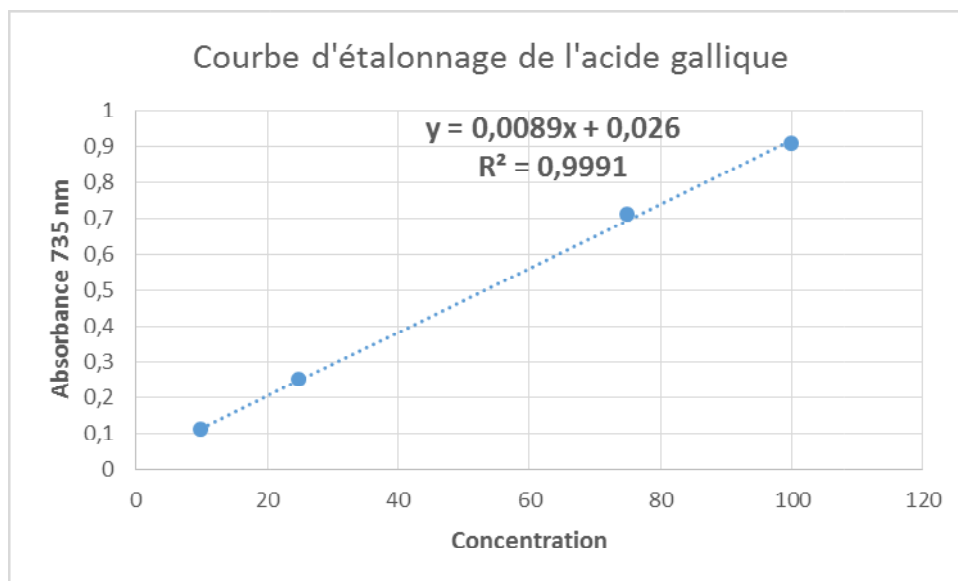
[Tarek/publication/273885644\\_EVALUATION\\_DE\\_L'ACTIVITE\\_ANTIBACTERIENNE\\_ET\\_ANTIFONGIQUE\\_DES\\_EXTRAITS\\_DE\\_TROIS\\_ESPECES\\_DU\\_GENRE\\_Allium\\_A\\_cepa\\_fistulosum\\_ET\\_sativum\\_CULTIVEES\\_DANS\\_LE\\_PERIMETRE\\_AGRICOLE\\_DE\\_DOUSSEN\\_WILAYA\\_DE\\_BISKRA/links/550f20e0cf21287416b02a5/EVALUATION-DE-L'ACTIVITE-ANTIBACTERIENNE-ET-ANTIFONGIQUE-DES-EXTRAITS-DE-TROIS-ESPECES-DU-GENRE-Allium-A-cepa-fistulosum-ET-sativum-CULTIVEES-DANS-LE-PERIMETRE-AGRICOLE-DE-DOUSSEN-WILAYA-DE-BISKRA.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Benmeddour-Tarek/publication/273885644_EVALUATION_DE_L'ACTIVITE_ANTIBACTERIENNE_ET_ANTIFONGIQUE_DES_EXTRAITS_DE_TROIS_ESPECES_DU_GENRE_Allium_A_cepa_fistulosum_ET_sativum_CULTIVEES_DANS_LE_PERIMETRE_AGRICOLE_DE_DOUSSEN_WILAYA_DE_BISKRA/links/550f20e0cf21287416b02a5/EVALUATION-DE-L'ACTIVITE-ANTIBACTERIENNE-ET-ANTIFONGIQUE-DES-EXTRAITS-DE-TROIS-ESPECES-DU-GENRE-Allium-A-cepa-fistulosum-ET-sativum-CULTIVEES-DANS-LE-PERIMETRE-AGRICOLE-DE-DOUSSEN-WILAYA-DE-BISKRA.pdf)

[62] D. Desplan, « Caractérisation rhéologique multi-échelle des émulsions cosmétiques pour leur stabilité et leur conservation », PhD Thesis, Université de Cergy Pontoise, 2018. Consulté le: 1 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-02284431/>

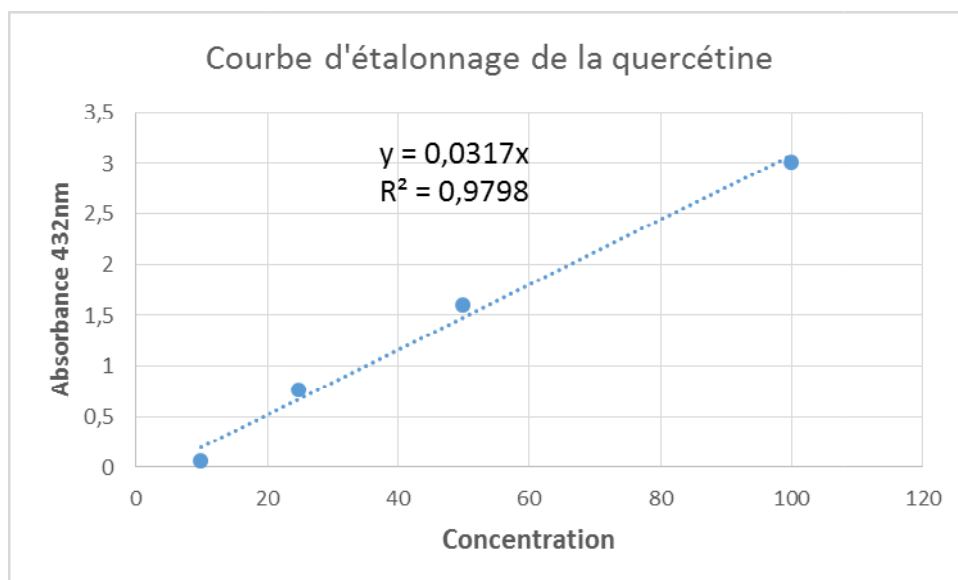
[63] L. CAULLET, A. Dos Santos, G. Knipper, M. Rusalen, et M. Seigneur, « Les émulsions alimentaires et cosmétiques », *Projet Professionnel*, vol. 2018, p. 1-50, 2017.

# ANNEXES

## ANNEXE 1

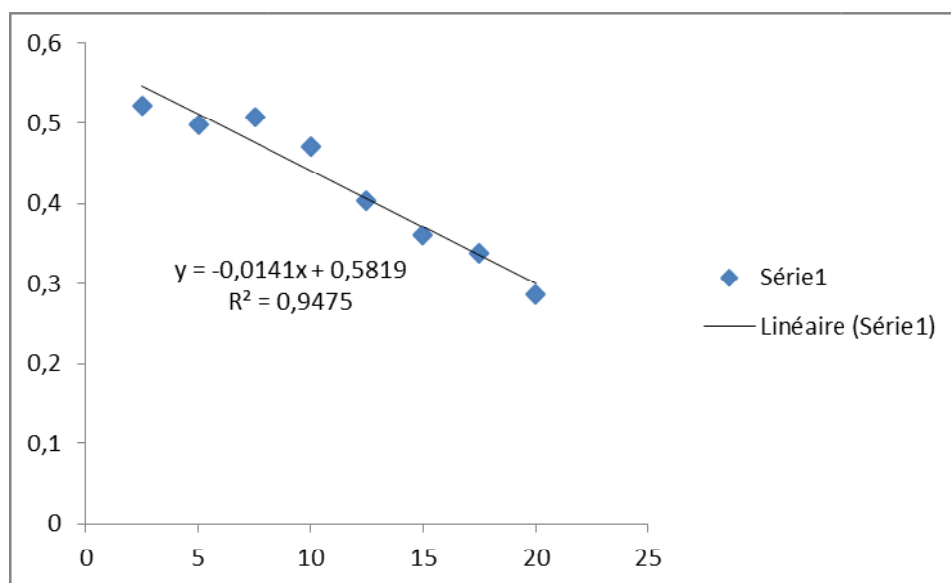


**Courbe d'étalonnage de l'acide gallique**

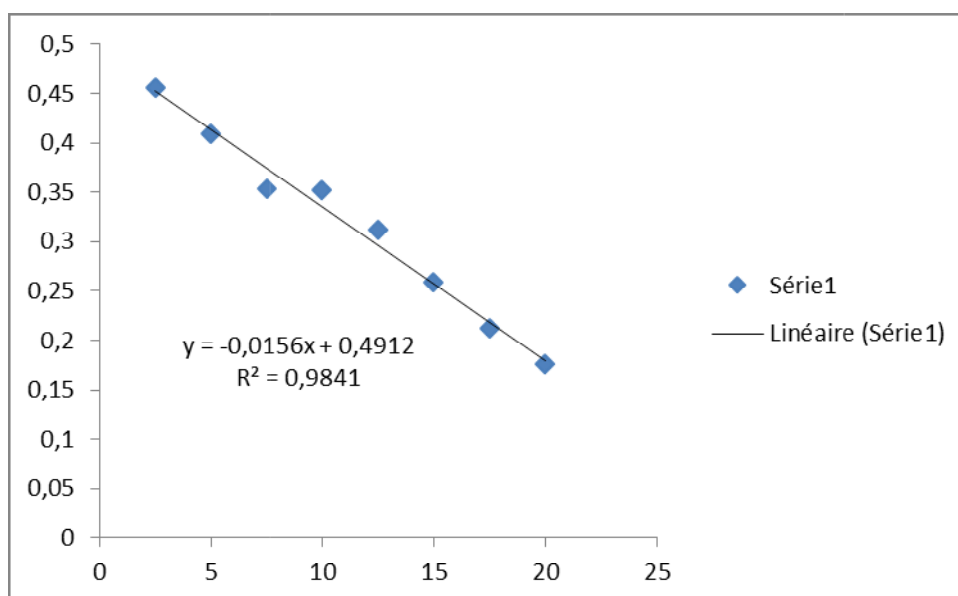


**Courbe d'étalonnage de la quercétine**

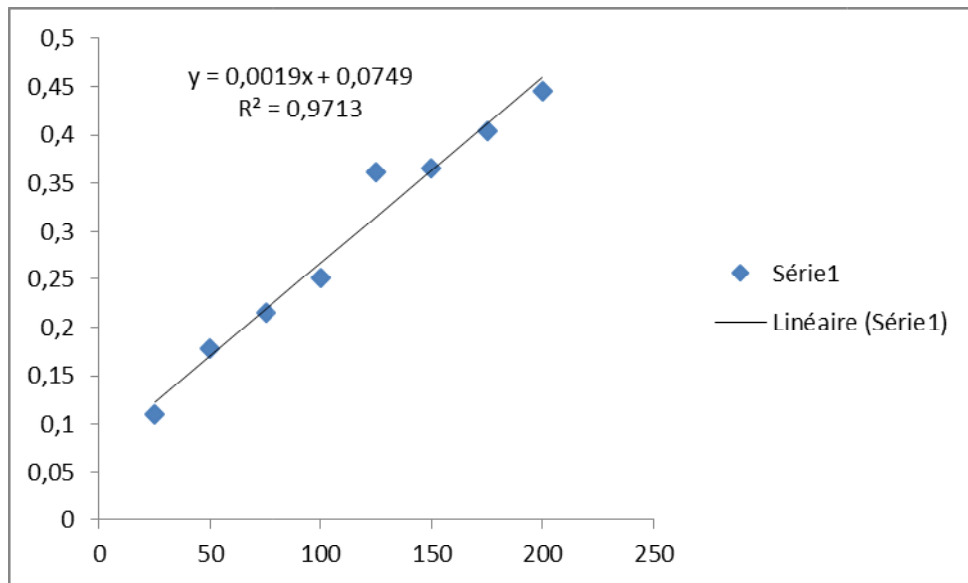
## ANNEXE 2



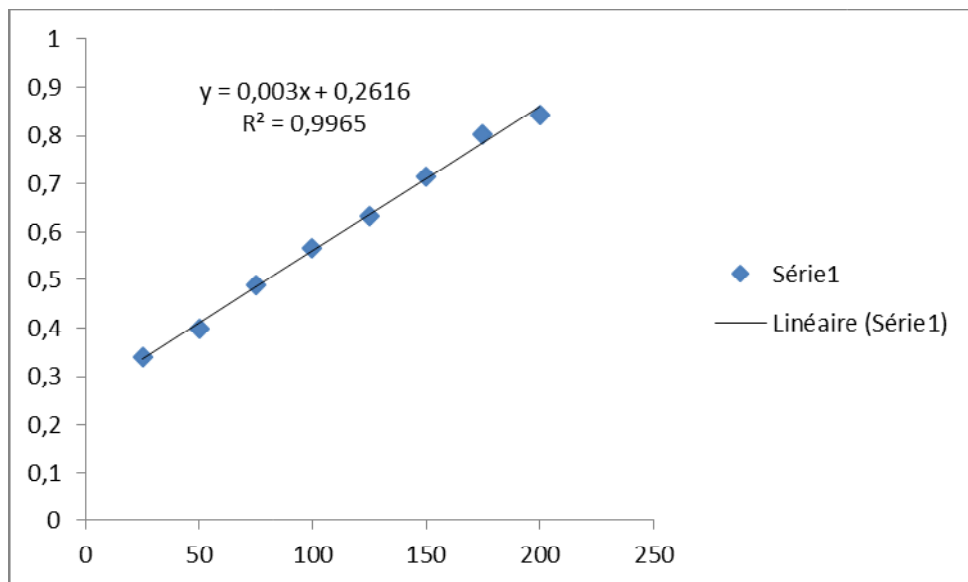
**Courbe d'étalonnage de Trolox par méthode de DPPH**



**Courbe d'étalonnage de Trolox par méthode d'ABTS**

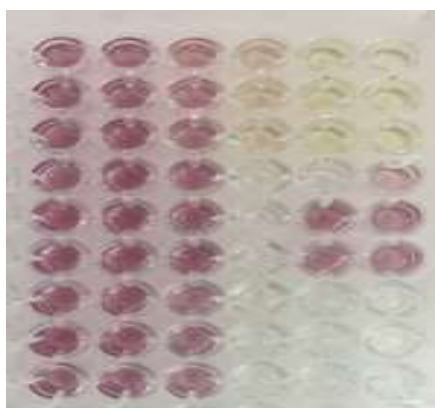


**Courbe d'étalonnage de Trolox par méthode de FRAP**



**Courbe d'étalonnage de Trolox par méthode de phénol**

### ANNEXE 3



**Microplaque du test DPPH**



**Microplaque du test ABTS**



**Microplaque du test Phenanthroline**



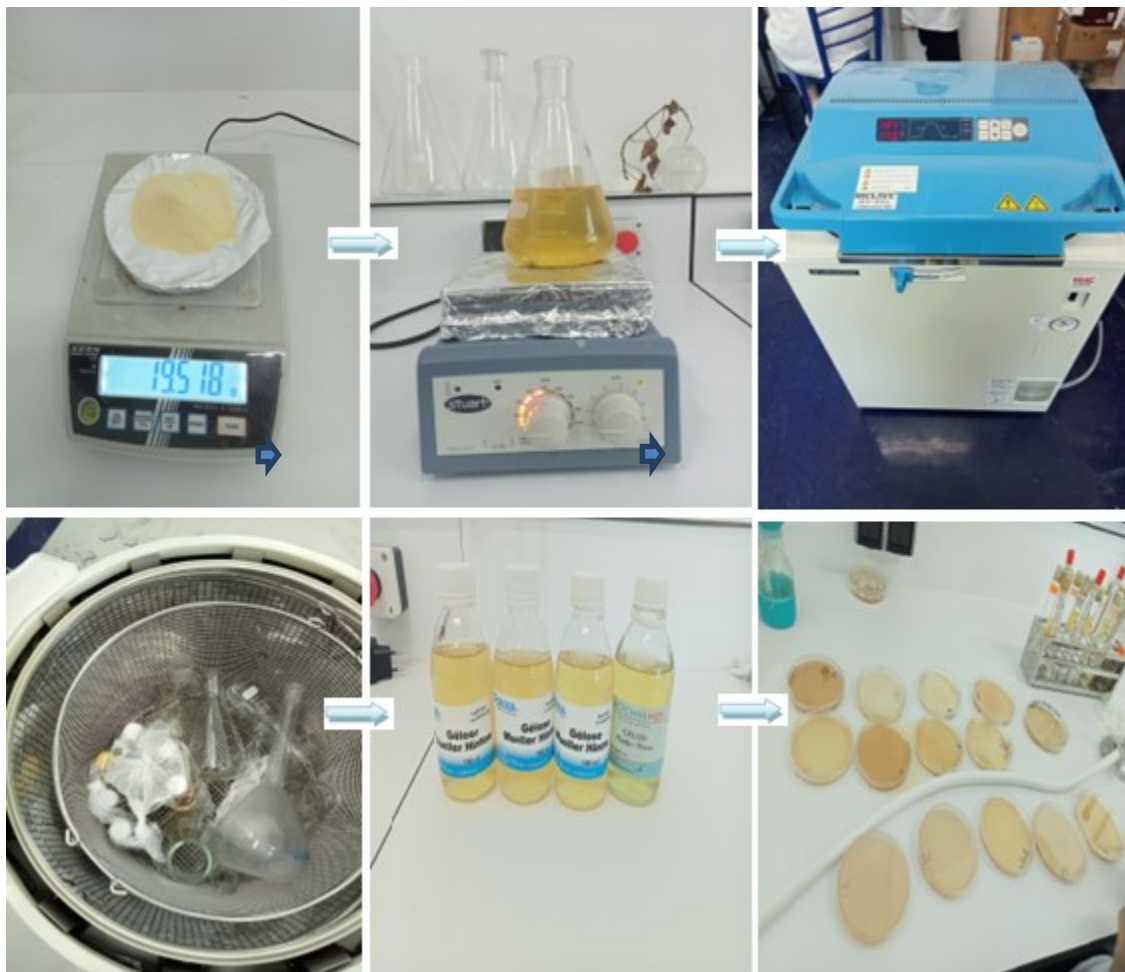
**Microplaque du test FRAP**

## ANNEXE 4

### Protocole de préparation des milieux de cultures

#### 1) Milieu de culture Miller-Hinton

- Diluer 3,5 g de poudre de Miller-Hinton à 150 ml d'eau distillée.
- Agiter et chauffer le mélange jusqu'à ce qu'elle soit complètement dissoute et claire.
- Placer la solution dans un autoclave et stériliser à 121°C pendant 15 minutes.
- Distribuer le milieu dans des flacons et les mettre dans l'Autoclave pour une stérilisation à 121°C pendant 20 min.



#### 2) préparation milieu de culture (PDA)

- Mettre les petits morceaux la pomme de terre dans l'eau distille (360ml) et Chauffer sur une plaque chauffante jusqu'à l'ébullition (100°C).
- Filtrer pour récupérer le jus de pomme de terre En goute la quantité de glucose (9g) et d'Agar (9g) avec Agitation jusqu'a homogénéisation du milieu.

- Verser le mélange dans une éprouvette graduée. puis ajuster le volume jusqu'a 450ml par l'eau distille.
- Placer le volume (milieu) sur un agitateur chauffant Jusqu'à le début d'ébullition.
- Distribuer le milieu dans des flacons et les mettre dans l'Autoclave pour une stérilisation à 121°C pendant 20 min.



**ANNEXE 5**  
**TABLE DE STUDENT BILATERAL**

|     | Risque 5 % | Confiance 95 % |
|-----|------------|----------------|
| DDL | t(crit)    | t(crit)        |
| 1   | 12,70      | 63,66          |
| 2   | 4,30       | 9,93           |
| 3   | 3,18       | 5,84           |
| 4   | 2,78       | 4,60           |
| 5   | 2,57       | 4,03           |
| 6   | 2,45       | 3,71           |
| 7   | 2,37       | 3,50           |
| 8   | 2,31       | 3,36           |
| 9   | 2,26       | 3,25           |
| 10  | 2,23       | 3,17           |
| 11  | 2,20       | 3,11           |
| 12  | 2,18       | 3,06           |
| 13  | 2,16       | 3,01           |
| 14  | 2,15       | 2,98           |
| 15  | 2,13       | 2,95           |
| 16  | 2,12       | 2,92           |
| 17  | 2,11       | 2,90           |
| 18  | 2,10       | 2,98           |
| 19  | 2,09       | 2,86           |
| 20  | 2,08       | 2,85           |

**ANNEXE 6**  
**TABLE DE FISCHER - SNEDECOR**

| $\begin{matrix} I_A \\ I_B \end{matrix}$ | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     |
|------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1                                        | 161,4 | 199,5 | 215,7 | 224,6 | 230,2 | 234,0 | 236,8 | 238,9 | 240,5 |
| 2                                        | 18,51 | 19,00 | 19,16 | 19,25 | 19,30 | 19,33 | 19,35 | 19,37 | 19,38 |
| 3                                        | 10,13 | 9,55  | 9,28  | 9,12  | 9,01  | 8,94  | 8,89  | 8,85  | 8,81  |
| 4                                        | 7,71  | 6,94  | 6,59  | 6,39  | 6,26  | 6,16  | 6,09  | 6,04  | 6,00  |
| 5                                        | 6,61  | 5,79  | 5,41  | 5,19  | 5,05  | 4,95  | 4,88  | 4,82  | 4,77  |
| 6                                        | 5,99  | 5,14  | 4,76  | 4,53  | 4,39  | 4,28  | 4,21  | 4,15  | 4,10  |
| 7                                        | 5,59  | 4,74  | 4,35  | 4,12  | 3,97  | 3,87  | 3,79  | 3,73  | 3,68  |
| 8                                        | 5,32  | 4,46  | 4,07  | 3,84  | 3,69  | 3,58  | 3,50  | 3,44  | 3,39  |
| 9                                        | 5,12  | 4,26  | 3,86  | 3,63  | 3,48  | 3,37  | 3,29  | 3,23  | 3,18  |
| 10                                       | 4,96  | 4,10  | 3,71  | 3,48  | 3,33  | 3,22  | 3,14  | 3,07  | 3,02  |
| 11                                       | 4,84  | 3,98  | 3,59  | 3,36  | 3,20  | 3,09  | 3,01  | 2,95  | 2,90  |
| 12                                       | 4,75  | 3,89  | 3,49  | 3,26  | 3,11  | 3,00  | 2,91  | 2,85  | 2,80  |
| 13                                       | 4,67  | 3,81  | 3,41  | 3,18  | 3,03  | 2,92  | 2,83  | 2,77  | 2,71  |
| 14                                       | 4,60  | 3,74  | 3,34  | 3,11  | 2,96  | 2,85  | 2,76  | 2,70  | 2,65  |
| 15                                       | 4,54  | 3,68  | 3,29  | 3,06  | 2,90  | 2,79  | 2,71  | 2,64  | 2,59  |
| 16                                       | 4,49  | 3,63  | 3,24  | 3,01  | 2,85  | 2,74  | 2,66  | 2,59  | 2,54  |
| 17                                       | 4,45  | 3,59  | 3,20  | 2,96  | 2,81  | 2,70  | 2,61  | 2,55  | 2,49  |
| 18                                       | 4,41  | 3,55  | 3,16  | 2,93  | 2,77  | 2,66  | 2,58  | 2,51  | 2,46  |
| 19                                       | 4,38  | 3,52  | 3,13  | 2,90  | 2,74  | 2,63  | 2,54  | 2,48  | 2,42  |
| 20                                       | 4,35  | 3,49  | 3,10  | 2,87  | 2,71  | 2,60  | 2,51  | 2,45  | 2,39  |
| 21                                       | 4,32  | 3,47  | 3,07  | 2,84  | 2,68  | 2,57  | 2,49  | 2,42  | 2,37  |
| 22                                       | 4,30  | 3,44  | 3,05  | 2,82  | 2,66  | 2,55  | 2,46  | 2,40  | 2,34  |
| 23                                       | 4,28  | 3,42  | 3,03  | 2,80  | 2,64  | 2,53  | 2,44  | 2,37  | 2,32  |
| 24                                       | 4,26  | 3,40  | 3,01  | 2,78  | 2,62  | 2,51  | 2,42  | 2,36  | 2,30  |
| 25                                       | 4,24  | 3,39  | 2,99  | 2,76  | 2,60  | 2,49  | 2,40  | 2,34  | 2,28  |
| 26                                       | 4,23  | 3,37  | 2,98  | 2,74  | 2,59  | 2,47  | 2,39  | 2,32  | 2,27  |
| 27                                       | 4,21  | 3,35  | 2,96  | 2,73  | 2,57  | 2,46  | 2,37  | 2,31  | 2,25  |
| 28                                       | 4,20  | 3,34  | 2,95  | 2,71  | 2,56  | 2,45  | 2,36  | 2,29  | 2,24  |
| 29                                       | 4,18  | 3,33  | 2,93  | 2,70  | 2,55  | 2,43  | 2,35  | 2,28  | 2,22  |
| 30                                       | 4,17  | 3,32  | 2,92  | 2,69  | 2,53  | 2,42  | 2,33  | 2,27  | 2,21  |
| 40                                       | 4,08  | 3,23  | 2,84  | 2,61  | 2,45  | 2,34  | 2,25  | 2,18  | 2,12  |
| 60                                       | 4,00  | 3,15  | 2,76  | 2,53  | 2,37  | 2,25  | 2,17  | 2,10  | 2,04  |
| 120                                      | 3,92  | 3,07  | 2,68  | 2,45  | 2,29  | 2,17  | 2,09  | 2,02  | 1,96  |
| $\infty$                                 | 3,84  | 3,00  | 2,60  | 2,37  | 2,21  | 2,10  | 2,01  | 1,94  | 1,88  |

## Résumé

L'objectif de ce travail est la formulation d'une crème à base d'extraits obtenus par deux méthodes (macération et hydrodistillation) pour utilisation parapharmaceutique. Deux plantes ont été étudiées à savoir : la cardoncelle bleue (*Carthamus caeruleus L.*) et le cyprès (*Cupressus semprevirens L.*). Le travail est réparti en quatre parties. La première a porté sur l'optimisation de la macération par plan Box Behnken et l'extraction par macération et hydrodistillation. La deuxième sur l'étude de la cytotoxicité et l'activité antimicrobienne, antifongique, et antioxydante des différents extraits et les huiles essentielles (HEs). Enfin, la troisième et la quatrième parties ont porté sur le développement des crèmes, leur caractérisation ainsi que l'étude de l'activité anti-brûlure et cicatrisante *In vivo*. Les résultats montrent que la crème préparée exerce un potentiel antioxydant, antimicrobien, anti-brûlure et cicatrisant très élevés par rapports aux standards.

**Mots clés :** Cardoncelle bleu, Cyprès, Antioxydant, Antimicrobien, Anti-brûlure, Cicatrisant, Crème.

## المخلص

الهدف من هذا العمل هو تكوين كريم يعتمد على المستخلصات التي تم الحصول عليها بطريقتين (النقع والتقطير المائي) للاستخدام شبه الصيدلاني. تمت دراسة نباتين هما: القرطم الأزرق (*Carthamus caeruleus L.*) و السرو (*Cupressus semprevirens L.*). وينقسم العمل إلى أربعة أجزاء. ركز الأول على تحسين النقع عن طريق خطة Box Behnken والاستخلاص عن طريق النقع والتقطير المائي. والثاني حول دراسة السمية الخلوية والنشاط المضاد للميكروبات والفطريات ومضادات الأكسدة للمستخلصات المختلفة و الزيوت الأساسية (HEs). و أخيراً، ركز الجزء الثالث والرابع على تطور الكريمات وتوصيفها بالإضافة إلى دراسة نشاطها المضاد للحروق وللجروح في الجسم الحي *In vivo* أظهرت النتائج أن الكريم المحضر يحتوي على نسبة عالية جداً من مضادات الأكسدة، ومضادات الميكروبات، ومضادات الحروق والجروح مقارنة بالمعايير.

**الكلمات المفتاحية:** القرطم الأزرق، السرو، مضاد الأكسدة، مضاد للميكروبات، مضاد الحروق، لآيم للجروح، كريم.

## Abstract

The objective of this work is the formulation of a cream based on extracts obtained by two methods (maceration and hydrodistillation) for parapharmaceutical use. Two plants were studied, namely: blue cardoncell (*Carthamus caeruleus L.*) and Cypress (*Cupressus semprevirens L.*). The work is divided into four parts. The first focused on the optimization of maceration by Box Behnken plan and extraction by maceration and hydrodistillation. The second on the study of the cytotoxicity and the antimicrobial, antifungal, and antioxidant activity of the different extracts and essential oils (HEs). Finally, the third and fourth parts focused on the development of creams, their characterization as well as the study of the anti-burn and healing activity *In vivo*. The results show that the prepared cream has very high antioxidant, antimicrobial, anti-burn and healing potential compared to standards.

**Key words:** Blue cardoncella, Cypress, Antioxidant, Antimicrobial, Anti-burn, Healing, Cream.