MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MEDEA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la matière
Filière : Chimie
Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par : Ghernaout Nawel

&

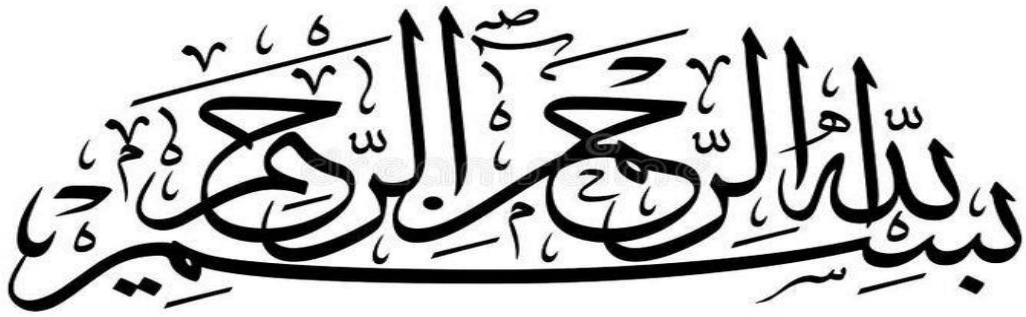
Moussouni Roumaissa

Thème :

Formulation d'un produit thérapeutique à base de la chlorophylle.

Soutenue publiquement le : 01/07/2025. Devant le jury composé de :

Dr. TASSIST A.	**MCA**	**UYF Médéa**	**Présidente**
Dr. BOUCHRIT N.	**MCA**	**UYF Médéa**	**Examinatrice**
Dr. ARBIA W.	**MCA**	**UYF Médéa**	**Encadreur**


بسم الله الرحمن الرحيم

ملخص
يهدف هذا العمل إلى صياغة كريم علاجي يحتوي على الكلوروفيل المستخرج من أوراق السبانخ. تم استخدام ثلاثة مذيبات للاستخلاص: الماء المقطر والإيثانول ومزيج الإيثانول/الأسيتون. من بينها، حقق الإيثانول أفضل عائد (86٪) وأعلى تركيز للكلوروفيل (53.03 ميكروغرام/مل). كشف الفحص الفيتوكيميائي للمستخلص الإيثانولي عن وجود مستقلبات ثانوية نشطة بيولوجيًا مثل التانينات والكينونات والفلافونويدات والتربينويدات. أظهرت القياسات الكمية غنى المستخلص بالبوليفينول 48,06 مغ EAG/غ والفلافونويدات 24,88 مغ EQ/غ أظهر تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلص الإيثانول الكلوروفيل تأثيرات مثبطة معتدلة ضد المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية. أظهر المستخلص قدرة ملحوظة على التقاط الجذور الحرة، مع قيمة IC50 تبلغ 0.423 مجم/مل قريبة من تلك الخاصة بحمض الأسكوربيك (0.501 مجم/مل). أكد اختبار الانحلال الدموي سلامة المستخلص بالنسبة للكريات الحمراء البشرية. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت دراسة استقرار الغشاء في المختبر معدل استقرار بنسبة 99.20٪. هذه النتائج مشابهة لتلك التي تم الحصول عليها بواسطة ديكلوفيناك، مما يدل على التأثير المضاد للالتهابات المحتمل للمستخلص. تم تطوير تركيبة موضعية على شكل كريم يعتمد على مستخلص الكلوروفيل الإيثانولي. وقد أظهرت خصائص حسية جيدة، واستقرارًا ريولوجيًا مرضيًا، ودرجة حموضة مناسبة للاستخدام على الجلد .
الكلمات المفتاحية: الكلوروفيل، كريم التئام الجروح، النشاط المضاد للميكروبات، النشاط المضاد للالتهابات، البوليفينول، الفلافونويد.

Résumé
Ce travail a pour objectif la formulation d'une crème cicatrisante à base de chlorophylle extraite des feuilles d'épinard. Trois solvants ont été utilisés pour l'extraction : l'eau distillée, l'éthanol, et le mélange éthanol/acétone. Parmi eux, l'éthanol a permis d'obtenir le meilleur rendement (86 %) et la concentration la plus élevée en chlorophylle (53,03 µg/mL). Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique a révélé la présence de métabolites secondaires bioactifs tels que les tanins, quinones, flavonoïdes et terpénoïdes. Les dosages quantitatifs ont mis en évidence une richesse en polyphénols (48,06 mg EAG/g) et en flavonoïdes (24,88 mg EQ/g), L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'extrait éthanolique chlorophyllien a révélé des effets inhibiteurs modérés contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*. L'extrait a démontré un pouvoir notable de piégeage des radicaux libres, avec une valeur IC50 de 0,423 mg/ml proche de celle de l'acide ascorbique (0,501mg/ml). Le test d'hémolyse a confirmé l'innocuité de l'extrait vis-à-vis des globules rouges humains. En outre, l'étude de la stabilité membranaire *in vitro* a montré un taux de stabilisation de 99,20 %. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par diclofénac traduisant un potentiel effet anti-inflammatoire de l'extrait. Une formulation topique sous forme de crème à base de l'extrait éthanolique chlorophyllien a été élaborée. Elle a présenté de bonnes caractéristiques organoleptiques, une stabilité rhéologique satisfaisante, un pH adapté à l'usage cutané.
Mots clés : chlorophylle, crème cicatrisante, activité antimicrobienne, activité anti-inflammatoire, polyphénols, flavonoïdes.

Abstract
The aim of this work is to formulate a healing cream based on chlorophyll extracted from spinach leaves. Three solvents were used for extraction: distilled water, ethanol, and an ethanol/acetone mixture. Among these, ethanol yielded the highest yield (86%) and the highest chlorophyll concentration (53.03 µg/mL). Phytochemical screening of the ethanol extract revealed the presence of bioactive secondary metabolites such as tannins, quinones, flavonoids, and terpenoids. Quantitative assays showed a high content of polyphenols (48.06 mg EAG/g) and flavonoids (24.88 mg EQ/g). Evaluation of the antibacterial activity of the chlorophyll ethanol extract revealed moderate inhibitory effects against Staphylococcus aureus, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa. The extract demonstrated significant free radical scavenging power, with an IC50 value of 0.423 mg/ml, close to that of ascorbic acid (0.501 mg/ml). The haemolysis test confirmed the extract's safety with regard to human red blood cells. In addition, the in vitro membrane stability study showed a stabilisation rate of 99.20%. These results are similar to those obtained with diclofenac, indicating a potential anti-inflammatory effect of the extract. A topical formulation in the form of a cream based on the chlorophyll ethanol extract was developed. It presented good organoleptic characteristics, satisfactory rheological stability and a pH suitable for skin use.
Keywords: chlorophyll, healing cream, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, polyphenols, flavonoids.

Remerciements

Nous remercions avant tout ﷲ pour la force, la patience et les moyens qui nous ont permis d'achever ce travail.

Nous exprimons notre gratitude à l'ensemble du corps professoral et administratif de la faculté des Sciences, Université de Médéa, pour la qualité de leur enseignement.

Nos remerciements vont tout particulièrement à notre promotrice, ***Dr. ARBIA W.****, pour son accompagnement rigoureux, ses conseils et ses remarques constructives tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

Nos sincères remerciements s'adressent aussi aux membres du jury, ***Dr. TASSIST*** *et* ***Dr. BOUCHERIT*** *d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

Nous remercions également les laboratoires de chimie de l'Université de Médéa et ceux de contrôle qualité de l'établissement SAIDAL-Antibiotical pour leur accueil. Une mention spéciale à ***Mme BAKHTI Farida, Mme BOUKARA Karima, Mr. DOUIFI Abderraouf*** *et* ***Mr. BRIDA Abdelghani*** *pour leur soutien et leurs conseils précieux.*

Nous remercions également le Centre de Développement de l'Entrepreneuriat pour la formation et les efforts déployés dans ce cadre.

Enfin, nous exprimons toute notre reconnaissance à nos enseignants, à nos familles, et tout particulièrement à nos parents pour leur soutien indéfectible.

Dédicace

Tout d'abord, je remercie Dieu, notre Créateur, de m'avoir donné la force, la volonté et le courage d'accomplir ce travail modeste.

***À mon cher papa** Mhamed – Allah yarhmou –, je dédie ce mémoire humble. Ta présence me manque en ce jour important de ma vie, et je regrette sincèrement de ne pas t'avoir à mes côtés. Tu as été mon guide, mon soutien et ma source d'inspiration. Je te remercie du fond du cœur pour tout ce que tu as fait pour moi. Je t'adresse cette dédicace empreinte de gratitude et d'amour. Tu resteras à jamais dans mon cœur.*

***À ma chère maman** Razika, ma plus grande source de réconfort et de soutien. Cette dédicace est une expression de ma gratitude éternelle pour tout ce que tu as sacrifié pour moi. Ce mémoire est le fruit de ton amour et de tes encouragements constants. Je te suis infiniment reconnaissante pour ta présence inestimable.*

***À mes adorables sœurs** Hadil et Amira, ainsi qu'à mes chers frères Mouloud, Sofiane et Ismail, dont la présence à mes côtés m'a été d'un soutien précieux tout au long de mon parcours.*

À toute la famille Moussouni,

***À mes amies** Faïza, Zina, Naïma, Houda, Khaoula, Meriame : merci pour votre amitié sincère et votre soutien précieux.*

***À mes cousines** Khaoula, Ikram, Nesrine et Ishrak, pour les beaux moments vécus à vos côtés.*

***À mon cher binôme** et ma sœur de cœur Nawel, pour m'avoir accompagnée et supportée.*

À tous ceux qui m'aiment,

À tous ceux que j'aime,

À tous ceux qui me sont chers,

Merci pour votre impact dans ma vie



Roumaissa



Dédicace

À Dieu, source de toute connaissance,

Du fond du cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers.

À mes chères parentes,

Merci pour la vie, l'amour, les sacrifices et le courage que vous m'avez transmis. Ce modeste travail est le fruit de vos prières, de vos efforts et de vos vœux exaucés. Que Dieu vous accorde santé, bonheur et longue vie. Votre fille unique est enfin diplômée, comme vous l'avez tant rêvé. El Hamdoullilah.

À mes merveilleux frères, Smail, Brahim et Chérif,

Vos sourires et vos encouragements ont illuminé mon chemin. Merci d'avoir été mes piliers.

Merci d'avoir été mes anges gardiens, cette réussite est aussi la vôtre.

À ma belle-sœur Maria,

Merci pour ta bienveillance et ton soutien constant.

À ma chère grand-mère,

Ton amour, ta sagesse et tes prières m'ont portée. Je te suis infiniment reconnaissante.

À mes chères cousines Afaf, Fadhila, Malek, Douaa, Sihem, Imène et Doudja,

Merci pour votre présence et vos encouragements, même à distance.

À ma précieuse binôme Roumaïssa,

Ton amitié est exceptionnelle, et ta présence durant ces années universitaires a donné un véritable sens à mon parcours.

Merci d'être mon amie, ma partenaire de travail et d'avoir partagé cette belle aventure à mes côtés.

À mes amies Zina, Naïma, Meriem, Faïza, houda, Wafaa et khadidja

Merci pour votre soutien et vos mots qui ont nourri ma motivation.

Enfin, à tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment : cette réussite est aussi la vôtre.

Nawel



SOMMAIRE

Résumé

Remerciement

Dédicaces

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des symboles

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. Activité cicatrisante 4

I. 1. 1. Anatomie de la peau 4

I. 1. 1. 1. Définition de la peau 4

I. 1. 1. 2. Structure de la peau 4

I. 1. 1. 3. Rôle de la peau (fonction et propriété) 9

I. 1. 1. 4. Affection de la peau 10

I. 1. 2. Plaies 11

I. 1. 2. 1. Définition 11

I. 1. 2. 2. Les types de plaies 11

I. 1. 2. 3. Classification des plaies 11

I. 1. 3. Cicatrisation 13

I. 1. 3. 1. Définition 13

I. 1. 3. 2. Type de cicatrice 13

I. 1. 3. 3. Les étapes de la cicatrisation 13

I. 1. 3. 4. Les facteurs qui influencent la guérison des cicatrices 17

I. 2. Les formes pharmaceutiques à application cutanée 17

I. 2. 1. définition 17

I. 2. 2. Pommade 17

I. 2. 3. Gels 18

I. 2. 4. Pâtes 18

I. 2. 5. Les crèmes 19
I. 2. 6. Les émulsions 19
I. 3. La chlorophylle 25
I. 3. 1. Définition 25
I. 3. 2. Historique 25
I. 3. 3. Propriétés de Chlorophylle 26
I. 3. 4. Action et utilisation de chlorophylle 27

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES

II. 1. Objectif du travail 31
II. 2. Lieu de travail 31
II. 3. Matériel et produits 31
II. 3. 1. Equipements et matériel de laboratoire 31
II. 3. 2. Le matériel biologique 33
II. 4. Méthodes 34
II. 4. 1. Préparation de l'extrait végétal 34
II. 4. 2. Rendement d'extraction 34
II. 4. 3. Caractérisation physico-chimique de l'extrait préparé 35
II. 4. 3. 1. Dosage des pigments chlorophylliens : chl (a, b) (mg/gMF) 35
II. 4. 3. 2. Détermination de l'indice de réfraction 35
II. 4. 3. 3. Détermination de pH et de la conductivité 35
II. 4. 3. 4. Screening phytochimique 36
II. 4. 3. 5. Dosage des polyphénols totaux 36
II. 4. 3. 6. Dosage des flavonoïdes totaux 37
II. 4. 3. 7. Evaluation de l'activité biologique de l'extrait 38
II. 4. 4. Formulation de la crème cicatrisante 44
II. 4. 4. 1. Préparation des émulsions 44
II. 4. 4. 2. Caractérisation des émulsions 47

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Rendement de l'extraction 51
III. 2. Screening (Criblage) phytochimique 52
III. 3. Caractéristiques physicochimiques 53

III. 4. Dosage des pigments chlorophylliens : chl (a, b) (mg/gMF) 53

III. 5. Dosage des polyphénols totaux 54

III. 6. Dosage des flavonoïdes totaux 55

III. 7. Evaluation de l'activité biologique et l'activité anti-inflammatoire des extraits végétaux. 56

III. 7. 1. Evaluation de l'activité antioxydante 56

III. 7. 2. Evaluation de L'activité antimicrobienne 58

III.7. 3. Evaluation de l'activité hémolytique 60

III. 7. 4. Evaluation de la stabilisation de la membrane des globules rouges 61

III. 8. Contrôle de qualité des crèmes formulées 61

III. 8. 1. Caractère organoleptique 62

III. 8. 2. Aspect microscopique 63

III. 8. 3. Examen physico- chimique 64

III. 8. 3. 1. Détermination du pH 64

III. 8. 4. Sens d'émulsion 64

III. 8. 5. Etude de stabilité accélérée par technique de centrifugation 66

III. 8. 6. Calcul de l'indice de crémage 67

III. 8. 7. Etude la viscosité de la crème 67

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
Chl a	Chlorophylle a
Chl b	Chlorophylle b
EAG	Équivalent Acide Gallique
UV	Ultraviolet
EF	Extrait Frais
ATCC	American Type Culture Collection
MH	Mueller Hinton
UFC	Unité Formant Colonie
AINS	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
LPS	Lipo-Polysaccharides
AG	Acide Gallique
OCH_3	Groupe Méthoxy
R	Radical
pH	Potentiel Hydrogène
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
OH	Groupe Hydroxyle
CMC	Concentration Micellaire Critique
E/H	Émulsion Eau dans Huile
E/H/E	Émulsion Eau dans Huile dans Eau
EM	Émulsion
HLB	Balance Hydrophile-Lipophile
H/E	Émulsion Huile dans Eau
H_2SO_4	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
I-C	Indice de Crémage
E	Phase Aqueuse

H	Phase Huileuse
PA	Principe Actif
TA	Tensioactif
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
A°	Angströms

Nomenclatures et symboles

Symbole	Désignation	Unité
H	Viscosité dynamique	Pa·s
Γ	Taux de cisaillement	s^{-1}
T	Contrainte de cisaillement	Pa
Λ	Longueur d'onde	nm
nm	Nanomètre	___
pH	Potentiel hydrogène	—
I-C	Indice de crémage	%
µg	Microgramme	
T	Température	°C
°C	Degré Celsius	
v/v	Volume par volume	ml
%	Poucentage	

Liste des figures

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Fig. I.1. schéma de la structure de la peau humaine 4
Fig. I.2. structure de l'épiderme 5
Fig. I.3. structure du derme 6
Fig. I.4. Schéma de l'hypoderme 7
Fig. I.5. schema des annexes de la peau 8
Fig. I.6. les types d'emulsions 20
Fig. I.7. schema de la molecule amphiphiles: une tête polaire hydrophile et une queue lipophile. 21
Fig. I.8. Représentation schématique des divers procédés de déstabilisation 23
Fig. I.9. la chlorophylle 25
Fig. I.10. Structure moléculaire des chlorophylles a et b 26

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES

Fig. II.1. L'épinard (Spinacia oleracea). 33
Fig. II.2. Rota-évaporateur (photo original) (Ghernaout et Moussouni, 2025) 35
Fig. II.3. appareil multi paramètres de paillasse pour la mesure du pH et de la conductivité (photo original) 36
Fig. II.4. Mécanisme réactionnel de test DPPH 39
Fig. II.5. Préparation de l'inoculum (la suspension bactérienne) (Photo originale) 41
Fig. II.6. Ensemencement par écouvillonnage de la suspension bactérienne. 41
Fig. II.7. Compteur automatique de colonies (photo originale) 42
Fig. II.8. Les étapes de préparation d'une émulsion. 46
Fig. II.9. a) Le résultat que nous devrions obtenir. ; b) Le microscope utilisé 47
Fig. II.10. Détermination du sens de l'émulsion par la méthode des colorants 48
Fig. II.11. centrifugeuse (photo originale) 49
Fig. II.12. Viscosimètre à mobile tournant (BOHLIN VISCO) 50

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Fig. III.1. Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par (a) l'acide gallique et (b) de l'extrait alcoolique de la chlorophylle 56
Fig. III.2. Résultats de l'étude de l'effet antimicrobien de la chlorophylle (photo originale) (A) (B) (C) (D) (E). 58

Fig. III.3. Aspect macroscopique des émulsions (F0-F3). 62
Fig. III.4. Observation microscopique au grossissement 40X de la formule (a) témoin (b) avec 1% de chlorophylle (c) avec 2% de chlorophylle (d) avec 3% de chlorophylle ; à 25°C,après 24 heures de préparation (photo original)..... **Erreur ! Signet non défini.**
Fig. III.5. L'aspect de l'émulsion après dilution (a) dans l'eau (b) dans l'huile d'olive **Erreur ! Signet non défini.**
Fig. III.6. Test au bleu de méthylène (photo originale). ..... **Erreur ! Signet non défini.**
Fig. III.6. Courbes d'écoulement de crèmes à base de la chlorophylle..... 68

Liste des tableaux

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I.1. classification des plaies selon le stade 12
Tableau I.2. les étapes de la cicatrisation 14
Tableau I.3. facteurs favorisant le retard de cicatrisation..... 17
Tableau I.4. caractéristique physico-chimique des chlorophylles a et b 27

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES

Tableau II.1. liste de la verrerie utilisée..... 31
Tableau II.2. appareillage utilisée 32
Tableau II.3. reactifs de milieux utilises 32
Tableau II.4. conditions de preparation de l'extrait vegetal 34
Tableau II.5. les ingrédients utilises dans la préparation de la crème cicatrisante..... 45

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau III.1. rendement et caractéristique organoleptique des extraits végétaux prépares... 51
Tableau III.2. screening des constituants chimique des chlorophylles 52
Tableau III.3. les caractéristiques physico-chimiques 53
Tableau III.4. dosage de polyphénol totaux en (mg EAG/g E) 54
Tableau III.5. Les résultats de IC_{50} de l'acide ascorbique et l'extrait 54
Tableau III.6. diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'extraits teste selon la méthode des disques..... 59
Tableau III.7. caractère organoleptique des différentes formules..... 62
Tableau III.8. résultats du test de stabilité par centrifugation des émultions..... 66

INTRODUCTION GENERALE

La peau est l'un des organes les plus vastes et essentiels du corps humain. Elle assure une fonction de barrière protectrice contre les agressions extérieures telles que les bactéries, les champignons, les virus, mais aussi les facteurs environnementaux comme la pollution ou les rayons UV. Malgré ses mécanismes de défense, la peau reste vulnérable aux infections, blessures et inflammations, qui, si elles ne sont pas traitées correctement, peuvent engendrer des complications sérieuses.

Pour faire face à ces affections cutanées, le secteur pharmaceutique propose plusieurs formes galéniques topiques comme les crèmes, les gels, les pommades ou encore les émulsions, permettant une administration locale de substances actives directement sur les zones affectées. Cependant, avec la baisse d'efficacité des médicaments synthétiques et les crèmes cicatrisantes conventionnelles à base de corticoïdes, antibiotiques ou antiseptiques suscitent des inquiétudes quant à leurs effets secondaires et à leur usage prolongé, l'intérêt pour les produits naturels ne cesse de croître. Les plantes médicinales, riches en molécules bioactives, sont désormais largement étudiées pour leurs propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antioxydantes et cicatrisantes. Ces extraits naturels représentent aujourd'hui une alternative prometteuse et plus sûre aux médicaments chimiques.

Parmi ces composés naturels, les pigments végétaux comme les anthocyanines, les caroténoïdes, les bétalaïnes et surtout la chlorophylle occupent une place particulière. D'abord connus comme agents colorants naturels dans l'industrie agroalimentaire et cosmétique, ils révèlent également des propriétés biologiques majeures. Ces pigments participent à la défense de l'organisme contre le stress oxydatif, les inflammations et certaines maladies.

La chlorophylle, pigment vert présent dans toutes les plantes vertes, se distingue par une structure chimique proche de celle de l'hémoglobine, ce qui lui confère une grande affinité avec le corps humain. Plusieurs études ont démontré que la chlorophylle stimule la régénération cellulaire, active les fibroblastes, accélère l'épithélialisation et améliore la microcirculation locale, contribuant ainsi à une meilleure cicatrisation des plaies. De plus, elle présente une activité antibactérienne efficace, notamment contre les bactéries Gram positives fréquemment rencontrées dans les infections cutanées. Elle est également capable de neutraliser certaines.

Dans un contexte de recherche de solutions naturelles, sûres et efficaces, l'utilisation de la chlorophylle dans des formulations dermiques innovantes suscite un fort intérêt, aussi bien en dermatologie qu'en cosmétologie.

Pour répondre à notre problématique et atteindre les objectifs fixés, ce manuscrit est divisé en trois chapitres principaux :

• Chapitre I, représente la partie théorique, présentant la physiologie de la peau, les étapes du processus de cicatrisation, généralités sur les émulsions cutanées et leurs rôles dans les traitements topiques ainsi qu'une présentation détaillée de la chlorophylle, ses sources naturelles, ses propriétés biologiques et ses applications thérapeutiques.

• Chapitre II, Partie expérimentale, dans laquelle seront présentés le matériel utilisé, les méthodes de préparation de l'extrait végétal, sa caractérisation physico-chimique et l'évaluation de son activité biologique ainsi que la formulation des crèmes à base de la chlorophylle,

• Chapitre III, ou on présente les résultats expérimentaux obtenus, leurs interprétations et leurs discussions permettant de tirer des conclusions fiables.

Finalement, Nous achevons notre travail par une conclusion générale et perspectives.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. Activité cicatrisante

I. 1. 1. Anatomie de la peau

I. 1. 1. 1. Définition de la peau

La peau est un organe vivant situé à l'interface entre les organismes vivants et l'environnement. Ses propriétés varient selon les sites anatomiques, l'âge et le sexe (1). La peau se renouvelle constamment et possède à la fois des caractéristiques d'imperméabilité, agissant comme une barrière, et perméable, permettant l'échange de substances à travers divers mécanismes comme la diffusion simple, facilitée par des enzymes, ou activée par des pompes spécifiques. Elle résiste aux agressions diverses, notamment chimiques, mécaniques, lumineuses et microbiologiques, ce qui la rend essentielle pour le diagnostic des maladies cutanées et pour tester l'efficacité des produits cosmétiques (2).

I. 1. 1. 2. Structure de la peau

La composition de la peau est complexe. Elle se compose de trois strates superposées, allant de la surface vers les profondeurs du corps (fig. I. 1) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (1).

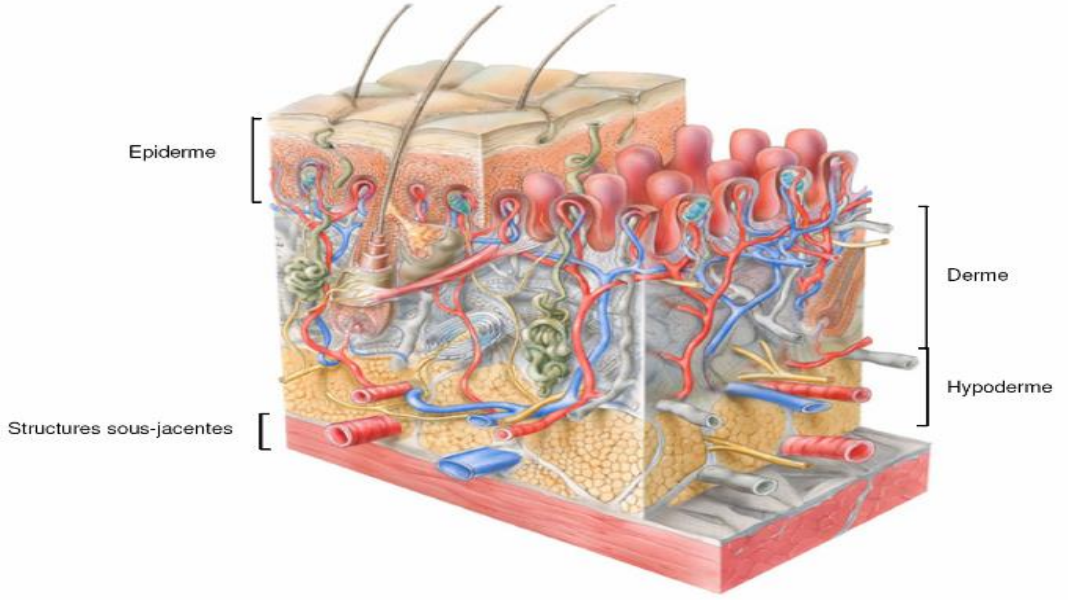


Fig. I. 1. Schéma de la structure de la peau humaine (3).

A/ Épiderme

C'est la couche supérieure de la peau. L'épaisseur de l'épiderme varie selon la localisation. Elle est composée de quatre couches de cellules ou kératinocytes empilées les unes sur les autres, de bas en haut, ce sont la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (fig. I. 2).

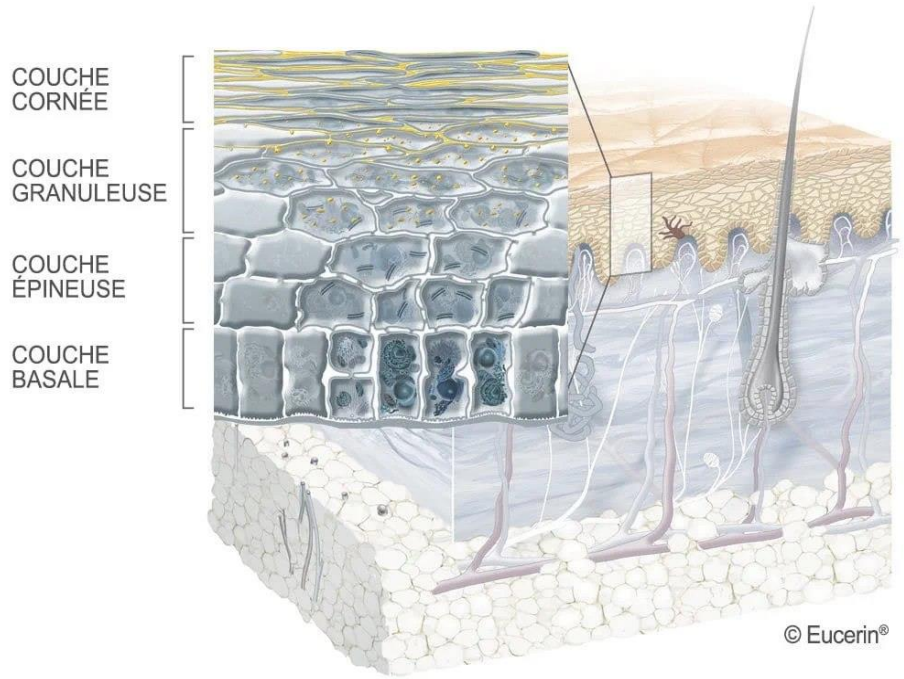


Fig. I. 2. Structure de l'épiderme **(3)**.

Le renouvellement de l'épiderme prend environ 39 jours, il est important de noter que cette couche ne contient pas de vaisseaux sanguins. Les cellules de la couche basale migrent progressivement vers la surface de la peau en se chargeant en kératine, une protéine fibreuse et résistante, tandis que leurs noyaux disparaissent.

En plus des kératinocytes, l'épiderme contient d'autres cellules, telles que :

- Les mélanocytes, responsables de la pigmentation de la peau.
- Les cellules de Langerhans, qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire.

La couche cornée, ou stratum corneum, est la plus haute de l'épiderme et mesure entre 10 et 20 micromètres d'épaisseur. Elle est composée de 15 couches environ de cellules mortes, sans noyaux, et leur cohésion est assurée par un ciment lipidique, principalement des céramides, qui sont importants en cosmétique. Cette couche, qui est en contact direct avec l'environnement, agit comme une barrière quasi imperméable. Les cellules épidermiques se déplacent

progressivement vers la surface, et les cellules les plus anciennes sont éliminées par des actions mécaniques comme le frottement ou le lavage.

La couche cornée contient de l'eau, ce qui lui confère de la flexibilité, mais elle est fragile et peut perdre sa fonction protectrice lorsqu'elle est altérée, augmentant ainsi le risque d'infections. De plus, un film hydrolipidique se forme à la surface de la peau, constitué de sébum, de débris cellulaires, de sueur et de sels minéraux. Ce film aide à maintenir l'hydratation de la peau et la protège contre les attaques microbiennes et fongiques, en plus de la rendre douce et lubrifiée (4).

B/Derme

Le derme, qui est la couche la plus épaisse et dense de la peau, se situe juste en dessous de l'épiderme. Il est séparé de l'épiderme par la membrane basale, qui agit comme un filtre permettant la diffusion des substances entre les deux couches. Le derme est un tissu conjonctif complexe qui contient des fibroblastes, des cellules spécialisées dans la production de fibres comme le collagène et l'élastine (fig. I. 3), offrant ainsi résistance et élasticité à la peau. Il contient également une matrice extracellulaire, des vaisseaux sanguins et des terminaisons nerveuses.

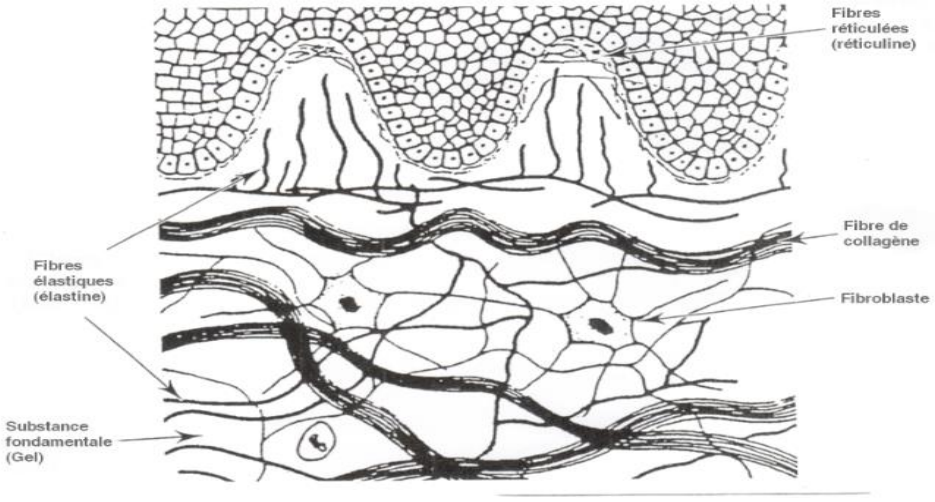


Fig. I. 3. Structure du derme **(5)**.

Le derme se divise en deux zones anatomiques distinctes :

- Le derme papillaire qui représente environ 10% de l'épaisseur totale du derme, est constitué principalement de fibres élastiques et de substance fondamentale.
- Le derme réticulaire, quant à lui, présente des fibres élastiques moins compactes que dans la zone papillaire, avec une quantité de substance fondamentale plus importante. La couche

dermique inférieure, en revanche, contient une plus grande densité de collagène et d'élastine. Les fibres de collagène y sont disposées de manière irrégulière et parallèlement à la surface de la peau, ce qui permet à la peau de s'adapter aux mouvements du corps. Ainsi, le derme remplit des fonctions mécaniques, thermiques et énergétiques essentielles pour l'épiderme(6).

C/Hypoderme

L'hypoderme, la couche inférieure à la peau, est formée de cellules adipeuses disposées en lobules, séparés par des membranes fibreuses et parcourus par des vaisseaux sanguins. Il se poursuit avec la couche de graisse sous-jacente (fig. I. 4).

Dans sa forme la plus complète, l'hypoderme se compose de trois couches superposées :

- Le tissu adipeux, formé de graisse, est segmenté en lobules par des structures conjonctives qui se fixent à la couche profonde du derme.
- Le fascia superficiel ou la toile sous-cutanée, qui peut être isolé par dissection. Ce sont les extensions qui restreignent les compartiments contenant les lobules adipeux.
- Le tissu cellulaire sous-cutané constitue une couche de séparation entre la peau et l'aponévrose superficielle qui se trouve en dessous. C'est au sein de cette couche que circulent les faisceaux vasculaires et nerveux sous-cutanés (7).

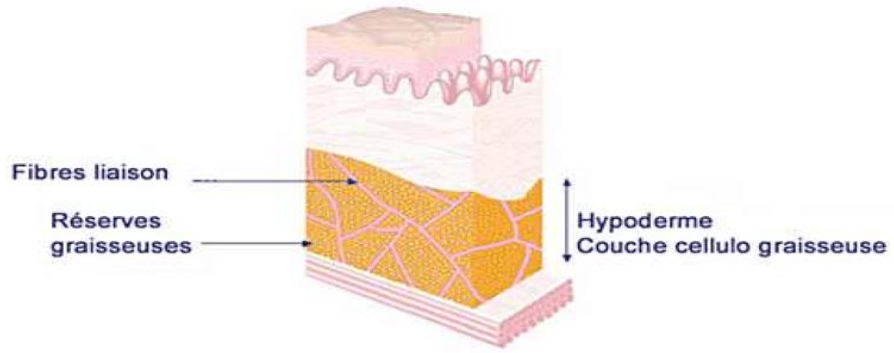


Fig. I. 4. Schéma de l'hypoderme (8).

D/Annexes cutanées

Les annexes cutanées (fig. I. 5) incluent les glandes cutanées (glandes sudoripares eccrines et apocrines, et glandes sébacées) ainsi que les phanères (poils et ongles) (9) :

- ✓ **Glandes sébacées**

Les glandes sébacées sont généralement associées aux poils. Ce sont des glandes alvéolaires de type holocrine, dont la partie sécrétrice est localisée dans le derme et entourée d'une capsule conjonctive. Leur sécrétion, le sébum, est de nature lipidique et se déverse au

niveau du col du follicule pileux. Les cellules périphériques des glandes subissent fréquemment des mitoses.

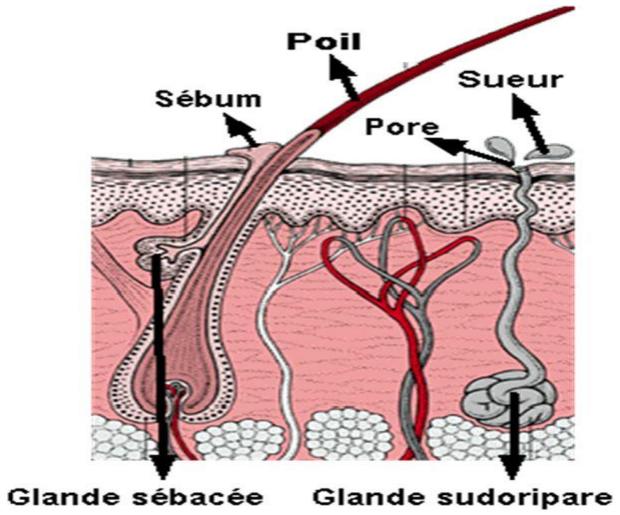


Fig. I. 5. Schéma des annexes de la peau (10).

✓ **Glandes sudoripares**

Il existe deux types de glandes sudoripares :

- Glandes sudoripares eccrines

Ce sont des glandes tubuleuses simples, dont la partie sécrétrice est pelotonnée. Elles se trouvent dans la région profonde du derme. Le segment sécréteur est une glande tubuleuse bordée par un épithélium cylindrique formé de deux types de cellules : les cellules claires et les cellules sombres. Cet épithélium est entouré de cellules myoépithéliales. Le segment excréteur traverse le derme et est revêtu par un épithélium cubique bistratifié, avant d'atteindre l'épiderme où il est constitué de kératinocytes.

- Glandes sudoripares apocrines

Ces glandes sont également tubuleuses, et leur partie la plus profonde atteint la région profonde du derme. Leur canal excréteur s'ouvre soit à la surface de l'épiderme, soit dans la gaine du poil.

✓ **Poils ou cheveux**

Les poils se composent d'une partie visible à l'extérieur de la peau, appelée tige, et d'une partie implantée dans la peau, appelée racine. À son extrémité profonde, la racine se dilate pour former le bulbe pileux, qui est une cavité remplie de tissu conjonctif fortement vascularisé : la

papille folliculaire. Les cellules épithéliales du bulbe, qui recouvrent la papille folliculaire, forment la matrice du poil.

- ✓ **Muscle arrecteur du poil**

Le muscle arrecteur du poil est un muscle lisse qui longe la face externe de la glande sébacée, tendu entre la partie inférieure du follicule pileux et la jonction dermo-épidermique.

- ✓ **Ongles**

Chaque doigt et orteil présente une annexe spécialisée, l'ongle, située sur la face dorsale de la peau.

I. 1. 1. 3. Rôle de la peau (fonction et propriété)

Les fonctions principales de la peau assurent les fonctions suivantes (11) :

- ❖ **Protection :** la peau constitue une barrière anatomique contre les agents pathogènes et les dommages entre l'environnement interne et externe de l'organisme. Les cellules de Langerhans dans la peau font partie du système immunitaire adaptatif.
- ❖ **Sensation :** la peau contient une variété de terminaisons nerveuses ce qui en fait d'elle un organe sensible à la chaleur et au froid, au toucher, aux blessures, à la pression et aux vibrations.
- ❖ **Thermorégulation :** les vaisseaux sanguins dilatés (augmentation de la perfusion superficielle) favorisent la perte de chaleur, alors que les vaisseaux rétrécis réduisent considérablement le flux sanguin cutané et conservent la chaleur.
- ❖ **Contrôle de l'évaporation :** la peau constitue une barrière relativement sèche et semi-imperméable à la perte de fluide.
- ❖ **Stockage et synthèse :** la peau agit également comme un centre de stockage pour les lipides et l'eau.
- ❖ **Résistance à l'eau :** la peau agit comme une barrière résistante à l'eau de sorte que les nutriments essentiels ne soient pas éliminés par lavage du corps. Des nutriments et des huiles qui aident à hydrater notre peau sont couverts par notre couche de peau la plus externe, l'épiderme.

  Ceci est facilité en partie par les glandes sébacées qui libèrent le sébum, un liquide huileux. L'eau elle-même n'entraîne pas l'élimination d'huiles sur la peau, parce que les huiles résidant dans notre flux de derme seraient affectées par l'eau sans l'épiderme.

I. 1. 1. 4. Affection de la peau

L'affectation de la peau désigne toute modification de l'aspect ou de la fonction de la peau. Ces modifications peuvent être causées par une multitude de facteurs, allant de simples irritations à des maladies plus graves.

❖ **Les différentes formes d'affectation cutanée** (12).

- **Acné :** L'acné est le problème de peau que les médecins voient le plus souvent.
- **Kératoses actiniques :** Bien que les kératoses actiniques ne constituent pas des cancers de la peau à proprement parler, il demeure important de faire traiter ces lésions, car elles peuvent se transformer en cellules spinocellulaires cancéreuses.
- **Carcinome basocellulaire :** Le carcinome basocellulaire est l'un des types de cancer de la peau les plus répandus au Canada.
- **La sécheresse cutanée :** La sécheresse cutanée est une maladie très courante qui augmente avec l'âge et dans les régions où le climat est plus froid.
- **Eczéma :** L'eczéma est une dermatite, c'est-à-dire un type d'inflammation de la peau.
- **Hidradénite suppurée :** L'hidradénite suppurée, aussi appelée hidrosadénite, est une maladie chronique caractérisée par la présence d'inflammation causant sous la peau des bosses et des abcès souvent douloureux.
- **Hyperhidrose :** Les personnes affectées par l'hyperhidrose souffrent d'une transpiration abondante.
- **Mélanome malin :** Le mélanome malin est un cancer de la peau rare mais très dangereux.
- **Photovieillissement :** Le photovieillissement est un vieillissement prématuré de la peau causé par une exposition répétée aux rayons ultraviolets (UV).
- **Psoriasis :** Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau.
- **Rosacée :** La rosacée est une maladie chronique de la peau qui affecte principalement le visage.
- **Cancer spinocellulaire :** Le cancer spinocellulaire est le deuxième plus fréquent cancer de la peau au Canada, après le cancer basocellulaire.
- **L'urticaire :** C'est une affection cutanée courante qui se caractérise par des éruptions cutanées en plaques rouges et enflées accompagnées de démangeaisons ou de sensations de brûlure ou piqûre.

- **Le vitiligo :** Le vitiligo est une affection cutanée qui provoque l'apparition sur le corps de plaques blanchâtres attribuables à la perte de cellules produisant la mélanine, un pigment responsable de la couleur de la peau, des cheveux et des yeux.

I. 1. 2. Plaies

I. 1. 2. 1. Définition

Une plaie est une lésion de la peau représentée par une rupture de la continuité des tissus et une effraction de la barrière cutanée nécessitant un processus dynamique complexe pour être réparée ou cicatrisée. Elle peut être superficielle, n'intéressant que l'épiderme (érosion), une partie du derme ou être profonde avec exposition du tissu sous-cutané. Son évolution dépend de son étendue et de sa profondeur mais également de facteurs locaux ou généraux qui peuvent freiner ou empêcher sa guérison (13).

I. 1. 2. 2. Les types de plaies

Il existe deux types principaux de plaies(14). :

- **Les plaies aiguës :** elles apparaissent soudainement et guérissent rapidement, généralement en moins de 4 semaines, sans facteur retardant la cicatrisation. Parmi les exemples, on trouve les brûlures, les plaies post-opératoires, les prélèvements de greffe et les plaies traumatiques comme les coupures, morsures ou gelures. Le principal risque associé est l'infection.
- **Les plaies chroniques :** elles se caractérisent par un délai de cicatrisation prolongé, dépassant 4 à 6 semaines, en raison de pathologies sous-jacentes comme le diabète ou l'insuffisance veineuse ou artérielle. Parmi les exemples, on cite les ulcères de jambe, les escarres, les plaies du pied diabétique et les moignons d'amputation. Ces plaies présentent un risque accru de non-cicatrisation, d'infection et de nécrose.

I. 1. 2. 3. Classification des plaies

Il y a Plusieurs méthodes de classification sont utilisées dans la documentation scientifique afin de décrire et de caractériser les plaies selon des stades en fonction de leur étiologie, du type de cicatrisation, du dommage tissulaire, de leur couleur (tableau I. 1) (7).

Tableau I. 1. Classification des plaies selon le stade

Stade	Caractéristiques de la plaie
Stade I	• Zone d'érythème ne pâlissant pas sous la pression de la peau intacte. Deviendra le siège de la lésion cutanée. • Autres indicateurs possibles chez l'individu de peau foncée : décoloration de la peau, chaleur, œdème, induration ou dureté.
Stade II	• Perte tissulaire partielle touchant l'épiderme, le derme ou les deux. • Se présente comme une abrasion, une phlyctène ou un ulcère superficiel. • Contours rouges, chauds et partiellement indurés ; souvent très douloureux. • Absence de tissu nécrotique.
Stade III	• Perte tissulaire totale atteignant le tissu sous-cutané et pouvant s'étendre au fascia sous-jacent sans toutefois le pénétrer. • Se présente sous la forme d'un cratère plus profond avec ou sans atteinte du tissu adjacent. • Présence de nécrose et d'inflammation. • Lit de la plaie non douloureux sauf s'il y a infection ou insuffisance artérielle.
Stade IV	• Perte tissulaire totale atteignant le muscle, l'os et les structures de soutien, telles que tendon et capsule articulaire. • Destruction et nécrose importantes ; infection systémique possible.
Stade X	• Escarrification jaunâtre ou tissu nécrosé noir épais recouvrant le lit de la plaie (limite ainsi l'évaluation de l'extension de la plaie). • Toutes les plaies (sauf le stade I, où la peau est intacte) peuvent passer par ce stade : il faut enlever l'escarre et les tissus morts afin d'évaluer le vrai stade de la plaie.

I. 1. 3. Cicatrisation

I. 1. 3. 1. Définition

La cicatrisation peut se définir comme la réponse élaborée par la peau à toute atteinte de son intégrité. La cicatrice est en fait la résultante d'un phénomène inéluctable complexe de réparation mettant en jeu des facteurs individuels, propres au patient : son âge, sa génétique, ses comorbidités, ses traitements, son système inflammatoire (15).

I. 1. 3. 2. Type de cicatrice

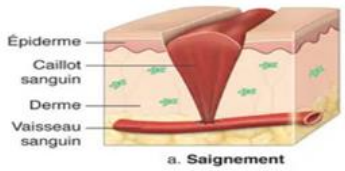
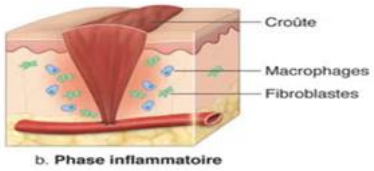
Si toutes les plaies suivent un même processus de réparation de la peau, la cicatrice formée peut revêtir différentes formes. Il est possible de distinguer différents types de cicatrices (16) :

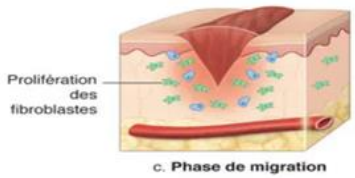
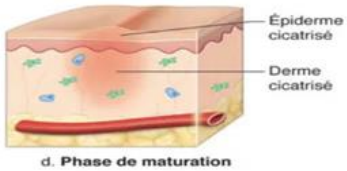
- **Les cicatrices blanches :** ce sont les plus fréquentes et font suite à une cicatrisation normale. Plates, elles sont le plus souvent discrètes et peuvent même devenir quasi-invisibles avec le temps.
- **Les cicatrices chéloïdes :** ce type de cicatrices pose un réel souci esthétique. Il s'agit d'une anomalie du processus de cicatrisation. Elles sont plus fréquemment retrouvées au niveau de la tête et du cou, ce qui explique le préjudice esthétique qu'elles peuvent générer. Une cicatrice chéloïde apparaît comme une boursouflure rougeâtre plus ou moins étendue, fibreuse et dure. À titre d'exemple, les cicatrices de césarienne peuvent évoluer vers des cicatrices chéloïdes ou hypertrophiques.
- **Les cicatrices atrophiques :** elles forment un creux ou un petit trou dans la peau et sont favorisées par une peau fine. Au niveau du visage, les cicatrices d'acné peuvent être de nature atrophique et constituent par ailleurs l'un des motifs les plus retrouvés en consultation de dermatologie ainsi que de médecine esthétique.
- **Les cicatrices hypertrophiques :** bombée, une cicatrice hypertrophique est bien limitée et de couleur similaire à la peau adjacente. Elle fait suite à une anomalie survenue pendant la cicatrisation, ce qui provoque une augmentation du volume de la cicatrice. Les zones à peau épaisse (thorax, oreilles, dos) sont plus touchées par les cicatrices hypertrophiques.

I. 1. 3. 3. Les étapes de la cicatrisation

Le processus de cicatrisation comprend plusieurs étapes distinctes. Les étapes principales de la cicatrisation d'une plaie sont présentées dans le tableau I. 2 (10).

Tableau I. 2. Les étapes de la cicatrisation

Phase de cicatrisation		Mécanisme d'action	Durée relative
Vasculaire		▪ Libération des facteurs de croissance et des cytokines par les plaquettes	**24- 48 h**
Inflammatoire (détersion)		▪ Les neutrophiles et les macrophages sont attirés dans la plaie ▪ Les neutrophiles et les macrophages digèrent les bactéries et libèrent des facteurs de croissance, des cytokines et des protéases	**24h- 15j**
Granulation-épidermisation (bourgeonnement)		▪ Les fibroblastes et les cellules endothéliales sont attirés	**Plusieurs semaines**

	 c. Phase de migration	dans la plaie et produisent des facteurs de croissance ▪ Fibroblastes → myofibroblastes ▪ Synthèse de matrice extracellulaire et des nouveaux vaisseaux ▪ Formation du tissu de granulation puis migration des kératinocytes pour l'épidermisation	
Maturation (remodelage)	 d. Phase de maturation	▪ Les fibroblastes orchestrent le remodelage et la maturation de la cicatrice ▪ Apoptose des cellules immunitaires et endothéliales	**Mois, années**

		en excès diminution de la densité cellulaire	

I. 1. 3. 4. Les facteurs qui influencent la guérison des cicatrices

Plusieurs facteurs peuvent conduire à une cicatrisation altérée. En termes généraux, les facteurs qui influencent la réparation peuvent être classés en locaux et systémiques. Les facteurs locaux sont ceux qui influencent directement les caractéristiques de la plaie elle-même, tandis que les facteurs systémiques sont la santé globale ou l'état pathologique de l'individu qui affectent sa capacité à guérir (tableau I. 3) (10).

Tableau I. 3. Facteurs favorisant le retard de cicatrisation

Les facteurs locaux	Les facteurs systémiques
Qualité et type de suture ; Localisation forme de la plaie ; Protocole de soins locaux ; Qualité de la vascularisation artérielle et veineuse ; Infection systémique et locale ; Radiothérapie locale ; Corps étranger ; Allergie.	Age (dermatoporose) ; État nutritionnel ; Diabète ; Hypoxie tissulaire ; Maladies neurologiques ; Insuffisance rénale dialysée ; Pathologie génétique ; Phototype ; Traitements médicaux ; Stress ; Tabac ; Hormones ; Radiothérapie ; Sédentarité ; État psychologique ; Situation sociale.

I. 2. Les formes pharmaceutiques à application cutanée

I. 2. 1. définition

Les préparations semi-solides pour application cutanée sont destinées à être appliquées sur la peau ou sur certaines muqueuses afin d'exercer une action locale ou d'entraîner la résorption de certains principes actifs

- Elles sont également utilisées en vue de leur action émolliente ou protectrice de la peau.
- Elles sont constituées d'un excipient simple ou composé, d'origine synthétique ou naturelle, dans lequel sont dissous ou dispersés un ou plusieurs principes actifs.

La préparation peut contenir aussi des agents antimicrobiens, des antioxydants, des émulsifiants, des épaississants, des agents de pénétration…etc. Ces préparations sont destinées à être appliquées sur une peau gravement lésée sont stériles.

I. 2. 2. Pommade

Les pommades sont des préparations de consistance molle, destinées à être appliquées sur la peau et sur les muqueuses. Elles sont constituées d'un excipient simple ou complexe au sein duquel se trouve dispersé ou dissous un ou plusieurs principes actifs.

Les pommades se composent d'une base monophasique dans laquelle peuvent être dispersées des substances liquides ou solides. On distingue (17) :

- **Pommades hydrophobes**

  Ne peuvent absorber que de petites quantités d'eau sous agitation mécanique. Peu agréables sur le plan cosmétique à cause de leur toucher très gras. Elles ont un caractère occlusif de la base augmentant la pénétration.

  Excipients : Vaseline, paraffine, huiles de vaseline, huiles végétales ou les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides.

- **Pommades absorbant l'eau**

  Peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau. Les bases utilisées, sont celles d'une pommade hydrophobe dans lesquelles sont incorporées : soit des émulsifiants de type « eau dans huile » tels que la graisse de laine, des alcools de graisse de laine, des esters de sorbitane, des monoglycérides, des alcools gras. Soit des émulsifiants du type "huile dans l'eau" tels que les alcools gras sulfatés, les alcools gras polyoxyéthylénés.

- **Pommades hydrophiles**

  Préparations dont l'excipient est miscible à l'eau. Excipient habituellement constitué de macrogols (polyéthylène glycols) liquides et solides.

I. 2. 3. Gels

Sont constitués de liquides gélifiés à l'aide d'agents épaississants appropriés. On distingue (17) :

- **Les gels hydrophobes (Oléogels) :** réseau de macromolécules gélifiantes hydrophobes tels que la silice ou certaines argiles, qui gonflent dans des liquides huileux.
- **Les gels hydrophiles (Hydrogels) :** réseau de macromolécules hydrophiles (alginates, dérivés de cellulose, gélifiants synthétique vinyliques…) qui emprisonne des solutions aqueuses, hydro-alcooliques ou glycoliques.

I. 2. 4. Pâtes

Les pâtes sont des préparations contenant de fortes proportions de poudres finement dispersées dans l'excipient. Permettent de protéger plus facilement une surface cutanée importante à l'aide d'une couche mince et uniforme de poudre. On distingue (17) :

- **Les pâtes lipophiles.**
- **Les pâtes hydrophiles.**

I. 2. 5. Les crèmes

Sont des émulsions à préparation multiphasique composé d'une phase lipophiles et une phase aqueuse pour stabiliser les deux phases il est nécessaire d'additionnée :

- **Un ou plusieurs tensioactifs**
- **Un agent épaississant**

On distingue :

- **Les crèmes hydrophobes :** la phase externe est la phase lipophile. Ces préparations contiennent des émulsifiants « eau dans huile ».
- **Les crèmes hydrophiles :** la phase externe est une phase aqueuse. Ces préparations contiennent des émulsifiants « huile dans eau ».

I. 2. 6. Les émulsions

Sont des systèmes thermodynamiquement instables, composés de deux liquides non miscibles, dont l'un est dispersé sous forme de fines gouttelettes dans l'autre. Leur stabilité est généralement améliorée par l'ajout d'un ou plusieurs agents émulsionnants.

I. 2. 6. 1. Composition des émulsions

Une émulsion se compose principalement de deux phases (18) :

Phase huileuse (lipophile) : Également appelée phase grasse ou organique, elle contient des huiles d'origine végétale, animale ou minérale. Elle inclut aussi des corps gras comme les cires, des émulsionnants lipophiles, un agent viscosifiant lipophile et des antioxydants lipophiles.

Phase aqueuse (hydrophile) : Composée d'eau purifiée et de divers solutés hydrosolubles tels que les ions minéraux, acides, bases, vitamines, glucides et protéines. Elle contient également des agents humectant, des viscosifiants hydrosolubles, des émulsionnants hydrosolubles, ainsi que des conservateurs antimicrobiens et des antioxydants hydrosolubles.

I. 2. 6. 2. Les types des émulsions

Il existe plusieurs types d'émulsions (19) :

- **Les émulsions simples**
  - **La phase dispersante est hydrophile :** on parle d'émulsion « huile dans eau », émulsion H/E ou L/H, où les gouttelettes d'huile sont dispersées dans l'eau qui est majoritaire.

- **La phase dispersante est lipophile :** on parle d'émulsion « eau dans huile », émulsion E/H ou H/L où l'huile est majoritaire (fig. I. 6).

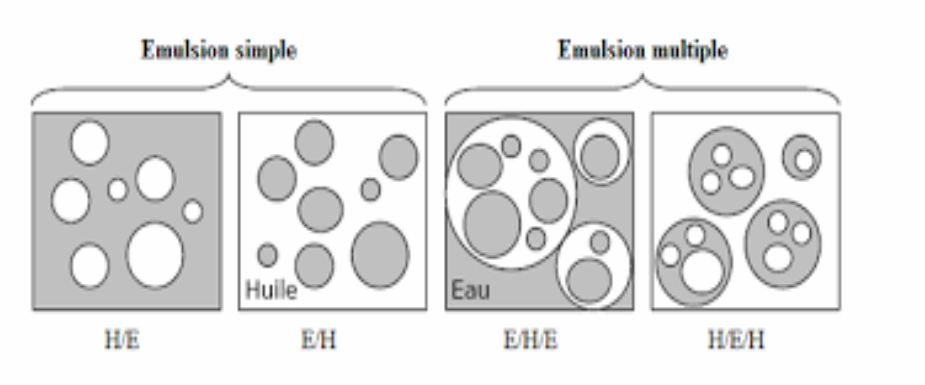


Fig. I. 6. Les types d'émulsions (20)

➢ **Des émulsions multiples, triples ou multiphases**

- **Soit des émulsions E/H/E,** où les molécules aqueuses sont dispersées dans des gouttelettes d'huile, elle-même dispersées dans une phase hydrophile
- **Soit des émulsions H/E/H**, les molécules huileuses sont dispersées dans des gouttelettes d'eau, elle-même dispersées dans une phase lipophile.

I. 2. 6. 2. Stabilisation des émulsions

Ce système est thermodynamiquement instable et nécessite l'ajout d'un agent stabilisant, appelé émulsionnant, émulsifiant, tensioactif, ou encore agent de surface.

- **Tensioactif :** Ces émulsionnants sont indispensables pour permettre la dispersion des phases et éviter leur séparation. Ils permettent d'abaisser la tension superficielle entre deux phases non miscibles grâce à leur structure. Ce sont des molécules amphiphiles constituées de deux parties (fig. I.7) de polarités différentes : une tête polaire hydrophile et une queue lipophile (19).

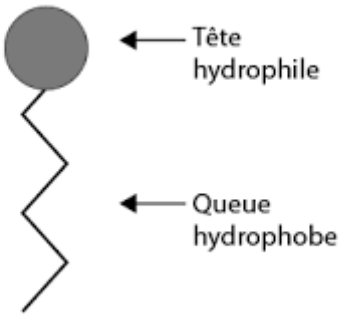


Fig. I. 7. Schéma de la molécule amphiphiles : une tête polaire hydrophile et une queue lipophile (21).

La partie hydrophile (polaire) de l'émulsionnant s'oriente vers la phase aqueuse alors que la partie lipophile (apolaire) s'oriente vers la phase huileuse.

Une molécule tensioactive peut contenir deux ou plusieurs chaînes hydrophobes. La partie hydrophobe est généralement une chaîne alkyle dont la longueur varie entre C_8 et C_{18}. Elle peut être ramifiée, contenir des noyaux aromatiques, des polyoxypropylènes, des perfluorates, des polysiloxanes (19).

Selon la nature et la longueur de la chaîne, les propriétés tensioactives changent. La partie hydrophile peut être de différentes natures, ce qui permet de classer les tensioactifs. On distingue (22) :

- Tensioactifs anioniques
- Tensioactif cationique
- Tensioactifs non-ioniques
- Tensioactifs zwitterioniques ou amphotères.

Les tensioactifs sont caractérisés physiquement par :

- La Balance Hydrophile-Lipophile (HLB), C'est une échelle numérique qui caractérise le degré d'hydrophilie ou de lipophilie d'un tensioactif. Elle représente le rapport entre les groupes hydrophiles (affinité pour l'eau) et les groupes lipophiles (affinité pour l'huile) présents dans la molécule du tensioactif (23). Les tensioactifs sont généralement classés en fonction de leur HLB (15) :

- **0 < HLB < 8** : Tensioactifs lipophiles, utilisés dans les applications où une certaine solubilité dans l'eau.
- **8 < HLB < 12** : Tensioactifs amphiphiles, utilisés dans les applications où une balance entre l'hydrophilie et la lipophilie.

- **12 < HLB < 20** : Tensioactifs hydrophiles, utilisés dans les applications où une forte solubilité dans l'eau.

La connaissance de la HLB d'un tensioactif est essentielle pour :

- Sélectionner les bons tensioactifs pour une application spécifique.
- Prédire le comportement d'un tensioactif dans un système colloïdal.
- Formuler des émulsions stables et efficaces.

- La concentration micellaire critique (CMC) : (24) Lorsque le tensioactif est en concentration suffisante, les molécules de tensioactif en excès s'auto associent en solution sous forme d'agrégats appelés micelles. La concentration à partir de laquelle un composé tensioactif s'auto associe sous forme de micelles en solution aqueuse est appelée concentration micellaire critique (CMC).

La valeur de la CMC est une caractéristique du tensioactif et dépend de la longueur de la chaîne lipophile et de la nature de la tête polaire. Par exemple les valeurs CMC des tensioactifs non-ioniques, sont plus basses que celles des tensioactifs ioniques de longueur de chaîne comparable. Mais la CMC dépend également de l'environnement physico-chimique : concentration en électrolytes ou température.

I. 2. 6. 3. Instabilité des émulsions

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables qui peuvent évoluer au cours du temps. Il existe cinq phénomènes d'instabilité qui peuvent survenir (fig. I.8).

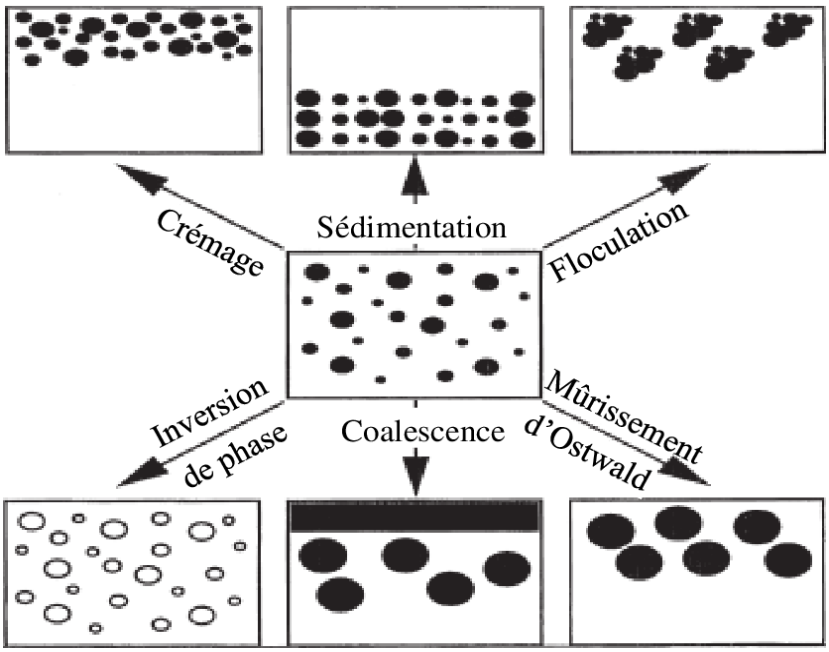


Fig. I. 8. Représentation schématique des divers procédés de déstabilisation (25).

- **Crémage ou sédimentation**

Le processus par lequel les gouttelettes d'émulsion tendent à migrer vers le haut du récipient est connu sous le nom de crémage(26). La montée de l'huile dans l'émulsion H/E est causée par la différence de densité entre les phases huile et eau, ainsi que par la gravité. C'est l'inverse de la sédimentation (27).

- **Floculation**

Ces interactions attractives provoquent l'agrégation des gouttelettes. Les forces de répulsion électrostatiques et le potentiel d'attraction de type Van der Waals sont responsables de l'énergie d'interaction entre les particules. Lorsque l'attraction est peu énergétique, ce phénomène peut être réversible ou irréversible (28).

- **Coalescence**

C'est la fusion irréversible des gouttelettes d'émulsion qui entraîne la formation d'une grande goutte, et l'émulsion se rompt complètement si la coalescence continue (29) (30).

- **Mûrissement d'Ostwald**

C'est un mécanisme irréversible de diffusion des molécules de la phase dispersée à travers la phase continue sans contact entre les gouttelettes, lié à la solubilité de la phase dispersée dans la phase externe. Des gouttelettes minuscules passent à de plus grandes (31).

- **Inversion de phases**

C'est un phénomène qui entraîne un changement de sens de l'émulsion, par exemple, une émulsion E/H en une émulsion H/E ou inversement. Elle est liée à la proportion de la phase dispersée, à la température et à d'autres facteurs, y compris la nature de la phase huileuse et la concentration des sels existants (32).

I. 2. 6. 4. Contrôle des émulsions

Contrôle macroscopique

Il consiste en l'examen visuel de la couleur, de l'homogénéité et de la consistance de l'émulsion (33).

Observation microscopique

Cette méthode permet d'évaluer la taille et la répartition des globules dans l'émulsion, notamment après exposition à différentes températures (34).

Détermination du type d'émulsion (H/E ou E/H)

Plusieurs techniques sont utilisées :

- **Méthode de dilution** : Si l'émulsion est miscible à l'eau, elle est de type H/E.
- **Méthode de coloration** : L'émulsion est H/E si elle se colore avec un colorant hydrosoluble, et E/H si elle se colore avec un colorant liposoluble.
- **Méthode de conductivité** : Une forte conductivité indique une phase continue aqueuse, donc une émulsion H/E (35).

Contrôle de l'homogénéité

Réalisé par observation au microscope entre lame et lamelle, il permet d'estimer la taille et la répartition des globules (36).

Contrôle de la stabilité

Il se base sur l'observation des phénomènes de sédimentation, de crémage, de coalescence ou de séparation des phases dans une éprouvette. Des essais à différentes températures et vitesses de centrifugation sont aussi utilisés. Les mesures rhéologiques dans le temps permettent de suivre l'évolution de la stabilité (37).

Détermination du pH

Le pH est mesuré à l'aide de papier indicateur ou d'un pH-mètre. Sa valeur est essentielle pour la conservation et la compatibilité cutanée (38).

Contrôle de la consistance

La viscosité est un paramètre suivi au cours du temps pour évaluer l'évolution de l'émulsion pendant le vieillissement (36).

Contrôle microbiologique

Les émulsions H/E, riches en eau, sont particulièrement sensibles à la contamination bactérienne. Un suivi microbiologique est donc indispensable (39).

I. 3. La chlorophylle

I. 3. 1. Définition

Les chlorophylles (fig. I.9) sont des pigments verts, présent dans tous les organismes photoautotrophes. Ce sont les pigments les plus important du processus photosynthétique, également appelé pigments photosynthétiques. Leur coloration verte est due au fait qu'ils absorbent fortement le bleu et le rouge alors qu'ils réfléchissent le vert. Dans les plantes supérieures, on retrouve deux types de chlorophylle, la chlorophylle a et la chlorophylle b.

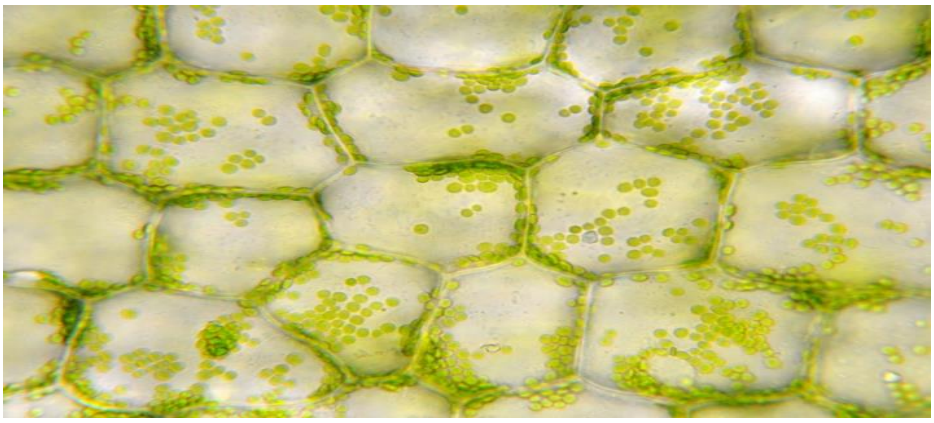


Fig. I. 9. La chlorophylle.

Il existe différentes formes de chlorophylles, dont les seules présentes chez les végétaux supérieurs sont la chlorophylle a et la chlorophylle b. Les autres formes (chlorophylles c et d) présentes chez certaines algues ou bactéries et sortent du cadre de notre étude.

La structure chimique des formes a et b de la chlorophylle est quasi identique, à l'exception d'une fonction aldéhyde située sur la chlorine (40).

I. 3. 2. Historique

La chlorophylle a été découverte en 1817 par les chimistes français Pelletier (1788–1842) et Caventou (1795–1877) (41), qui ont réussi à l'isoler des feuilles des plantes. Pelletier a

présenté les méthodes, basées sur l'utilisation de solvants doux, qui ont permis pour la première fois d'isoler non seulement la chlorophylle, mais des substances d'une grande importance pharmacologique telles que la caféine, la colchicine ou la quinine (41). IL existe 5 synonymes (sens proche) de "chlorophylle" :

- Bactériochlorophylle
- Chlorophylle a oxygénase
- Pigment
- Pigment naturel
- Pigment vert

I. 3. 3. Propriétés de Chlorophylle

- **Propriétés chimiques**

La chlorophylle est le groupement prosthétique d'une chromoprotéine. Elle est constituée de deux moitiés une tête formé d'une porphyrine et une longue queue d'hydrocarbures, ou phytol, une porphyrine est un groupement cyclique tétrapyrolique constitué de quatre noyaux, pyrole contenant un atome d'azote et disposé en cycle (Hopkins et al., 2003) (42).

Un atome central de magnésium (fig. I. 10) lie aux quatre azotes des noyaux pyrroles par deux valences et deux liaisons physiques. La chlorophylle b différent simplement de la chlorophylle a en ce que à un radical méthyle CH3 se substitué une fonction aldéhyde –COH (42).

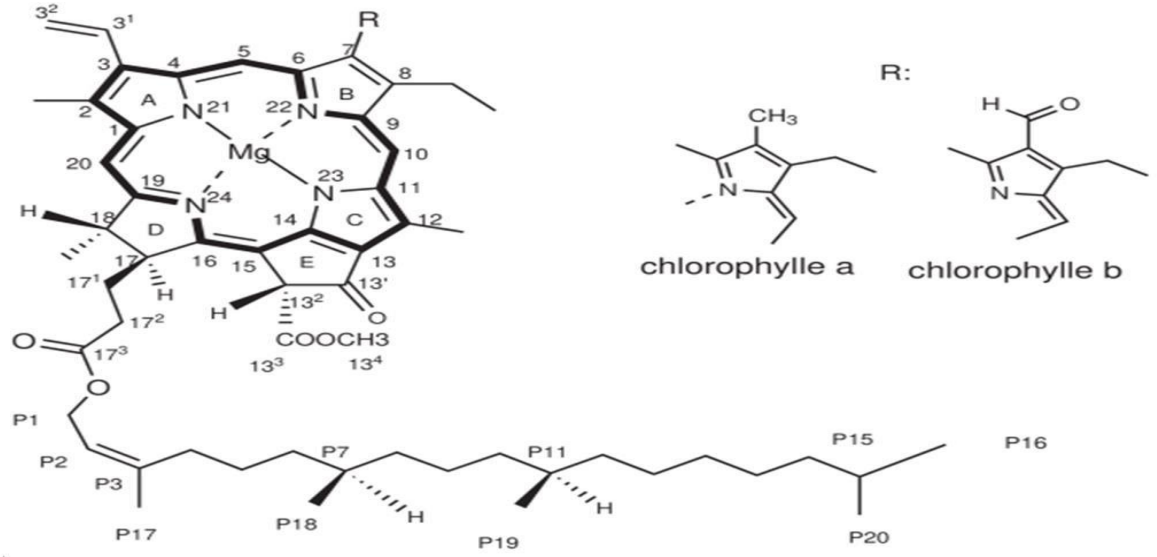


Fig. I. 10. Structure moléculaire des chlorophylles a et b (43).

- **Propriétés physiques**

Les chlorophylles sont solubles dans l'alcool et les solvants des lipides. Cependant la molécule de chlorophylle apparaît comme dipolaire avec une longue chaîne phytol de 2OA° (Angströms) hydrocarbonée et donc fortement hydrophobe et un noyau tetrapyrroliqye de 10A° qui est assez hydrophile malgré les groupements qui l'entourent (42).

Tableau I. 4. Caractéristique physico-chimique des chlorophylles a et b

	Chlorophylle a	**Chlorophylle b**
Formule chimique	C_{55} H_{72} O_5 N_4 Mg	C_{55} H_{70} O_6 N_4 Mg
Masse molaire (g.mol−1)	893.5	907.5

I. 3. 4. Action et utilisation de chlorophylle

La chlorophylle regorge de bienfaits. Ce petit pigment qui compose toutes les plantes, n'est pas seulement responsable de leur couleur verte, vertus détox, digestives, oxygénantes et stimulantes du système immunitaire. Parmi son avantage est (44).

- **La chlorophylle aide à la régénération du sang :** Comme l'hémoglobine, la chlorophylle permet de transporter l'oxygène dans le sang. Ainsi, elle va avoir plusieurs actions. Elle va stimuler la production des cellules sanguines (hémoglobines, globules rouges et globules blancs) et des cellules souches de la moelle osseuse. Elle favorise une bonne circulation sanguine et détoxifie le sang. Elle permet une bonne oxygénation des cellules et des tissus ce qui accélère la régénération cellulaire. Elle a aussi une action antianémique.
- **La chlorophylle a une action cicatrisante :** La chlorophylle protège la peau et les muqueuses des proliférations de microbes. Elle a une action antibactérienne naturelle et cicatrisante. Elle permet notamment d'éliminer les odeurs liées aux infections. Elle réduirait aussi l'acné sévère et les problèmes de peau.
- **La chlorophylle a une action anti-âge :** La chlorophylle contient des antioxydants, les caroténoïdes et les flavonoïdes, qui luttent contre les radicaux libres produits en cas de stress et lors du vieillissement de la peau.
- **La chlorophylle assainit le système digestif :** Elle nettoie le système digestif de la bouche au rectum. Elle améliore le transit à tous les niveaux et réduit l'acidité gastrique. Ainsi, fini les ballonnements, les gaz et les douleurs abdominales après les repas.

- **La chlorophylle a une action anti-inflammatoire :** La chlorophylle a un grand pouvoir sur l'acidité de l'organisme. Elle va normaliser le pH et maintenir un bon équilibre acido-basique ce qui lui confère une nature protectrice contre les maladies inflammatoires et douloureuses. Elle peut aussi aider en cas de règles douloureuses, irrégulières ou abondantes.
- **La chlorophylle réduit les mauvaises odeurs corporelles :** A la base, la chlorophylle permet aux végétaux de lutter contre les bactéries et les champignons. Elle agit un peu de la même façon dans l'organisme en réduisant la production de toxines. Ainsi, toutes les odeurs corporelles (cutanées, axillaires, plantaires, menstruelles et haleine) sont diminuées voire supprimées.
- **La chlorophylle améliore le système immunitaire :** 80% de notre système immunitaire réside dans nos intestins. La chlorophylle ayant un réel effet sur le système digestif, le système immunitaire s'en verra aussi améliorer et la vitalité boostée.
- **La chlorophylle protège l'organisme contre les toxiques :** La chlorophylle a un effet protecteur contre les molécules toxiques. Qu'ils s'agissent de celles produites par les phénomènes de combustion (gaz d'échappement, chauffage au bois, cuisson au gril...) ou des métaux lourds. Son noyau est capable d'emprisonner ces substances qui vont prendre la place du magnésium.
- **La chlorophylle a des bienfaits anti-cancer :** De récentes études universitaires américaines ont démontré que la chlorophylle permet de lutter contre certains cancers notamment ceux du foie, du côlon et du pancréas. Elle agirait comme un protecteur en neutralisant les agents cancérigènes et en facilitant leur élimination. Son puissant effet antioxydant lui permettant de combattre la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES EXPERIMENTALES

II. 1. Objectif du travail

L'objectif de ce travail est de développer une formulation de crème cicatrisante à base de chlorophylle destinée à une application topique. L'approche retenue repose sur la création d'une émulsion de type huile dans eau (H/E). Cette étude vise à caractériser les propriétés physicochimiques de la crème ainsi formulée et à comparer l'influence de la concentration de la chlorophylle (le principe actif) sur ces caractéristiques, en vue d'optimiser la formulation pour une efficacité cicatrisante maximale.

II. 2. Lieu de travail

Notre travail a été réalisé au niveau du Laboratoire des Sciences de la Matière (SM) de la Faculté des Sciences de l'Université de Médéa, ainsi qu'au Laboratoire de physico-chimie du groupement SAIDAL à Médéa. Cette étude a été réalisée selon les étapes suivantes :

- ✓ Extraction de la chlorophylle en utilisant différents solvants ;
- ✓ Screening phytochimique de l'extrait ;
- ✓ Evaluation de l'activité anti-inflammatoire, l'activité antimicrobienne et antioxydante ;
- ✓ La préparation de la crème cicatrisante et sa caractérisation.

II. 3. Matériel et produits

II. 3. 1. Equipements et matériel de laboratoire

- **Verrerie :** La verrerie utilisée (Tableau II.1) a été soigneusement nettoyée et séchée avant chaque manipulation.

Tableau II. 1. Liste de la verrerie utilisée

Mortier	**Fiole jugée**
Becher	**Spatule**
Erlenmeyer	**Boite pétrie**
Eprouvette graduée	**Ecouvillon**
Pipette graduée	**Flacons en verres**
Tubes à essais	**Bouteille en verre**
Entonnoirs	

- **Appareillage :** Les appareils utilisés sont présentés dans le tableau II. 2.

Tableau II. 2. Appareillage utilisée

Appareils	Marques
Micropipette	Accumax PRO
Etuve	MEMMERT
Agitateur magnétique et Plaque chauffante	VELP (SCINTIFICA)
Spectroscopie UV-Vis	PerkinElmer
Centrifugeuse	Ortoalresa
PH mètre	Infitek
Conductimètre	Infitek
Viscosimètre	BoHLIN VISCO
Bec bunsen	//
Thermomètre	//
Bain-marie	//
Microscope optique	OPTIKA

- **Réactifs et produits chimiques :** Les réactifs et les milieux utilisés sont présentés dans le tableau II. 3.

Tableau II. 3. Réactifs et milieux utilisés

Réactifs	Milieux de culture utilisés.
Ethanol, propylène glycol, glycérine, chlorure Ferrique, hydroxyde de sodium, l'acide anhydride, l'acide sulfurique, liqueur de Fehling, réactif de Folin-ciocalteu, carbonates de sodium, tampon phosphate PBS, solution hypo salin, l'acide gallique, l'eau distillée.	Gélose Nutritif (G.N), Milieu Mueller Hinton (M.H).

II. 3. 2. Le matériel biologique

- **Les souches bactériennes :** L'activité antimicrobienne de l'extraits de la chlorophylle a été testé contre :

  - *Escherichia coli* ATCC 8739
  - *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
  - *Bacillus Subtilis* ATCC 6633
  - *Salmonella typhimurium* ATCC14028

  Le matériel bactérien utilisé dans cette étude a été fourni par Laboratoire de Microbiologie de Service de Contrôle Qualité de groupe SAIDAL, Médéa. Ces souches de référence ont été conservées au réfrigérateur à 4°C.

- **Matériel végétal**

  Le matériel végétal utilisé dans cette étude est l'épinard (*Spinacia oleracea*), plante herbacée annuelle de la famille des Amaranthacées, est non seulement cultivé pour ses feuilles comestibles nutritives, mais il est également une source importante de chlorophylle. La chlorophylle, le pigment vert essentiel à la photosynthèse, est abondant dans les feuilles d'épinard, où elle capte la lumière pour convertir le dioxyde de carbone et l'eau en glucose et en oxygène. Ainsi, l'épinard, au-delà de sa valeur nutritionnelle, contient une concentration notable de ce pigment aux propriétés potentiellement bénéfiques pour la santé humaine. Sont commercialisés dans la wilaya de Médéa.



Fig. II.1. L'épinard (*Spinacia oleracea*) (45).

II. 4. Méthodes

II. 4. 1. Préparation de l'extrait végétal

L'extraction solide-liquide est une technique permettant de séparer les principes actifs contenus dans une matière végétale à l'aide d'un solvant approprié. Dans notre travail, différents solvants ont été utilisés à savoir : l'eau distillée, Acétone/Ethanol et Ethanol. Les conditions d'extraction sont présentées dans le tableau II. 4.

Tableau II. 4. Conditions de préparation de l'extrait végétal

Solvant	**matière végétale (g)**	**Volume du solvant** (ml)	Condition	Temps
Eau distillé	10	100	Laisser macérer à T° ambiante et à l'obscurité	48h
Acétone/Ethanol		25/75		
Ethanol		100		

Après la macération, une filtration, à l'aide d'un entonnoir et d'un papier filtre pour éliminer les résidus solides, a été réalisée.

Le filtrat obtenu est ensuite concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif (fig. II. 2) pour évaporer l'éthanol. Cela permet d'obtenir un mélange de pigments riche en chlorophylle, sous forme légèrement visqueuse.

II. 4. 2. Rendement d'extraction

Le rendement en extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait brut obtenu et la masse du matériel végétal traité en gramme. Ce rendement est calculé via l'équation suivante :

$$R\ (\%) = (M/M0)\ x100$$

R (%) : Rendement exprimé en % ;

M : Masse en (g) de l'extrait sec résultant ;

M0 : Masses en (g) de la matière végétale initiale utilisée pour l'extraction.



Fig. II. 2. Rota-évaporateur (photo originale) (Ghernaout et Moussouni, 2025)

II. 4. 3. Caractérisation physico-chimique de l'extrait préparé

II. 4. 3. 1. Dosage des pigments chlorophylliens : chl (a, b) (mg/gMF)

L'extraction de la chlorophylle est faite suivant la méthode de Mac Kiney (1941) (46) et Arnon (1949) (47). Elle consiste en une macération des feuilles dans un mélange d'acétone et d'éthanol à des proportions respectives de 75% et 25%. Cent milligramme (100 mg) de matière fraîche (feuilles) auxquelles sont ajoutées 10 ml de la solution d'extraction sont conservées dans des boites noires afin d'éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière. Après 48h, la densité optique est mesurée aux longueurs d'ondes 663nm et 645nm correspondant respectivement aux chlorophylles (a) et (b). Les résultats sont exprimés en mg/g de MF et les concentrations en chlorophylle (a) et (b) sont déterminées à l'aide des équations suivantes :

Chl. (a) mg/g MF = $[12,7DO_{663} - 2,69DO_{645}] \times 0,1$

Chl. (b) mg/g MF = $[22,9DO_{645} - 4,69DO_{663}] \times 0,1$

Chl. Total mg/g MF = $7.5DO_{663} + 18.71DO_{645}$

II. 4. 3. 2. Détermination de l'indice de réfraction

La mesure a été effectuée directement à l'aide d'un réfractomètre. Après avoir ajusté la ligne horizontale, les résultats apparait immédiatement.

II. 4. 3. 3. Détermination de pH et de la conductivité

La mesure de pH et de la conductivité à température ambiante a été réalisée par le trempage directe de la sonde du pH mètre et conductimètre (fig. II. 3) dans l'extrait à caractériser.



Fig. II. 3. Appareil multi paramètres de paillasse pour la mesure du pH et de la conductivité (photo originale) (ghernaout. Moussouni, 2025)

II. 4. 3. 4. Screening phytochimique

L'objectif de la réalisation des tests phytochimiques est de détecter les différentes familles des métabolites secondaires existant dans la chlorophylle extraite par les différents solvants, par des réactions qualitatives, caractérisé par la formation d'une coloration correspondante à la réaction. Nous avons utilisé la méthode de Haddouchi et ses collaborateurs (2016) (48).

- **Test des Tanins**

  On ajoute à 2 ml de l'extrait, 1 à 2 gouttes de solution de chlorure ferrique ($FeCl_3$) diluée à 0,1%. L'apparition d'une coloration vert foncé indique la présence des tanins condensés ou bleu vert indique la présence des tanins hydrolysables.

- **Test des quinones**

  À 2 ml de l'infusé, on ajoute quelques gouttes de NaOH à 10%. Le virage de la couleur de la phase aqueuse au jaune, rouge ou violet témoigne de la présence des quinones.

- **Test des composés réducteurs**

  Introduire 1 ml d'extrait dans un tube à essai, ajouter 1 ml de liqueur de Fehling et incuber l'ensemble 8 min au bain marie bouillant. L'apparition d'un précipité rouge brique indique la présence des composés réducteurs.

- **Test des terpénoides**

  La détection des terpénoides est mise en évidence en mélangeant 2 ml d'extrait avec 2 ml d'acide anhydride, puis par l'ajout de 1ml d'H_2SO_4 au fond de tube sans agitation. La formation d'une coloration brune rougeâtre à l'interface du l'extrait révèle la présence des terpénoides.

II. 4. 3. 5. Dosage des polyphénols totaux

Principe

La méthode est celle utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximale est comprise entre 700 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphenols présents dans les extraits végétaux (49).

Mode opératoire

Les polyphénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie en utilisant le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu, suivant le protocole appliqué en 2006 par Wong et ses collaborateurs(50). Dans des tubes à essai introduire 0.1 ml de chaque extrait est mélangé avec 100 µl d'une solution de Folin ciocalteu (10 fois dilué).

- ✓ Agitez et laissez reposer 5 minutes
- ✓ Ajoutez 2ml d'une solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 2%
- ✓ Laissez reposer pendant 30 minutes à la température ambiante
- ✓ La lecture est faite à 725 nm contre un blanc

La courbe d'étalonnage (voir annexe) est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations (0- 500 µg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique ou d'acide tannique par g poids de l'extrait (mg EAG/g EXT), (mg EAT/g EXT).

II. 4. 3. 6. Dosage des flavonoïdes totaux

Principe

Le dosage des flavonoïdes d'extrait a été réalisé selon la méthode de Bahorun et ces collaborateurs (1996) (51). Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Fe^{+2}, Al^{+2}), Ceci traduit le fait que le métal perd 2 électrons pour s'unir à 2 atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. La couleur jaune produite possède une absorbance maximale à 430 nm, l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait (52) (Ribéreau-Gayon, 1968).

Mode opératoire

- ✓ Dans des tubes à essais introduire 0.1 ml de l'extrait auquel sont ajouté 2 ml d'eau distillée
- ✓ Ajoutez 150 µl d'une solution de nitrite de sodium ($NaNO_2$) à 5 %
- ✓ Laissez reposer pendant 5 minutes
- ✓ Ajoutez 150 µl de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$, 6 H_2O) à 10%
- ✓ Laissez reposer pendant 6 minutes
- ✓ Ajoutez 2 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4%
- ✓ Le volume total est complété à 5 ml avec de l'eau distillée
- ✓ La lecture est faite à 510 nm contre un blanc

La courbe d'étalonnage (voir annexe) est effectuée par la quercétine à différentes concentrations (0- 300 µg/ml), dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. Les résultats sont ainsi exprimés en mg d'équivalent de quercétine par g poids sec de l'extrait (mg EQ/g EXT).

II. 4. 3. 7. Evaluation de l'activité biologique de l'extrait

II. 4. 3. 7. 1. Evaluation de l'activité antioxydant

Principe

Le principe de cette méthode a été conceptualisé par Blois en 1958, qui a montré pour la première fois que les radicaux libres peuvent être piégés par des molécules antioxydants. Le DPPH est un radical stable en solution qui apparaît de couleur violette et absorbe à 515 nm dans l'éthanol. Ce test repose sur le principe que le radical DPPH, lorsqu'il accepte un atome d'hydrogène (H) de la molécule antioxydant piégeuse, est réduit en DPPH2, entraînant une réduction de la couleur violette en jaune avec une diminution concomitante de l'absorbance à 515 nm (53) (fig. II. 4).

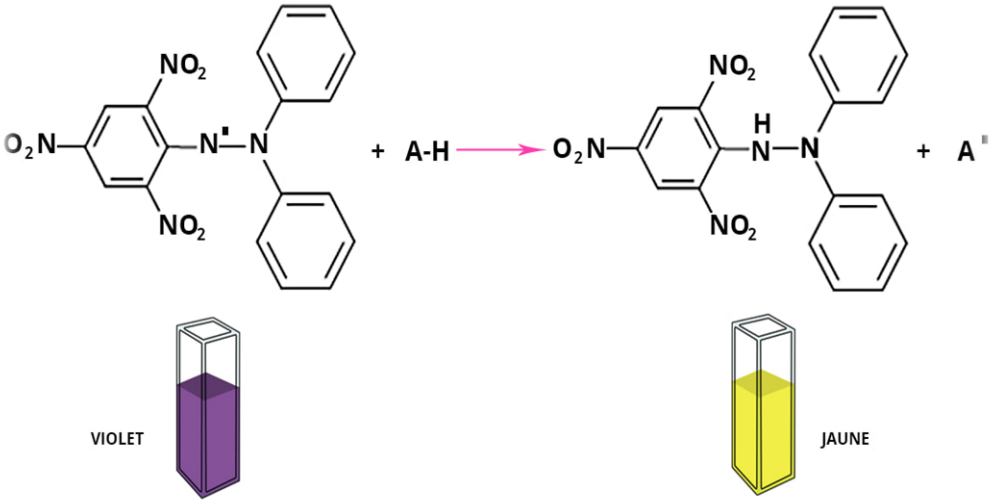


Fig. II. 4. Mécanisme réactionnel de test DPPH

Mode opératoire

Le pouvoir antiradicalaire a été testé en utilisant le protocole employé par Bouaziz et ses collaborateurs(51) .Cette méthode comprend les étapes suivantes :

- ✓ Une solution alcoolique de DPPH˙ a été préparée en dissolvant 4 mg de ce produit dans 100 ml d'éthanol.
- ✓ Ensuite 2 ml de cette solution de DPPH ont été ajoutés à 1ml de solution d'extrait à différentes concentrations (0- 500mg/ml)
- ✓ Après agitation au vortex, les tubes ont été laissés dans l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes.
- ✓ La lecture des absorbances a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à la longueur d'onde λ=517nm (longueur d'onde d'absorption du DPPH°).
- ✓ Le blanc a été représenté par les solvants et le contrôle a été préparé en mélangeant 1ml de solvant de l'extrait et 2ml de solution de DPPH.

L'acide ascorbique est un antioxydant de référence, a été utilisé comme témoin Positif. L'activité antioxydant d'un extrait est caractérisée par la valeur de l'IC50 (Concentration permettant d'obtenir 50% d'inhibition) ; une faible valeur de l'IC50 correspond à une forte activité antioxydant. La valeur du pourcentage d'inhibition est donnée par la formule suivante :

A%= (Abs control –Abs échantillon) / Abs control x 100

A% : Pourcentage d'inhibition

Abs control : L'absorbance du control

Abs échantillon : L'absorbance de l'échantillon.

IC50 : Concentration en antioxydant nécessaire pour réduire 50% du DPPH initial

II. 4. 3. 7. 2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Les tests de sensibilité et résistance antimicrobienne ont été effectués selon la méthode de diffusion sur milieu solide (54).

Le principe de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes consiste à réaliser une culture microbienne sur milieu Muller- Hinton (MH), en présence de disques imbibés d'extrait de plante. Si ces derniers ont une activité antimicrobienne, on observera une zone d'inhibition autour du disque. Cette étude est réalisée selon les étapes suivantes :

1- **Revivification des souches**

La revivification des souches a pour objectif l'obtention d'une culture jeune et pure. Elle consiste à ensemencer en stries quelques colonies de souches conservées à la surface de la gélose préalablement coulée et solidifiée dans des boites de pétri. Les boites de pétri renfermant chacune une souche microbienne, sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

2- **Préparation de l'inoculum**

Pour préparer l'inoculum, on prélève 4 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture de 18h, sur le milieu d'isolement puis déchargées dans de l'eau physiologique stérile (fig. II. 5). La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée à l'aide d'un vortex et sa turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland, soit une densité optique comprise entre 0,08 et 0,12 ; lue à une longueur d'onde de 625 nm correspondant à (10^6 à 10^8UFC/ml).

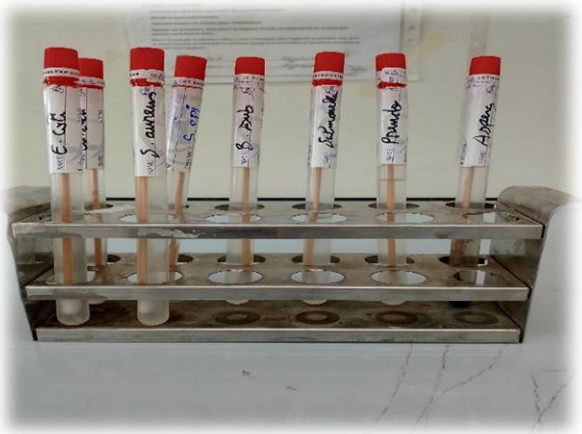


Fig. II. 1. Préparation de l'inoculum (la suspension bactérienne) (Photo originale) (Ghernaout, Moussouni, 2025)

3- Ensemencement par écouvillonnage

L'écouvillon stérile, trempé et agité dans la suspension bactérienne, préalablement préparée, est essoré sur la paroi de tube à essai. L'ensemencement consiste en l'étalement par écouvillonnage d'un milieu Muller Hinton (fig. II. 6). L'écouvillon doit passer 2 à 3 fois sur toute la surface de manière à obtenir un ensemencement homogène et une culture abondante. Laisser sécher les boîtes 10 minutes avant de déposer les disques.



Fig. II. 2. Ensemencement par écouvillonnage de la suspension bactérienne (Photo originale) (Ghernaout et Moussouni, 2025)

4- Préparation des disques

Dans cette étude, on a utilisé le papier Wattman N°1, coupé en disques de 6 mm, qui doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer.

Les disques, préalablement imbibés de 10µl de chaque solution d'extrait de chlorophylle (brut et diluée) ont été déposé stérilement à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose Muller–Hinton ou la gélose Sabouraud. Les boites de pétri sont placées à basse température (+4°C) pendent 2h afin de permettre aux extraits de diffuser dans la gélose avant que les bactéries ne commencent à se multiplier ; Retirer les boites du réfrigérateur et les placer à l'étuve, à la température optimale de croissance du germe à étudier (généralement 37°C pour les bactéries et 25°C pour les champignons) pendent le temps nécessaire en fonction du microorganisme étudié.

5- Lecture des résultats

Après 24 heures d'incubation, mesurer à l'aide d'un compteur automatique de colonies (fig. II. 7) le diamètre de la zone d'inhibition des bactéries auteur des disques. Le diamètre (mm) de la zone entourant le disque est proportionnel à la sensibilité du germe vis- à- vis l'extrait végétal.



Fig. II. 3. Compteur automatique de colonies (photo originale) (Ghernaout et Moussouni, 2025)

II. 4. 3. 7. 3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire In – vitro

- ✓ **Echantillons de sang humain**

Des échantillons de sang frais (environ 6ml) ont été récupérés dans des tubes héparinisés, à partir du laboratoire du SM où la prise de sang a été effectuée, sur des volontaires (20- 25 ans) n'ayant pas pris de médicaments anti-inflammatoires, durant les deux dernières semaines avant le prélèvement.

- ✓ **Préparation du phosphate buffered saline (PBS)**

Pour préparer la solution tampon de PBS à pH=7,4, nous avons utilisé les composés suivants avec les concentrations qui leurs correspondent : K_2HPO_4 (8ml) ; KH_2PO_4 (2ml) ; KCl (2,7Mm) ; NaCl (137ml) (Mohan, 2006).

- ✓ **Préparation de la suspension des globules rouges humains**

Les échantillons de sang récupérés ont été centrifugés à 3000rpm, pendant 10min. Le surnageant est, par la suite, éliminé et le culot de globules rouges a été lavé trois fois avec de l'eau physiologique, jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair, en centrifugeant à chaque fois à la vitesse 3000 rpm, pendant 5 min. Le volume de globules rouges a été mesuré afin de préparer une suspension de 10% (v/v) de globules rouges humains, avec de l'eau physiologique.

- ✓ **Evaluation de l'activité hémolytique (la toxicité des extraits vis- à- vis des globules rouges)**

Le test d'effet hémolytique des extraits végétaux étudiés est réalisé selon la méthode de Haddouchi et ses collaborateurs (2016)(48). Dans des tubes à hémolyse, 20µl de chaque extrait est ajouté à 1980µl de la suspension érythrocytaire préparée. Ces tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 60 minutes. Après l'incubation, des prélèvements de 250µl sont réalisés pour chaque tube pour être repris dans 750µl de PBS ; la mixture obtenue est mélangée délicatement et mise dans un bain glacé pour arrêter la réaction, puis centrifuger à 2500 tours/min durant dix minutes (fig. II. 8).

La lecture des absorbances est effectuée à 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, nous avons préparé un tube d'hémolyse totale (témoin positif) qui contient 100µl de la suspension érythrocytaire et 1900µl d'eau distillée et un tube témoin négatif composé de 250µl de la suspension érythrocytaire et de 750 µl de PBS.

Nous avons utilisé l'acide gallique comme molécule de référence avec les mêmes démarches expérimentales que les extraits des plantes.

Le taux d'hémolyse de différents extraits est calculé par rapport à l'hémolyse totale, après 60 minutes d'incubation selon la formule suivante :

Taux d'hémolyse (%) = (DO extrait – DO témoin négatif) /DO témoin positif

- ✓ **Evaluation de l'effet des extraits sur la stabilisation de la membrane des globules rouges**

Le test se base sur l'effet des extraits de la plante étudiée sur la stabilisation des érythrocytes, après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique associée à une température élevée, selon le protocole de Ganesh-Gadamsetty et al., 2013 (55).

Dans des tubes à hémolyse, 0.5 ml d'extraits végétal (chlorophylle), 1.5 ml du tampon phosphate (0.15 M, pH 7.4) et 2 ml de la solution hyposaline (NaCl à 0.36 %) ont été mélangés et incubés, à 37°C pendant 20 min. Par la suite, un volume de 0.5 ml de la suspension des érythrocytes (10%) a été rajouté pour chaque tube, enchainé d'une incubation, à 56°C pendant 30 min. Les tubes ont été mis dans de l'eau froide pendant 20 min, afin d'arrêter la réaction ensuite centrifugé, à 3000 rpm pendant 5 min. La lecture d'absorbance du surnageant est faite à 560 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre, Le contrôle consiste en un mélange de 2ml de la solution hyposaline, 2 ml du tampon PBS, 0.5 ml de la suspension de globules rouges et 0.5ml d'eau physiologique.

Le diclofénac est utilisé comme molécule de traitement anti-inflammatoire, avec les mêmes concentrations que l'extrait. Le pourcentage d'hémolyse a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = [(Ac - At) / Ac] * 100$$

A_C : absorbance de control

A_t : absorbance de l'échantillon (test)

II. 4. 4. Formulation de la crème cicatrisante

II. 4. 4. 1. Préparation des émulsions

Dans le but d'obtenir une crème contre les brulures et la cicatrisation, nous avons préparé 4 formules d'émulsions de type Huile/Eau (H/E), dont les compositions sont détaillées dans le tableau ci-après (Tableau II. 5).

Tableau II. 5. Les ingrédients utilisés dans la préparation de la crème cicatrisante

La phase	Ingrédient	Principales Caractéristiques	Quantité (g)
La phase aqueuse (Phase A)	Eau distillée	Pure et exempte de germes	57,9
	Glycérine	✓ Protection et barrière contre les agressions ✓ La restauration des défenses naturelles. ✓ Hydratant (le Hir, 2009).	03,0
La phase huileuse (Phase B)	Huile de coco	C'est une huile hydratante, nourrissante et réparatrice. Elle est très facilement absorbée par la peau.	10
	Huile d'olive	Riche en vitamines, notamment A, C et D, qui apportent de l'énergie. Elle hydrate la peau.	13
	Huile d'argan	Riche en antioxydants. Elle a un effet des vertus cicatrisantes. Elle permet également d'apaiser les irritations de la peau.	3
	Beurre de karité	Hydratante pour la peau.	2
	Cire d'abeille	Propriétés antibactériennes.	2
	Emulsifiants		
	Conservateurs		
Les additifs (Phase C)	Antioxydant	" la vitamine E" permet de préserver les huiles végétales du rancissement. En plus, elle présente un rôle très intéressant sur la peau et particulièrement recommandé	0.2

		pour les soins réparateurs après-soleil.	
Principe actif	Chlorophylle	La chlorophylle est favorisée la réparation et la cicatrisation des tissus avec des capacités antioxydants et anti-inflammatoires.	0 (crème 1) 1 (crème 2) 2 (crème 3) 3 (crème 4)

Mode opératoire

Pour préparer 100g d'émulsions, on a procédé par la méthode d'émulsification à chaud selon le diagramme présenté dans la figure II. 8.

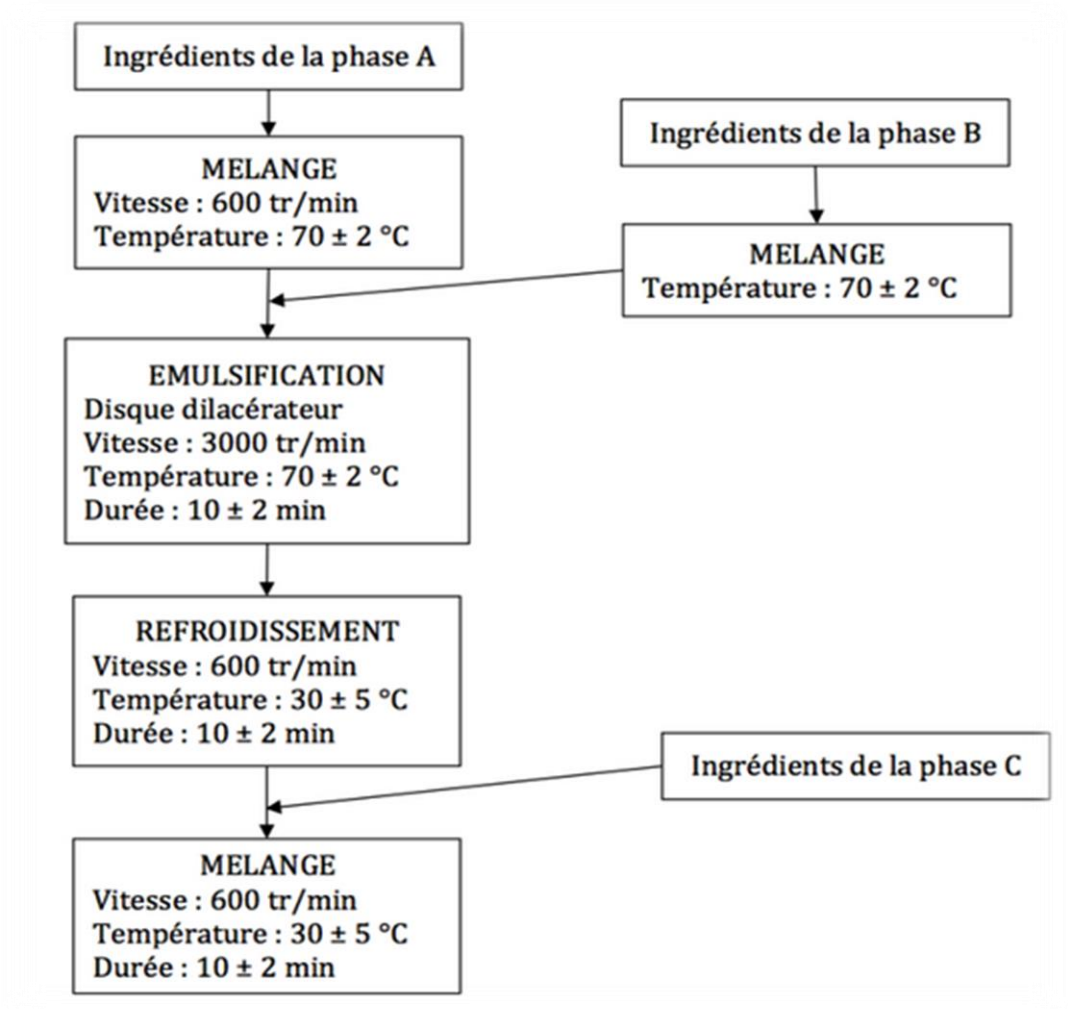


Fig. II. 4. Les étapes de préparation d'une émulsion (56)**.**

II. 4. 4. 2. Caractérisation des émulsions

1) Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des émulsions est une caractéristique importante qui peut influencer la perception visuelle et l'acceptabilité des produits par les consommateurs. Les émulsions étudiées ont été observé à l'œil nu pour évaluer leurs apparences générales, telle que la couleur, la texture, la brillance, la transparence et l'uniformité, directement après la formulation.

2) Aspect microscopique

La microscopie optique est une technique très performante pour la caractérisation des systèmes colloïdaux dont la taille est supérieure à 200 nm. Elle permet d'obtenir des informations, certes qualitatives, mais souvent essentielles à la compréhension générale des systèmes. Cette technique permet d'évaluer la taille des gouttes, d'observer leur forme, d'estimer les dispersions de tailles, de déterminer l'état d'agrégation, et d'identifier certaines instabilités comme la coalescence ou l'inversion de phase.

Pour effectuer cette analyse, une goutte d'émulsion est déposée sur une lame en verre et recouverte d'une lamelle, puis soumise au contrôle microscopique (fig. II. 9).

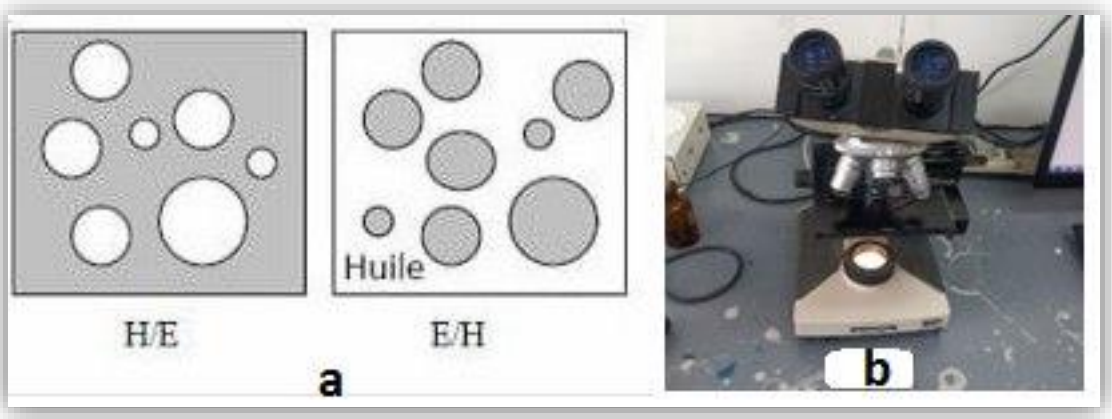


Fig. II. 5. (a) Le résultat que nous devrions obtenir ; (b) Le microscope utilisé (photo originale) (Ghernaout et Moussouni,2025)

3) pH des émulsions

La mesure du pH doit être déterminée par potentiométrie à l'aide d'un pH mètre digital. Le pH est déterminé sur une solution à 1% des émulsions dans l'eau distillée, à température ambiant.

4) Sens de l'émulsion

Pour déterminer le sens de l'émulsion, on a utilisé les trois méthodes :

✓ **Méthode par dilution**

Cette méthode consiste tout simplement à introduire une certaine quantité d'émulsion dans l'eau ou dans de l'huile et à chercher dans quel cas l'émulsion se dilue plus facilement.

- Si l'émulsion forme avec l'eau une dispersion homogène, il s'agit d'une émulsion à phase continue aqueuse. Si l'émulsion ne se mélange pas, il s'agit d'une émulsion H/E.
- Si l'émulsion forme avec l'huile d'olive une dispersion homogène, il s'agit d'une émulsion H/E, Si l'émulsion ne se mélange pas, il s'agit d'une émulsion E/H (57)

✓ **Méthode de Coloration au bleu de méthylène**

Cette méthode consiste à ajouter à l'émulsion soit un colorant hydrosoluble tel que le bleu de méthylène, soit un colorant liposoluble tel que le rouge Soudan ou orange du méthyle puis à observer la diffusion du colorant dans la préparation dans une microscope.

- Si l'émulsion est du type H/E, la coloration se propage dans l'émulsion,
- Si elle est du type E/H, elle ne s'étend pas (fig. II. 10).

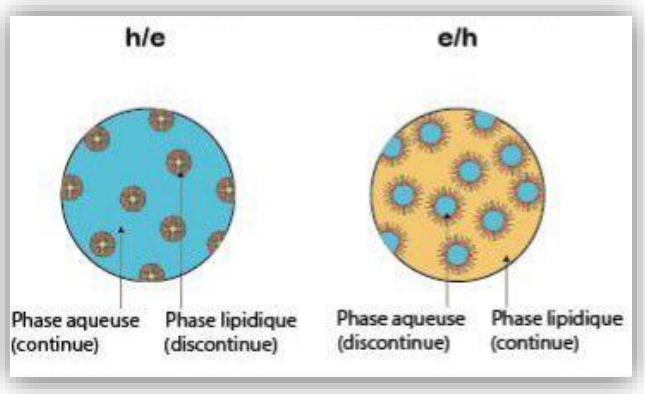


Fig. II. 6. Détermination du sens de l'émulsion par la méthode des colorants(58).

5) Détermination de la conductivité

La conductivité électrique de l'émulsion est celle de sa phase aqueuse. Une émulsion du type H/E est plus conductrice que sa phase aqueuse tandis que celle du type E/H est beaucoup moins conductrice. La conductivité de la préparation a été mesurée à température ambiante (environ 25°C) en utilisant un conductimètre et elle est exprimée en µS/cm .

6) Stabilité mécanique des émulsions

La stabilité mécanique des émulsions ou à la centrifugation est un test commun utilisé pour évaluer la stabilité des émulsions. La centrifugation est utilisée pour simuler les forces de séparation qui peuvent se produire pendant le stockage des émulsions.

Une émulsion stable ne doit pas montrer de séparation significative après la centrifugation. Si l'émulsion est instable, elle peut subir une séparation partielle ou complète, ce qui peut entraîner une perte de qualité du produit.



Fig. II. 17. Centrifugeuse (photo originale) (Ghernaout et Moussouni, 2025)

7) Etude la viscosité de la crème

La mesure de la viscosité des peut être effectuée à l'aide d'un viscosimètre. La viscosité des crèmes peut varier en fonction de la température, de la composition de la crème et de la méthode de préparation utilisée (59). Il est important de mesurer la viscosité des crèmes pour s'assurer que sa consistance est appropriée pour son application et pour garantir sa qualité.

Pour mesurer la viscosité des crèmes obtenues, on a utilisé un viscosimètre à mobile tournant. Permettant ainsi d'obtenir la viscosité apparente, qui représente la contrainte de cisaillement divisée par la déformation de cisaillement (60).

L'évaluation de la viscosité apparente en fonction de la vitesse de rotation pour les crèmes préparées a été effectuée à différentes vitesses de cisaillement à l'aide d'un viscosimètre à mobile tournant (fig. II. 12).

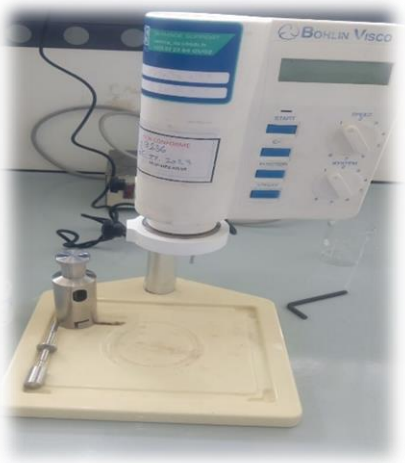


Fig. II. 8. Viscosimètre à mobile tournant (BOHLIN VISCO) (Ghernaout et Moussouni,2025)

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

L'objectif de ce travail est de développer une crème cicatrisante destinée à une application topique, en utilisant exclusivement des ingrédients d'origine naturelle, y compris l'émulsifiant et l'agent conservateur. Chaque formulation a fait l'objet d'une caractérisation afin d'évaluer ses propriétés physico-chimiques. Les résultats obtenus sont présentés dans ce chapitre selon l'ordre des analyses effectuées, accompagnés d'interprétations appropriées.

III.1. Rendement de l'extraction

Les rendements d'extraction, obtenu, dans notre étude varient considérablement selon le solvant utilisé, comme illustré dans le tableau III. 1. L'extrait éthanolique a donné le rendement le plus élevé (85,89 %), suivi du mélange acétone/éthanol (77,12 %), alors que l'extrait aqueux a présenté le rendement le plus faible (73,45 %)

Cette variabilité peut s'expliquer par plusieurs facteurs interdépendants, notamment : la composition chimique de la matrice végétale**,** la polarité des solvants employés**,** les paramètres opératoires (température, durée, mode d'extraction), ainsi que les conditions de culture de la plante (climat, nature du sol) et les modalités de stockage de la matière première. Ces résultats rejoignent ceux rapportés par **(**Wu et al, 2011 **;** et al, 2016)(61). Qui ont montré que le rendement d'extraction est fortement influencé par ces éléments, en particulier lors de l'extraction de composés bioactifs tels que les phénols et les flavonoïdes.

Tableau III. 1. Rendements et caractères organoleptique des extraits végétaux préparés

Le poids du matériel végétal en (g)	Les solvants	Le caractère organoleptique	Le Rendement en (%)
12.5	Acétone / éthanol	Un liquide de couleur vert foncé avec une odeur de l'épinard	77 ,12
	Éthanol		85,89
	Eau distillé	Un liquide de couleur vert clair avec une odeur de l'épinard	73,45

Le tableau III. 1, montre que l'éthanol pur a donné le rendement d'extraction le plus élevé (85,89%), en raison de sa bonne solubilité des pigments lipophiles et de sa capacité à pénétrer les matrices végétales sans les dégrader. Le mélange acétone/éthanol présente un

rendement légèrement inférieur (77,12 %), probablement dû à une volatilisation partielle et une dégradation oxydative. Enfin, l'eau distillée affiche un rendement relativement élevé (73,45%) mais trompeur, car la chlorophylle est peu soluble dans l'eau ; ce rendement pourrait refléter la présence de composés dégradés ou de pigments accessoires

III. 2. Screening (Criblage) phytochimique

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions, sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau III. 2.

On remarque la présence des tanins, des quinones, des flavonoïdes et les terpénoides dans l'extrait éthanolique et que l'extrait éthanol/acétone contient seulement les tanins et terpénoides alors que l'extrait aqueux contient une faible quantité des quinones et flavonoides, seulement.

Le tableau III. 2, montre l'absence des composés réducteurs dans les trois extraits préparés.

Tableau III. 2. Screening des constituants chimique des chlorophylles

Test	**Réactifs**	**(a)Par acétone/éthanol**	**(b) Par éthanol**	**(c) Par L'eau**
Les tanins	$Fecl_3$	+++	+++	-
Les quinones	NaOH	----	+++	+
Les Terpenoides	Chloroforme + H_2SO_4	+++	++	--
Les Flavonoïdes	HCL + magnésium	--	+++	+
Les composés réducteurs	Liquide de Fehling	- - -	-	- - -
++ : forte quantité ; ++ : moyenne quantité ; + : faible quantité ; - : absence totale				

Le solvant éthanolique pur est le plus performant pour l'extraction des composés phytochimiques bioactifs, incluant flavonoïdes, quinones, tanins et terpènes. Le mélange éthanol/acétone est moins sélectif, limitant l'extraction à des molécules moyennement polaires. L'extrait aqueux est le moins riche, n'extrayant que faiblement les flavonoïdes et quinones. Aucun des extraits ne contient de composés réducteurs détectables, ce qui peut influencer leur potentiel antioxydant direct.

A la base des résultats du criblage phytochimique on a décidé de continuer notre travail avec l'extrait éthanolique de la chlorophylle non seulement à cause de sa richesse en métabolites actives mais à cause de la faible nocivité de l''éthanol pour la santé humaine donc ce qui le rend plus adapté à des applications alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques, là où l'acétone est souvent proscrite.

III. 3. Caractéristiques physicochimiques

Les résultats des caractéristiques physico-chimiques de chlorophylle sont présentés dans le tableau III. 3.

Tableau III. 3. Les caractéristiques physico-chimiques

Paramètre	pH	La conductivité (µS/cm)	L'indice de réfraction
Résultat	6,52	406	1,23

L'extrait éthanolique de la chlorophylle présente un pH de 6,52, compatible avec une bonne stabilité pigmentaire et une préservation du magnésium central de la molécule. La conductivité mesurée à 406 µS/cm indique la présence d'ions dissous, probablement d'origine végétale ou résiduelle du solvant, sans impact majeur sur la qualité de l'extrait. L'indice de réfraction de 1,23 suggère soit une faible concentration en composés organiques, soit un effet de dilution.

III. 4. Dosage des pigments chlorophylliens : chl (a, b) (mg/gMF)

Les résultats obtenus indiquent une concentration de 21,45 µg/mL pour la chlorophylle a, 30**,**54 µg/mL pour la chlorophylle b et une teneur de la chlorophylle totale de 53,03 µg/mL. Il est à noter que la chlorophylle b est présente en quantité plus importante que la chlorophylle

a, ce qui peut refléter une adaptation physiologique de la plante à des conditions d'éclairage réduites, où la chlorophylle b joue un rôle plus actif dans la capture de la lumière bleue (Nasir et al., 2010)(62), une extraction sélective, ou une variation variétale.

III. 5. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée par spectrophotométrie à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait frais (mg EAG/g E), en se basant sur l'équation de régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique comme molécule étalon (voir annexe). Les résultats obtenus sont présents dans le tableau III. 4.

Tableau III. 4. Dosage de polyphénols totaux en (mg EAG/g E)

	Concentration de polyphénol (mg EAG/g E)
Extrait b (éthanolique)	48,06

D'après les résultats obtenus, la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait est de 48,06 mg EAG/g E. Ce taux est légèrement supérieur à celui rapporté par Benhasine et al. (2018) (62)**,** qui ont trouvé une concentration de 41,32 mg EAG/g dans un extrait méthanolique de feuilles de Beta vulgarisé. De même, une autre étude réalisée par Boudiaf et al. (2020) (62) a rapporté une teneur de 39,75 mg EAG/g dans un extrait hydro-alcoolique de la même espèce. Par ailleurs, nos résultats demeurent inférieurs à ceux obtenus par Elshaer et al. (2022) (62)**,** qui ont évalué la teneur en polyphénols totaux dans un extrait de *Saussurea costus* et ont rapporté une valeur de 88,17 mg EAG/g. L'étude réalisée par Godínez-Santillán et ses collaborateurs (2020) (63),en utilisant le mélange éthanol/eau (80:20) avec les feuilles de *Cnidoscolus aconitifolius* brutes, le même mélange avec chauffage et le même mélange dans une proportion 50 :50, leur a permis d'obtenir 67.3 mg EAG/g d'extrait de feuille, 65.7 mg EAG/g d'extrait de feuille et 53.8 mg EAG/g d'extrait de feuille (63).

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait éthanolique des feuilles d'épinards algériens a été estimée à 48,06 mg EAG/g d'extrait, ce qui reflète une concentration modérée en composés antioxydants. Ce résultat suggère un potentiel bioactif intéressant, notamment dans des formulations visant la protection contre le stress oxydatif, la préservation cellulaire ou encore la cosmétique naturelle. Le choix de l'éthanol comme solvant a permis une extraction efficace des principaux polyphénols, notamment des flavonoïdes et des acides phénoliques**.**

III. 6. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes totaux a été réalisée par la méthode colorimétrique utilisant le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait brut (mg EQ/g ES), sur la base de la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine comme molécule de référence (voir annexe).

L'analyse a révélé une teneur en flavonoïdes totaux de 24,88 mg EQ/g ES dans l'extrait étudié. Cette valeur se situe au-dessus de celle obtenue par Mellah et al. (2016**)** (63), qui ont trouvé 15,60 mg EQ/g dans un extrait aqueux de Beta vulgaris cultivé dans la région de Tizi-Ouzou (63).

Cette teneur confirme que l'épinard est une source notable de flavonoïdes, des composés phénoliques connus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et protectrices contre le stress oxydatif (64).

Les flavonoïdes présents dans les épinards incluent principalement des glycosides de flavonols et de flavanols, qui contribuent à la capacité antioxydante globale de la plante.

Une telle concentration est en cohérence avec les valeurs rapportées pour d'autres extraits de légumes à feuilles vertes, bien que la teneur puisse varier selon la méthode d'extraction, la variété et l'état de la matière première (65).

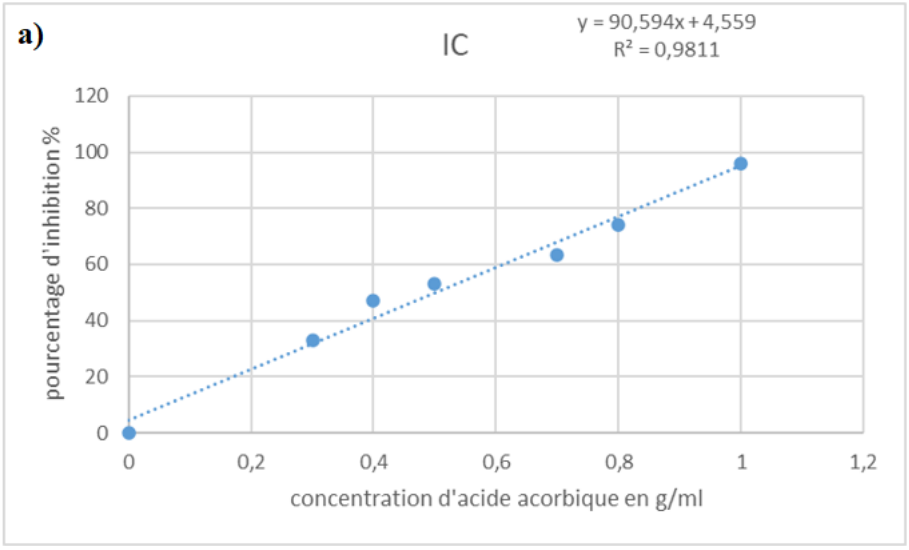
Cette richesse en flavonoïdes renforce l'intérêt des épinards dans une alimentation santé, contribuant à la prévention des maladies chroniques grâce à leur effet protecteur cellulaire et vasculaire (66). Les extraits éthanoliques riches en flavonoïdes peuvent être valorisés dans la formulation de compléments alimentaires, de produits nutraceutiques ou d'ingrédients actifs pour l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

En résumé, une teneur de 24,88 mg EQ/g ES en flavonoïdes totaux positionne l'extrait éthanolique d'épinard comme une excellente source de composés bioactifs, avec un fort potentiel antioxydant et de multiples applications en santé et industrie

III. 7. Evaluation de l'activité biologique et l'activité anti-inflammatoire des extraits végétaux.

III. 7. 1. Evaluation de l'activité antioxydante

Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron. La forme non radicalaire DPPH-H est formée. CI50 (Concentration Inhibitrice à 50%) permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% du radical libre. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés représentant le pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées pour l'acide ascorbique et la chlorophylle (fig. III. 1). La CI50 est inversement lié à la capacité antioxydant d'un composé. Plus la valeur de la CI50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande(67).



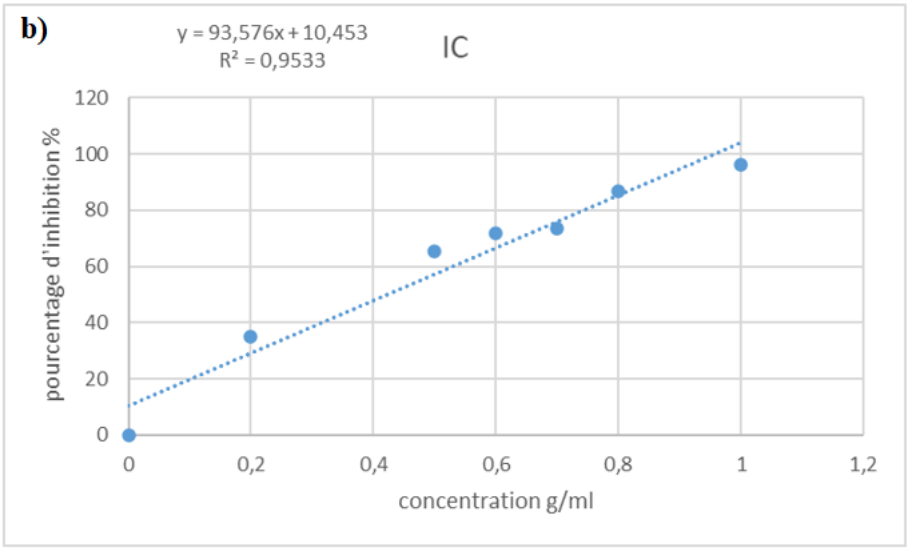


Fig. III. 1. Pourcentages d'inhibition du radical DPPH• par (a) l'acide gallique et (b) de l'extrait alcoolique de la chlorophylle

Le résultat du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par l'extrait est illustré dans le tableau III. 5.

Tableau III. 5. Les résultats de IC_{50} de l'acide ascorbique et l'extrait

	Extrait	**Acide ascorbique**
IC50(mg /ml **)**	0.423	0.501

Les résultats obtenus indiquent une IC_{50} de 0.501 mg/ml pour l'acide ascorbique, ce qui confirme sa forte aptitude à piéger le radical DPPH. Alors que l'IC_{50} de l'extrait est de l'ordre de 0.423 mg/ml ce qui indique une meilleure capacité antioxydante que l'acide ascorbique, car il nécessite une concentration plus faible pour inhiber 50 % des radicaux libres (0,423 mg/ml contre 0,501 mg/ml). Cette capacité à réduire le radical DPPH suggère la présence de composés au sein de l'extrait qui sont capables de contribuer à la neutralisation des espèces réactives.

La complexité de la composition de l'extrait en substances phénoliques et la synergie entre elles sont à l'origine d'une meilleure activité antioxydant (Miguel, 2010) (67). A travers la recherche bibliographique, de très grandes différences de points de vue sont notées à propos de cette corrélation. Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les CI_{50} et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, à l'opposé d'autre études n'ont pas établie cette corrélation (Athamena et al., 2010 ; Mariod et al., 2010) (67). Par ailleurs, il est bien établi que l'activité antioxydante est corrélée positivement avec la structure des polyphénols, Cela est en accord avec les travaux menés sur les extraits de *S. montana* L. subsp. *Kitaibelii* récoltée dans la région de Sibérie, espèce riche en composés phénoliques qui sont responsables de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydante et antimicrobienne (68).

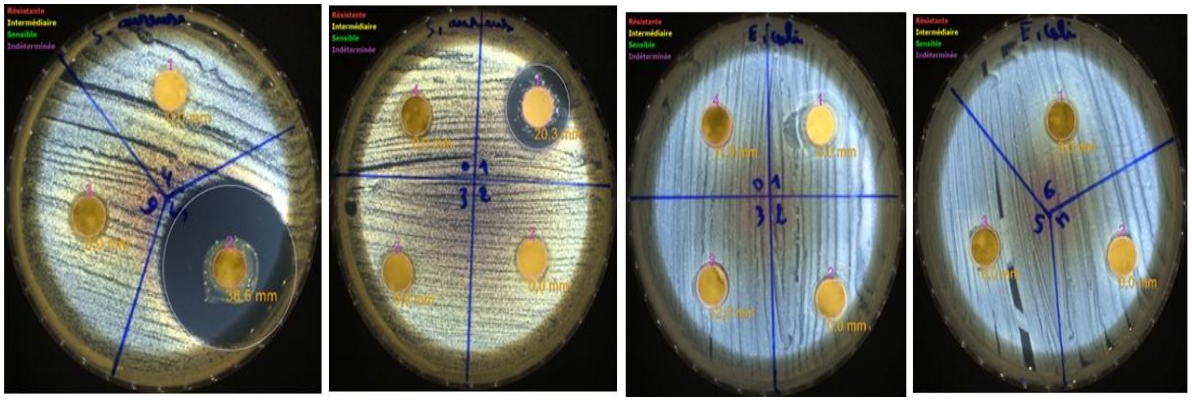
Généralement, les polyphénols qui possèdent un nombre élevé de groupements hydroxyles, démontrent l'activité antioxydante la plus forte (Heim et al., 2002)(69) en raison de leur capacité à fournir davantage d'atomes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de Pinedo et al., 2007)(70). Ceci peut partiellement expliquer pourquoi l'activité anti-radicalaire est influencée par le nombre, la position et la nature des substituants sur les cycles B et C (groupements hydroxyles, metaxylés, glycosylés), ainsi que par le niveau de polymérisation

(Popovici et al., 2010)(71). Par conséquent, l'effet antioxydant dépend non seulement de la dose, mais aussi de la structure (Rodriguez-Bernaldo et al., 2010)(72).

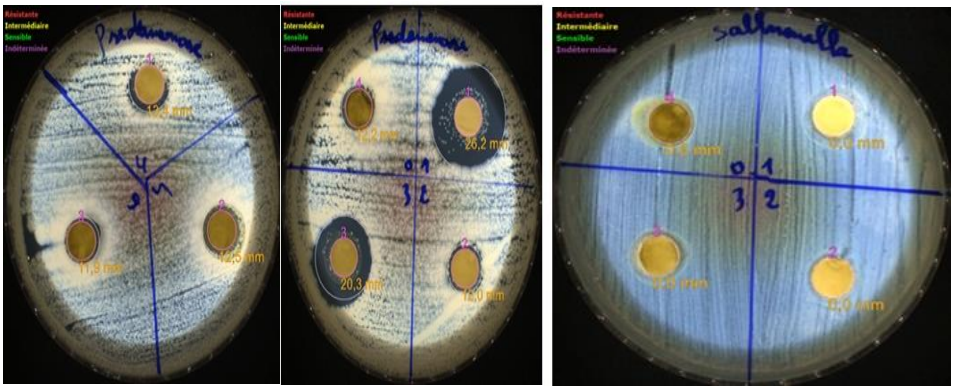
La présence d'une activité antioxydante quantifiable dans l'extrait, bien qu'inférieure à celle de l'acide ascorbique dans les conditions spécifiques de ce test, ouvre des perspectives de recherche prometteuses. Cette opération pourrait être un élément qui contribue aux propriétés curatives possibles de l'extrait, en particulier dans le cadre de la guérison où le stress oxydatif a une importance.

III. 7. 2. Evaluation de L'activité antimicrobienne

Les résultats démontrent que l'activité antimicrobienne de la chlorophylle varie significativement selon les micro-organismes testés. La chlorophylle présente une activité notable contre certains micro-organismes, indiquée par des zones d'inhibition (fig. III. 2) significatives, tandis qu'elle montre, une faible ou absence d'inhibition suggérant une résistance.



(A) (B)



(C) (E)

Fig. III. 2. Résultats de l'étude de l'e 1et antimicrobien de la chlorophylle (photo originale)

Les résultats obtenus relatifs aux diamètres des zones d'inhibitions en mm de l'extrait testé en utilisant la méthode des disques, sont représentés dans le Tableau III. 6.

Tableau III. 6. Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'extrait éthanolique testé selon la méthode des disques

	Diamètres des zones d'inhibition (mm)						
Concentration / Souche	Extrait brut	1	2	3	4	5	6
Staphylococcus aureus ATCC 6538 (A)	_ _	**MI** (20,3)	_ _	_ _	_ _	**TFI** (38,5)	_ _
Escherichia coli ATCC 8739 (B)	**LI** (11,9)	_ _	_ _	**LI** (12,0)	_ _	_ _	_ _
Pseudomonas aeruginosa (C) ATCC 9027	**LI** (12,2)	**FI** 26,2	**LI** (12,0)	**MI** 20,3	**LI** (13,4)	**LI** (12,5)	**LI** (11,9)
Bacillus Subtilis ATCC 6633 (D)	_ _	_ _	_ _	_ _	_ _	_ _	_ _
Salmonella typhimurium (E) ATCC14028	_ _	_ _	_ _	_ _	_ _	_ _	_ _

(-) : Absence d'action inhibitrice, N.I : non inhibiteur (D<10mm), L.I : légèrement inhibiteur (11≤D≤16mm), M.I : moyennement inhibiteur (17≤D≤20mm), F.I : fortement inhibiteur (21≤D≤29mm), T.F.I : très fortement inhibiteur (D≥30mm).

Le tableau montre que l'extrait chlorophylien dilué 1 et 5, ont une activité moyennement inhibitrice et fortement inhibitrice, respectivement, contre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. En revanche, l'extrait brut et l'extrait 3 ont montré une activité légèrement inhibitrice vis-à-vis *Escherichia coli*. Tandis que l'extrait brut et l'extrait 2, 3, 4, 5 et 6 ont montré une activité légèrement inhibitrice vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre l'extrait 1 et 3 ont montré des activités fortement et moyennement inhibitrice contre cette même souche, respectivement.

Il est à noter que *Bacillus subtilis* et *Salmonella typhimurium* sont résistantes à tous les extraits testés, indiquant un manque d'activité antimicrobienne contre ces espèces particulières.

Ces résultats soulignent la nature sélective de l'activité antimicrobienne des extraits, suggérant que leur efficacité dépend fortement de la souche bactérienne spécifique et potentiellement de la présence de différents composés actifs ou de leurs concentrations au sein des extraits.

Ergüden et al. (2021)(73), ont démontré que les terpénoïdes phénoliques, tels que le carvacrol et le thymol, exercent une puissante action antibactérienne en altérant l'intégrité membranaire des cellules bactériennes, provoquant la fuite ionique puis la lyse cellulaire, ce qui souligne leur rôle clé dans la fraction apolaire des extraits végétaux.. Ces composés sont hautement lipophile est par conséquent sont extraits par des solvants de faible polarité tel que le chloroforme (Albano et Miguel, 2010)(74). Ceci corrobore avec nos résultats de criblage des métabolites secondaires qui ont montré que tous les extraits chlorophylliens (sauf l'extrait aqueux) présentent une forte quantité des terpenoides (tableau III. 2). Ainsi le dosage des polyphénols totaux, montre que l'extrait chlorophyllien alcoolique renferme une quantité importante qui est de l'ordre de 48,06 mg EAG/g d'extrait sec, ce qui explique son activité fortement inhibitrice contre les germes Pseudomonas aeruginosa et très fortement inhibitrice contre Staphylococcus aureus. Par contre l'extrait aqueux a montré une activité nulle pour *Bacillus subtilis* et *Salmonella typhimurium*.

Dans une étude comparative entre différents solvants utilisés dans l'extraction de la matière végétale, l'éthanol s'est révélé être un meilleur solvant pour l'extraction de substances antimicrobiennes à partir des plantes médicinales par rapport à d'autres solvants (Rassoul et Dehbine, 2022)(75).

III.7. 3. Evaluation de l'activité hémolytique

Certaines plantes utilisées à visée thérapeutique peuvent présenter une menace pour la santé de l'homme. Il est donc nécessaire d'effectuer un test hémolytique, qui un indicateur de Cytotoxicité (48).

Le taux d'hémolyse induit par l'extrait chlorophyllien dans notre étude a été estimé à 6,72 %, ce qui reste nettement inférieur à celui observé pour l'acide gallique (6,8%). Cette faible activité hémolytique témoigne d'une bonne cytocompatibilité avec les érythrocytes et suggère un faible potentiel toxique au niveau cellulaire. Ce résultat met en évidence la relative innocuité de l'extrait, ce qui pourrait favoriser son utilisation dans des formulations topiques à visée

thérapeutique. De telles observations ont également été rapportées dans d'autres travaux portant sur des extraits végétaux riches en composés antioxydants, où une corrélation inverse a été notée entre l'activité antioxydante et l'effet hémolytique (67).

III. 7. 4. Evaluation de la stabilisation de la membrane des globules rouges

Le test de stabilité de la membrane est basé sur la découverte qu'un certain nombre d'agents anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibent la lyse des érythrocytes induite par la chaleur, probablement en stabilisant la membrane de la cellule. La membrane érythrocytaire peut être considéré comme un modèle de la membrane lysosomale qui joue un rôle important dans l'inflammation. Les composés qui empêchent la lyse de la membrane provoquée par la libération des enzymes hydrolytiques contenues dans les lysosomes peuvent soulager certains symptômes de l'inflammation. Lorsque le globule rouge (GR) humain est soumis à une hypotonie le stress, la libération d'hémoglobine par les globules rouges, sera prévenue par les anti-inflammatoires en raison de la stabilisation membranaire.

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique chlorophylien, un test de stabilisation membranaire de GR humains a été réalisé. Ce test consiste à incuber une suspension de GR humains, traitée avec une solution hypotonique associée à une température élevée, avec les extraits ou la molécule de référence (le diclofénac comme anti-inflammatoire).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait présente une stabilisation très hautement significative de la membrane des globules rouges avec un pourcentage de stabilisation de 99,20%. Ce pourcentage est légèrement inférieur à celui de la molécule de référence le diclofénac qui est de l'ordre de 99 .80%

III. 8. Contrôle de qualité des crèmes formulées

La formulation des crèmes à base de plantes médicinales est une approche courante dans le domaine des soins de la peau. Ces crèmes combinent les bienfaits des ingrédients naturels avec les propriétés hydratantes et protectrices de la base crème pour offrir des produits polyvalents et bénéfiques pour la santé cutanée. Dans cette étude, la formulation de crèmes, de type émulsion H/E, à base de la chlorophylle, sera effectuée.

L'objectif principal de cette formulation est d'exploiter les composés actifs présents dans la chlorophylle, afin de développer une crème efficace pour le traitement et la protection de la peau. La chlorophylle contient divers composés bioactifs tels que des flavonoïdes, des terpénoïdes et des composés phénoliques, qui ont démontré des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, antimicrobiennes et cicatrisantes. Différents excipients nécessaires à la

formulation, tels que les émulsifiants, les agents de texture, seront évalués pour garantir la stabilité et l'efficacité du produit fini. Ainsi 4 formules différentes d'émulsion de type H/E à base de chlorophylle ont été formulés.

Après la formulation, les formules (F0 –F3) ont été caractérisées par des méthodes physicochimiques afin d'évaluer leur conformité ainsi que leurs stabilités.

III. 8. 1. Caractère organoleptique

La caractérisation des émulsions à base de chlorophylle a permis d'évaluer des paramètres clés tels que la stabilité, la viscosité et la taille des gouttelettes. Ces données sont essentielles pour garantir une application homogène, une bonne absorption cutanée et une formulation optimisée, assurant ainsi l'efficacité du produit final

Les résultats du contrôle macroscopique des formulations obtenues sont résumés dans la figure III. 4. ainsi que le tableau III. .

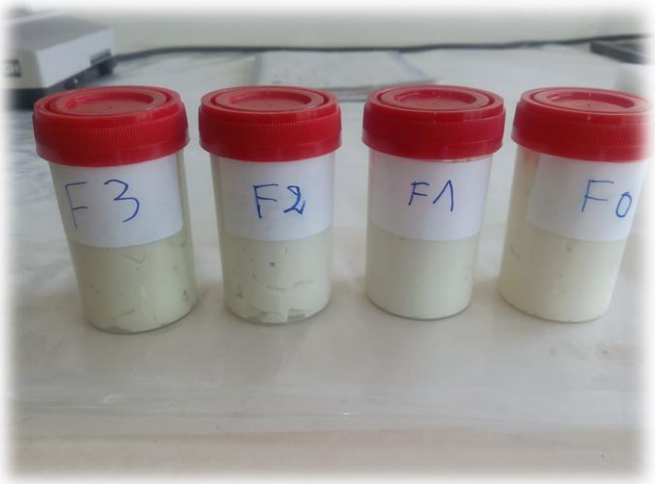


Fig. III.3. aspect macroscopique des emultions (F0-F3)

Tableau III. 7. Caractères organoleptiques des différentes formules

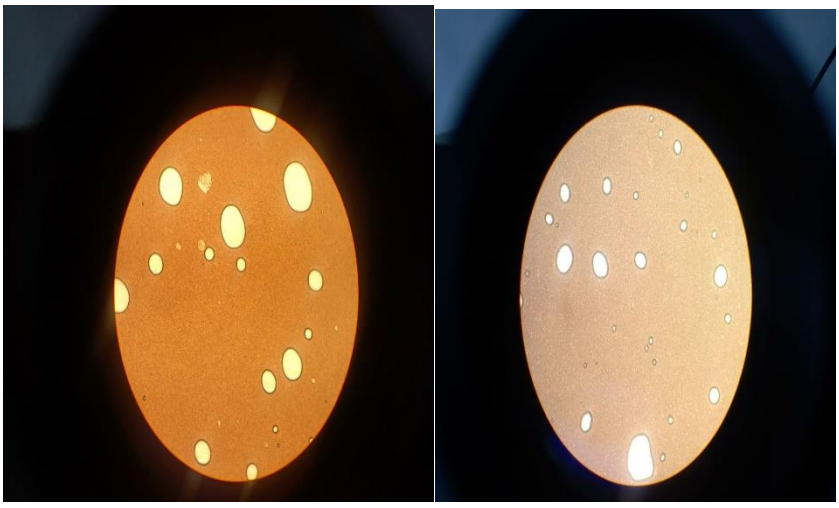
	Formule 0	Formule 1	Formule 2	Formule 3
Couleur	Blanc	Vert	Vert+	Vert ++
Odeur	Odeur d'huile d'olive			
Apparence	Aspect crémeux blanc	Aspect crémeux, vert homogène, épais, onctueux, Brillante au toucher doux et soyeux.		

(Forme et brillance)	homogène épais, onctueux, Brillante au toucher doux et soyeux.
Application où Pénétration	Humide, s'étale facilement et rapidement absorbée par la peau
Après application (Immédiatement)	Une texture plutôt légère avec une bonne sensation d'hydratation fraîche après étalement pour toutes les formules préparées.

L'étude d'analyse macroscopique basée sur une visualisation à l'œil nue a été réalisée. Elle consiste à observer l'aspect des émulsions formulées. Les émulsions formulées (F1, F2 et F3) présentent un aspect crémeux, vert homogène épais et onctueux, de toucher soyeux et doux et lisse. Sauf l'émulsion F0 qui a une couleur blanche

III. 8. 2. Aspect microscopique

L'examen microscopique a été réalisé à l'aide d'un microscope optique avec un agrandissement X40 fois directement après formulation. Pour une meilleure dispersion de l'émulsion, l'échantillon a été placé entre une lame et lamelle. Les observations microscopiques des formulations sont représentées dans la figure III.5. Cette figure montre une bonne homogénéité de l'émulsion préparée.



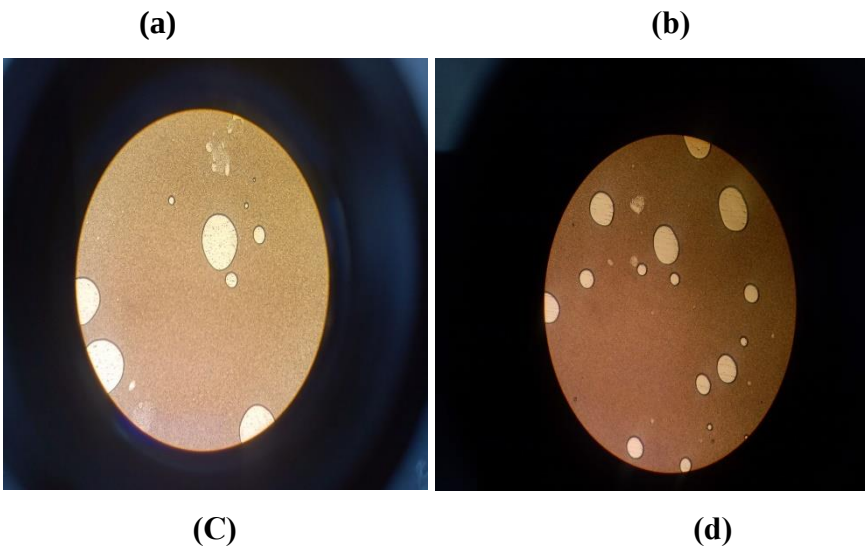


Fig. III.4. Observation microscopique au grossissement 40X de la formule (a) témoin (b) avec 1% de chlorophylle (c) avec 2% de chlorophylle (d) avec 3% de chlorophylle ; à 25°C, après 24 heures de préparation

III. 8. 3. Examen physico- chimique

III. 8. 3. 1. Détermination du pH

Lors de notre travail, nous avons mesuré le pH des émulsions préparées avec la chlorophylle afin d'évaluer leur acidité ou leur alcalinité. Les résultats ont indiqué des valeurs proches légèrement acides. Les valeurs obtenues sont 4.56**,** 5.07, 5.47 et 6.39 pour es formules F0, F1, F2, F3, respectivement. Ces valeurs de pH sont considérées comme convenables pour la peau humaine**.**

En obtenant des valeurs de pH des émulsions dans une plage appropriée, nous pouvons assurer une bonne tolérance cutanée et une meilleure absorption de composé actif. Cela permet également de préserver la stabilité de l'émulsion et d'éviter toute dégradation ou altération des principes actifs

III. 8. 4. Sens d'émulsion

Trois méthodes ont été utilisées pour détermine le sens d'émulsion :

- ✓ **Détermination de la conductivité**

L'analyse de la conductivité électrique constitue une méthode simple et efficace pour déterminer le sens des émulsions (huile dans eau ou eau dans huile) et évaluer certaines de leurs propriétés physicochimiques. Cette méthode repose sur la capacité des phases aqueuses à conduire le courant, ce qui permet d'inférer la nature de la phase continue.

Dans notre étude, les émulsions formulées à partir de chlorophylle. Ont présenté des valeurs de conductivité caractéristiques120µS/cm**,** 129,98 µS/cm, 159 µS/cm et 168,5 µS/cm pour F0, F1, F2 et F3, respectivement, suggérant une phase continue aqueuse, ainsi qu'une bonne stabilité colloïdale. Cette approche permet ainsi d'obtenir des indications rapides sur la stabilité de l'émulsion, en lien avec la dispersion homogène des gouttelettes et la nature

- ✓ **Méthode de Dilution**

Chaque émulsion qui doit être obligatoirement uniforme est diluée à 10% en volume avec de l'eau distillée et 10% en volume avec huile d'olive. On mélange et on observe le comportement une heure après sans bouger la boite (fig. III. 6)

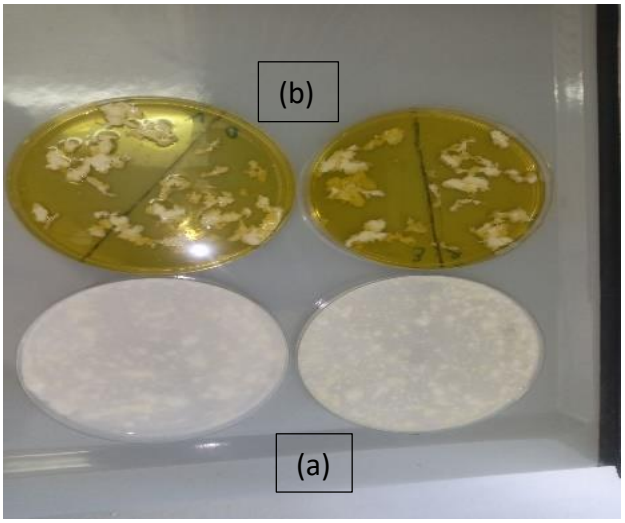


Fig. III.5. L'aspect de l'émulsion après dilution (a) dans l'eau (b) dans l'huile d'olive

(Photo originale) (Ghernaout et Moussouni,2025)

La figure montre une dispersion facile de l'émulsion dans l'eau et une immiscibilité dans l'huile ce qui conforme que la phase continue est aqueuse, pour toutes les formulations.

- ✓ **Coloration au bleu de méthylène**

Ce test a été réalisé sur toutes les formules préparées. Le résultat obtenu est présenté dans (fig. III.6).

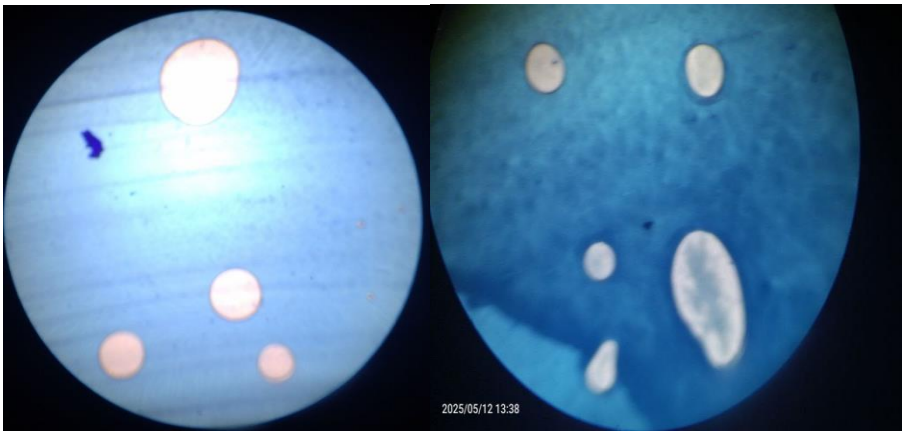


Fig. III.6. Test au bleu de méthylène (photo originale) (ghernaout, moussouni,2025).

La figure III.6. Montre une bonne solubilisation du colorant dans l'échantillon étudié. On remarque également que la coloration est homogène, ce qui nous permis de conclure que la phase continue des crèmes obtenues sont aqueuses.

III. 8. 5. Etude de stabilité accélérée par technique de centrifugation

La stabilité à la centrifugation des émulsions à base de chlorophylle a été évaluée pour déterminer leur résistance aux forces de séparation lors de la centrifugation. Cette étape est cruciale pour évaluer la stabilité physique des émulsions et leur capacité à maintenir leur structure lorsqu'elles sont soumises à des conditions de stress.

Les émulsions (F0-F3) ont été centrifugées à des vitesses spécifiques pendant une durée déterminée. Ensuite, une évaluation visuelle a été effectuée pour détecter tout signe de séparation de phases, de sédimentation ou de coalescence (Tableau III. 8).

Tableau III. 8. Résultats du test de stabilité par centrifugation des émulsions

Tour/min / **Essai**	**2000**		**3000**		**4000**		**6000**	
	15min	30min	15min	30min	15min	30min	15min	30min
F0	++	++	++	++	++	++	++	++
F1	++	++	++	++	++	++	++	++
F2	++	++	++	++	++	++	++	++
F3	++	++	++	++	++	++	++	++

(+) : Stable ; (-) : Instable

La stabilité à la centrifugation est un indicateur de qualité des émulsions formulées. Elle suggère que les agents émulsionnants et gélifiants utilisés ont été efficaces pour former et maintenir une dispersion stable. De plus, cela souligne la capacité des émulsions à conserver leur homogénéité même lorsqu'elles sont soumises à des forces de séparation élevées.

Les résultats ont démontré une excellente stabilité à la centrifugation des émulsions F0, F1, F2 et F3. Aucune séparation de phases visible n'a été observée après la centrifugation, ce qui indique que ces émulsions ont pu maintenir leur structure intacte et éviter la coalescence des gouttelettes.

Il convient de noter que la stabilité à la centrifugation est une caractéristique essentielle pour les émulsions topiques, car elle garantit une distribution uniforme des ingrédients actifs et une application cohérente du produit sur la peau. La stabilité des émulsions est également importante pour assurer leur durée de conservation et leur efficacité à long terme.

III. 8. 6. Calcul de l'indice de crémage

L'indice de crémage est une grandeur déterminée à partir des observations macroscopiques des émulsions préparées à température de stockage 25°C pondent 24h.

Après la centrifugation, prenez le tube ou s'est produit le déphasage et mesurez, à l'aide d'une règle, la phase aqueuse (la phase inferieure) et diviser sur la hauteur totale de l'émulsion.

On mesure l'indice de crémage des formules (0), (1), (2) et (3) égale zéro (l'absence de déphasage), plus la valeur de l'indice de crémage est proche de 0 cela indique une bonne émulsion.

III. 8. 7. Etude la viscosité de la crème

Les résultats des mesures de la viscosité des crèmes préparées sont présentés dans la figure III. 8.

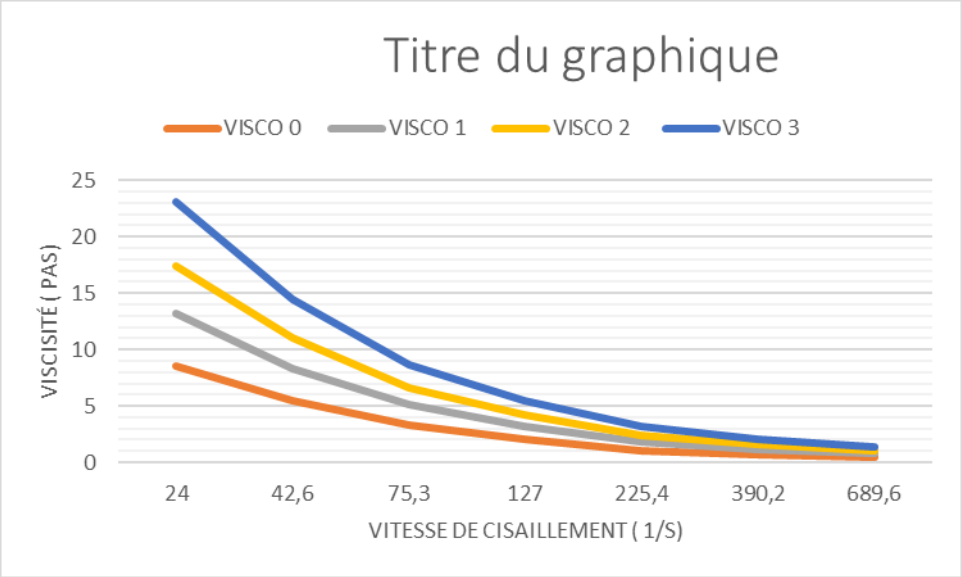


Fig. III.7. Courbes d'écoulement de crèmes à base de la chlorophylle.

Cette figure montre que la viscosité des quatre formules diminue en fonction de La vitesse de cisaillement. De ce fait nous pouvons conclure que les émulsions obtenues sont de Type fluide non-newtonien d'un comportement pseudo-plastique (rhéofluidifiant). Sachant que le comportement le plus fréquemment rencontré pour les émulsions de types crème cicatrisant est le comportement rhéofluidifiant, permettant notamment de faciliter leur application sur la peau. Ces caractéristiques correspondent à une rhéologie particulière des crèmes et lotions Cosmétiques, définies et optimisées lors de la formulation ; elles donnent ainsi des informations Intéressantes sur les propriétés d'écoulement du produit, qui affectent par exemple la façon dont le technicien doit pomper le produit en usine ou encore l'impression sensorielle perçue par le Consommateur lorsqu'il utilisera le produit.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le présent travail s'inscrit dans une démarche valorisant les ressources naturelles pour le développement de traitements dermiques innovants. Nous avons porté notre intérêt sur la chlorophylle, un pigment vert naturellement présent dans les feuilles d'épinards, en mettant en évidence ses propriétés biologiques multiples à travers une approche scientifique structurée.

L'extraction de la chlorophylle a été réalisée à l'aide de différents solvants, dont l'éthanol qui a permis d'obtenir le meilleur rendement (86%) ainsi qu'une teneur élevée en chlorophylle (53,03 µg/mL)**.** Le criblage phytochimique a confirmé la présence de métabolites secondaires bioactifs tels que les polyphénols, flavonoïdes, tanins et terpènes, reconnus pour leurs effets bénéfiques sur la peau.

Le dosage quantitatif a révélé des concentrations importantes de polyphénols (48,06 mg EAG/g) et de flavonoïdes (24,88 mg EQ/g)**,** particulièrement dans l'extrait éthanolique. Les tests antimicrobiens ont mis en évidence une activité notable contre plusieurs souches pathogènes (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*), tandis que l'étude anti-inflammatoire *In- vitro* a montré un pourcentage de stabilisation membranaire atteignant 99,20%, comparable à celui des anti-inflammatoires standards. Le test d'hémolyse a, quant à lui, confirmé une faible cytotoxicité (6,72 %)**.**

Une formulation topique à base de l'extrait chlorophyllien a ensuite été développée sous forme de crème. Elle a démontré de bonnes propriétés organoleptiques**,** une stabilité rhéologique correcte, un pH légèrement acide, adéquat pour la peau**,** en particulier pour la formule F3**,** jugée optimale.

Les émulsions obtenues sont de Type fluide non-newtonien d'un comportement pseudo-plastique (rhéofluidifiant), permettant notamment de faciliter leur application sur la peau.

En perspectives, on propose de :

- ✓ Faire une étude toxicologique chez un modèle animal afin de s'assurer de l'innocuité de l'extrait chlorophyllien.
- ✓ Faire une étude *In- vivo* pour confirmer l'effet thérapeutique réel, notamment l'activité anti-inflammatoire.
- ✓ Préparer la crème à l'échelle pilote pour vérifier sa stabilité quand elle est préparée en grande quantité.
- ✓ Isoler et caractériser les substances actives responsables de l'activité biologique observée à l'aide de techniques analytiques avancées.

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Tran HV. Caractérisation des propriétés mécaniques de la peau humaine in vivo via l'IRM.

2. Latarjet J. Fiche 3 - Anatomie, physiologie et rôles de la peau.

4. Maeda K. New Method of Measurement of Epidermal Turnover in Humans. Cosmetics. 10 nov 2017;4(4):47.

5. Tran HV. Caractérisation des propriétés mécaniques de la peau humaine in vivo via l'IRM.

6. H. Paul Ehrlich PhD, Thomas M. Krummel MD. Regulation of wound healing and fibrosis by growth factors and cytokines. avr 1996;

7. Proksch, E., Brandner, J.M. and Jensen, J.M. Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications,. 25 déc 2024;

8. Azzez K. Caractérisation et modélisation du comportement mécanique in vivo de la peau.

9. la_peau djaalab mansour.H.

10. Twarog C. Particules Janus pour des applications industrielles: stabilités et incorporation de principes actifs.

11. Elias PM. Structure and Function of the Stratum Corneum Extracellular Matrix. J Invest Dermatol. sept 2012;132(9):2131-3.

14. Snitem-2021-livret-Plaies-web Dr Luc Téot.

17. Pommades et Gels - Pharmacie galénique. Dr. Igueblalene. S.

18. Les émuLsions,Collection dirigée par Joël Cnokaert – IA IPR Biochimie – Génie biologique Françoise Guillet – IGEN Biotechnologies et secteur médico-social.pdf.

19. Gravlo L. Reformulation d'un produit historique: la Pommade MERCIER®.

20. les_emulsion_pharmaceutique_2021(Makhlouf, 2021).

21. Malcouronne G. Transéthérification du glycérol par les alcools gras. Etude physico-chimique de la miscibilité des réactifs en présence de catalyseurs solides.

22. lefnaoui sonia,Formulation des émusions (2).cours pdf Taille : 1 014 Ko.

23. Pasquali RC, Sacco N, Bregni C. The Studies on Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB): Sixty Years after William C. Griffin's Pioneer Work (1949-2009). Lat Am J Pharm. 2009;

24. Rakshit AK, Naskar B, Moulik SP. Post Centennial of Micelles: an Overview. Curr Sci. 25 août 2024;127(4):406.

25. Dubuisson P. Influence de la phase grasse et des polymères naturels sur les paramètres physicochimiques en lien avec la perception tactile de l'émulsion.

26. McClements DJ. Food emulsions: principles, practices, and techniques. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2005. 609 p. (CRC series in contemporary food science).

27. Salager J., Formulation concept for the emulsion maker, Pharmaceutical emulsions and suspensions, New York, Marcel Dekker, 2000.

28. Dalgleish D. Food Emulsions: Their Structures And Properties. In: Friberg S, Larsson K, Sjöblom J, éditeurs. Food Emulsions [Internet]. CRC Press; 2003 [cité 24 juin 2025]. (Food Science and Technology; vol. 132). Disponible sur: http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9780203913222.ch1

29. Overbeek JTG. Recent Developments in the Understanding of Colloid Stability. J Colloid Interface Sci. 1977;58(2).

30. Margaret M Robins. Emulsions — creaming phenomena. Current Opinion in Colloid & Interface Science. Elsevier. nov 2000;

31. Zhulina EB, Borisov OV, Priamitsyn VA. Theory of steric stabilization of colloid dispersions by grafted polymers. J Colloid Interface Sci. juill 1990;137(2):495-511.

32. Costa C, Rosa P, Filipe A, Medronho B, Romano A, Liberman L, et al. Cellulose-stabilized oil-in-water emulsions: Structural features, microrheology, and stability. Carbohydr Polym. janv 2021;252:117092.

33. Barel AO, Paye M, Maibach HI, éditeurs. Handbook of cosmetic science and technology. 3rd ed. New York: Informa Healthcare; 2009. 869 p.

34. Martin A, Bustamante P, Chun AHC. Physical pharmacy: physical chemical principles in the pharmaceutical sciences. 4th ed. New Delhi: Waverly; 1993.

35. Eccleston GM. Emulsions and Microemulsions. In: Florence AT, Attwood D, editors. Physicochemical Principles of Pharmacy. 5th ed. London: Pharmaceutical Press; 2010.

38. Aulton ME, Taylor KMG AM Taylor KMG. The Design and Manufacture of Medicines. 5th ed. Elsevier 2017;

39. Perrie Y RT McCafferty DF. Pharmaceutics: Drug Delivery and Targeting. 2012.

40. 21.les-pigments. https://www.bioutils.ch/system/pdf_documents/docs/000/000/041/original/21.les-pigments.pdf?1440146149.

42. Mémoire de fin d'études En vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Supérieures en Biologie Option : Biochimie.

43. This H. Parlons des chlorophylles, et pas de la chlorophylle. Acad Agric Fr. déc 2021;2.

46. Mackinney G. ABSORPTION OF LIGHT BY CHLOROPHYLL SOLUTIONS. J Biol Chem. août 1941;140(2):315-22.

47. Arnon, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Plant Physiology, 24(1), 1–15. 1949;

48. F. Haddouchi, T.M. Chaouche, N. Halla. Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. Phytothérapie. 1 déc 2018;16(1):254-62.

49. Boizot N, Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. 2006;

50. Wong S, Leong L, Williamkoh J. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. Food Chem. 2006;99(4):775-83.

51. Bahorun T., Gressier B, Trotin F., Brunet C, Dine T, Vasseur J, et al. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittelforschung. 1996;

52. Ribéreau-Gayon P. Interprétation chimique de la couleur des vins rouges.

53. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chem. févr 2012;130(4):1036-43.

54. Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils. Food Control. 2008;

55. Gadamsetty G, Maru S. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of the Methanolic Leaf Extract of Traditionally Used Medicinal Plant Mimusops elengi L. J Pharm Sci. 2013;

57. Amrouche FZ. Élaboration d'une crème cosmétique hydratante à base d'extrait de feuilles de romarin. . Mémoire de fin d'études, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou; 2019.

59. R. Brummer. Rheology Essentials of Cosmetic and Food Emulsions. 2006.

60. F. Steffe. "Rheological Methods in Food Process Engineering. 1992. (James Freeman Steffe - Google Livres).

61. Wu Y, Ngo HH, Guo WS, Liu Y, Nghiem LD, Hai FI, et al. Optimization of process parameters for production of volatile fatty acid, biohydrogen and methane from anaerobic digestion. Bioresour Technol. nov 2016;219:738-48.

62. Nasir Z, Grashorn M. Effects of *Echinacea purpurea* and *Nigella sativa*supplementation on broiler performance, carcassand meat quality. J Anim Feed Sci. 29 janv 2010;19(1):93-103.

63. Godínez-Santillán RI, Chávez-Servín JL, García-Gasca T, Guzmán-Maldonado SH. Caracterización fenólica y capacidad antioxidante de extractos alcohólicos de hojas crudas y hervidas de Cnidoscolus aconitifolius (Euphorbiaceae). Acta Bot Mex [Internet]. 24 juin 2019 [cité 24 juin 2025];(126). Disponible sur: https://abm.ojs.inecol.mx/index.php/abm/article/view/1493

64. Boulakroune Sara, Almi Anouar. Etude phytochimique et biologique de la plante Spinacia oleracea. Mémoire de Master, Université de constantine, Algérie; 2020.

65. Missaoui R. Extraction verte et caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits de la production d'asperge (Asparagus officinalis L.).

66. Ouattas Hadjet, Mansouri Samia. Développement d'une crème cicatrisante à base de chlorophylle. Mémoire de Master, Université de Médéa, Algérie; 2019.

67. Kumar G, Karthik L, Rao KVB. Phytochemical composition and in vitro antioxidant activity of aqueous extract of Aerva lanata (L.) Juss. ex Schult. Stem (Amaranthaceae). Asian Pac J Trop Med. mars 2013;6(3):180-7.

68. Ćetković GS, Čanadanović-Brunet JM, Djilas SM, Tumbas VT, Markov SL, Cvetković DD. Antioxidant Potential, Lipid Peroxidation Inhibition and Antimicrobial Activities of Satureja montana L. subsp. kitaibelii Extracts. Int J Mol Sci. 29 sept 2007;8(10):1013-27.

69. Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB. The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. Psychoneuroendocrinology. juill 2002;33(6):693-710.

70. Torresdepinedo A, Penalver P, Perezvictoria I, Rondon D, Morales J. Synthesis of new phenolic fatty acid esters and their evaluation as lipophilic antioxidants in an oil matrix. Food Chem. 2007;105(2):657-65.

71. Popovici V, Chen W, Gallas BD, Hatzis C, Shi W, Samuelson FW, et al. Effect of training-sample size and classification difficulty on the accuracy of genomic predictors. Breast Cancer Res. 11 janv 2010;12(1):R5.

72. Koivikko R, Pastorelli S, Rodríguez-Bernaldo De Quirós A, Paseiro-Cerrato R, Paseiro-Losada P, Simoneau C. Rapid multi-analyte quantification of benzophenone, 4-methylbenzophenone and related derivatives from paperboard food packaging. Food Addit Contam Part A. oct 2010;27(10):1478-86.

73. B Ergüden. Phenol group of terpenoids is crucial for antibacterial activity upon ion leakage. Department of Bioengineering, Gebze Technical University, Kocaeli, Turkey. 2021;

75. Mémoire Rassoul et Dehbine,PFE master2 ,universite yahia fares, medea,2022.

Sites électroniques

3. skin-structure-and-function [Internet]. [cité 27 mai 2025]. Disponible sur: https://int.eucerin.com/about-skin/basic-skin-knowledge/skin-structure-and-function

12. affection de la peau [Internet]. [cité 1 févr 2025]. Disponible sur: https://dermatologue.ca/patients-et-grand-public/maladies-et-affections/affections-cutanees/

13. MDS_PLAIES_La_plaie,https://www.chuv.ch/fileadmin/sites/dso/documents/Methodes_de_soins/MDS_PLAIES_La_plaie.pdf.

15. cicatrisation [Internet]. [cité 30 janv 2025]. Disponible sur: https://dermato-info.fr/fr/c-est-quoi-la-peau/la-cicatrisation-de-la-peau#:~:text=TUTOS-,La%20cicatrisation%20de%20la%20peau,-%C3%80%20PROPOS%20DE

16. LES TYPES DE CICATRICE [Internet]. [cité 3 févr 2025]. Disponible sur: https://skinmarceau.com/besoins/cicatrices/#typologies

36. Tadros TF. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. In: Tadros TF, éditeur. Emulsion Formation and Stability [Internet]. 1re éd. Wiley; 2013 [cité 24 juin 2025]. p. 1-75. Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527647941.ch1

37. Schramm LL. Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications [Internet]. 1re éd. Wiley; 2005 [cité 24 juin 2025]. Disponible sur: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/3527606750

41. chlorophylle [Internet]. [cité 4 févr 2025]. Disponible sur: https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/1561/chlorophylle

44. chlorophylle b [Internet]. [cité 4 févr 2025]. Disponible sur: https://www.topsante.com/medecines-douces/phytotherapie/chlorophylle-bienfaits-sante-644267#item=1

45. epinard [Internet]. [cité 21 juin 2025]. Disponible sur: https://laforetnourriciere.org/produit/epinard/

56. 3-1.html [Internet]. [cité 21 juin 2025]. Disponible sur: https://ressources.unisciel.fr/formulation_cosmetique/co/3-1.html

58. microemulsion_cosmetique [Internet]. [cité 21 juin 2025]. Disponible sur: https://arnaudgea.fr/microemulsion_cosmetique/

74. j.indcrop.2010.11.012 [Internet]. [cité 25 juin 2025]. Disponible sur: https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.11.012

ANNEXE

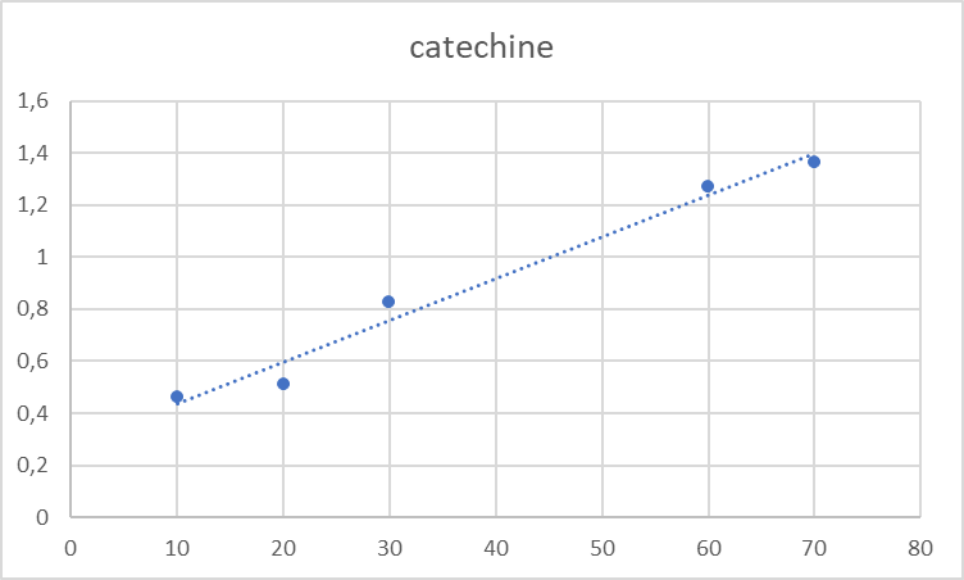


Fig .1. Courbe d'étalonnage de flavonoïde

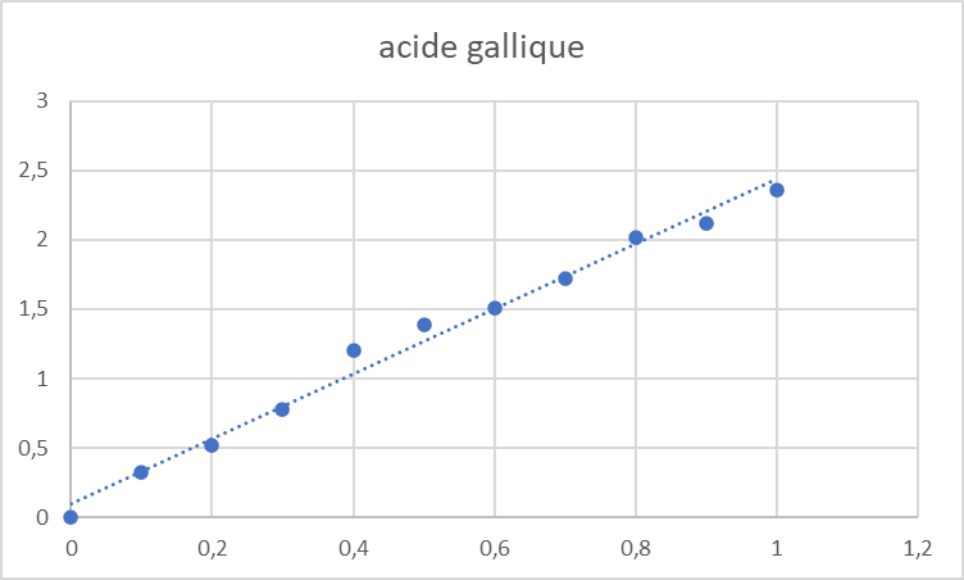


Fig. 1. Courbe d'étalonnage de phénols totaux.