REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES



Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Chimie

Spécialité :

Chimie Pharmaceutique

Par :

DOUIFI Abderraouf

Thème :

Formulation et caractérisation d'une crème générique à base de principes actifs anti-infectieux

Soutenue publiquement le : 29 /05 /2018, Devant le jury composé de :

Rebouh .Samia	MCB	U. Médéa	Présidente
Yahoum. Madiha.M	MCB	U. Médéa	Examinatrice
Lefnaoui.Sonia	MCA	U. Médéa	Encadreur

Année universitaire 2017/2018


بسم الله الرحمن الرحيم

ملخص

يتمثل العمل الحالي في صياغة كريم جنيس وهو على شكل مستحلب زيت في الماء على أساس زيت حبة البركة ، مثبت بصمغ الزنتان ويحتوي على المكونات النشطة التالية: نيومايسين ، نيستاتين ، و تريامسينولون أسيتونيد . في البداية ، تم تطوير صيغ وهمية مختلفة من حيث تركيبة الطور الزيتي من أجل اختيار الصيغة المثلى. وفقا لنتائج الضوابط الفيزيائية الكيميائية ، الصيغة EM1 التي أظهرت خصائص فيزيائية كيميائية مرضية تم اختيارها لمرحلة التركيب. في الخطوة الثانية ، تمت صياغة الكريمات المحتوية على المكونات الفعالة وتميزت بمراقبة الخصائص الحسية ، اتجاه المستحلب ، الاستقرار بواسطة الطرد المركزي ، قياس الناقلية ، الرقم الهيدروجيني واللزوجة ، وكذلك الضوابط الميكروبيولوجية واختبارات السلامة في الجسم الحي. تتكون الصيغة المثلى للمستحلب النهائي من 70 ٪طورمائي (محلول XG ٪2)و 30٪ طور زيتي (10٪ بروبيلين جلايكول و 20٪ زيت حبة البركة). أعطت الضوابط الفيزيائية والميكروبيولوجية للكريم نتائج مرضية. كما اظهر الكريم سلوكًا فيزيائيًا لزجًا وكشف اختبار التهيج أن الكريم غير مهيج للاستخدام الجلدي.

الكلمات المفتاحية: كريم جنيس ، صياغة ، مستحلب، نيومايسين ، نيستاتين ، تريامسينولون أسيتونيد.

.

Résumé

Le présent travail consiste en la formulation d'une crème générique sous forme d'une émulsion huile dans eau à base d'huile de Nigelle, stabilisée par la gomme xanthane et contenant les principes actifs suivants: la Néomycine, la Nystatine, et la Triamcinolone acétonide. Dans un premier temps, des formules placébo ont été développées en variant la composition de la phase huileuse afin de choisir la formule optimale. Selon les résultats des contrôles physico-chimiques, c'est la formule EM1 qui a montré des propriétés physico-chimiques satisfaisantes et a été retenue pour la phase de formulation. Dans un deuxième temps, des crèmes contenant les principes actifs ont été formulés et caractérisées par le suivi des propriétés organoleptiques, le sens de l'émulsion, la stabilité à la centrifugation, la mesure de la conductivité, du pH et de la viscosité, ainsi que des contrôles microbiologiques et des essais d'innocuité in vivo. La formulation optimale de l'émulsion finale est composée de 70% en phase aqueuse (solution de XG à 2 %) et 30% de phase huileuse (10% de Propylène glycol et 20% d'Huile de Nigelle). Les contrôles physico-chimiques et microbiologiques de la crème ont donnés des résultats satisfaisants. La crème présente un comportement viscoélastique typique des fluides rhéofluidifiant. Le test d'irritation a permis de révéler que la crème est non irritante pour usage cutané.

Mots clés : Crème générique, Formulation, Emulsion, Neomycine, Nystatine, Triamcinolone acétonide.

Abstract

The present work consists in the formulation of a generic cream in the form of an oil-in-water emulsion based on Nigella oil, stabilized with xanthan gum and containing the following active ingredients: Neomycin, Nystatin, and Triamcinolone acetonide. Initially, placebo formulas varying the composition of the oily phase were developed in order to choose the optimal formula. According to the results of the physic-chemical controls, the formula which has shown satisfactory physicochemical properties and has been selected for the formulation phase is EM1. In a second step, creams containing the active ingredients were formulated and characterized by monitoring the organoleptic properties, the emulsion type, the stability by centrifugation, the conductivity measurement, the pH and the viscosity, as well as microbiological controls and in vivo safety tests. The optimal formulation of the final emulsion is composed of 70% in aqueous phase (2% XG solution) and 30% oily phase (10% Propylene glycol and 20% Nigella oil). The physicochemical and microbiological controls of the cream gave satisfactory results. The cream exhibits a viscoelastic behavior typical of shear thinning fluids. The irritation test revealed that the cream is non-irritating for cutaneous use.

Keywords: Generic cream, Formulation, Emulsion, Neomycin, Nystatin, Triamcinolone acetonide.

Remerciements

Avant tout, je remercie ALLAH le tout puissant de j'avoir donné la force, le courage, la persistance d'accomplir ce travail ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés. Merci de j'avoir éclairé le chemin de la réussite… Alhamdoulillah.

J'adresse mon gratitude à l'encadreur de ce mémoire le maitre de conférences Dr LEFNAOUI. Sonia pour la confiance qu'il m'a accordé, son soutien et ses conseils tout au long de cette recherche.

Je remercie vivement également mesdames les membres de jury :

Présidente du jury : Dr REBOUH Samia

Examinatrice : Dr YAHOUM Madiha .M

Pour l'honneur qu'elles m'ont fait en acceptant de juger mon travail.

Les travaux exposés dans ce mémoire ont été réalisés au sein des laboratoires de contrôle qualite de l'établissement SAIDAL-Antibiotical de Médéa ainsi que dans le laboratoire de recherche de la faculté des sciences de l'université de Médéa; je tiens à présenter mes sincères remerciements à Mme keskes sonia la directrice du laboratoire de contrôle qualié , à tout le personnel de ces laboratoires et plus particulièrement à Mme Boukarak karima pour leur aide ,sans lesquels ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Finalement, j'exprime chaleureusement mon profonde gratitude à ma famille qui m'ont toujours soutenu et encouragé. Ainsi que l'ensemble des enseignants qui ont contribué à ma formation….



Dédicaces

Je dédie ce travail qui est le couronnement de toutes les années de mon étude :

A ma douce mère, qui a œuvré pour ma réussite de par son amour, sa tendresse, son soutien, tous ses sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence pour moi. Je ne trouverai jamais l'expression forte pour t'exprimer tout mon amour … Merci ma mère d'être toujours à mes côtés.

A mon très cher père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices pour m'aider à avancer dans ma vie. Que ce travail porte son fruit et soit l'expression des vœux qu'il n'a cessé de formuler dans ses prières… Merci mon père pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent.

Je prie ALLAH, le miséricordieux, pour qu'il vous accorde longue vie et qu'il me pardonne pour la peine que je Vous ai infligé durant ces années

A mes sœurs soumia , sarah et hadjer qui a répondu à mes demandes et mes besoins et m'a aidé, je te prie de trouver dans ce modeste travail l'expression de mon estime et ma reconnaissance pour vos effort.

Aux symboles de la jeunesse dans ma famille : mes frère fares et le petit islem Pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré, je vous souhaite la réussite.

Ce Mémoire est également le sien, mille merci

à Dr YAHOOM Madiha ,M

Á mes enseignants de l'université de Médéa et plus particulièrement les enseignants de la faculté

des sciences

Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans mes chères amis Boukhari noureddine,Akal abdenour , Boussahoi Mouhamed et Meredef azzedinne . Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie académique et personnelle. Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux.

A tous mes proches et tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont apporté leurs sollicitudes pour accomplir ce travail.

Abderraouf

Table de matières

Liste des abréviations

Nomenclatures et symboles

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

Chapitre I : les émulsions

I.1.Introduction……..... 03

I.2. Les tensioactifs……..…….. 03

I.2.1. généralité et définition ……. 03

I.2.2.Caractéristiques fondamentales des tensioactifs ……..…… 04

I.2.2.1. Balance Hydrophile-Lipophile (HLB) ……..... 04

I.2.2.2 Concentration Micellaire Critique (CMC) ……..…….…. 05

I.3. Les émulsions ……..... 05

I.3.1.Généralités et définition ……... 05

I.3.2. Différents types d'émulsions …….…….. 06

I.3.2.1 Les émulsions simples …….....…… 07

I.3.2.2 Les émulsions multiples …….…… 07

I.3.2.3 Les émulsions mixtes……..…… 08

I.4. Mécanismes d'instabilité des émulsions …….…….…….. 09

1.4.1. Sédimentation et crémage ……..... 10

1.4.2. Floculation ……. 10

1.4.3. Coalescence …….……... 11

I.4.4. Mûrissement d'Ostwald ou diffusion moléculaire ……. 12

I.4.5. Inversion de phase…….…… 12

I.5. Stabilisation des émulsions …… 13

I.5.1. Stabilisation rhéologique …… 13

I.5.2. Stabilisation stérique …… 13

I.5.3. Stabilisation électrostatique …….... 14

I.5.4. Stabilisation électro stérique…… 14

I.6. Stratégies de formulation des émulsions ……..... 15

I.6.1. Méthodes de préparation ……... 15

I.6.2. Variables influençant le type d'émulsion…… 16

I.6.2.1 Variables de formulation ……... 16

I.6.2.2 Variables de processus ……... 17

I.7.Contrôle des émulsions ……... 18

I.7.1. Contrôle macroscopique ……..… 18

I.7.2. Examen microscopique ……... 18

I.7.3. Détermination du sens de l'émulsion …… 18

I.7.4. Contrôle de stabilité ……... 19

I.7.5. Contrôle microbiologique …….. 19

I.7.6. Détermination de pH …… 19

I.7.7. Qualité de l'émulsification …… 19

I.8. Conclusion ……..……..…….. 20

Chapitre II : Les anti-infectueux

II.1. Introduction ……...…. 21

II.2. Les antibiotiques …….. 21

II.2.1. Mode d'action des antibiotiques ……... 21

II.2.1.1.Action sur la paroi bactérienne ……..……..…….. 21

II.2.1.2.Action sur la structure de la membrane …….……..…… 22

II.2.1.3Action sur la synthèse protéique sur les ribosomes …….…… 22

II.2.1.4.Action sur la synthèse de l'ADN……..……..……...… 22

II.2.1.5Autres actions …… 22

II.2.2.Critères de classification des antibiotiques ……... 23

II.2.3. La Néomycine…… 23

II.3.Les antifongiques ……..……...…. 24

II.3.1. Classifications des antifongiques …….……..… 25

II.3.1.1. Les antifongiques naturels ……..… 25

II.3.1.1.1 Les polyènes ……..……..….. 25

II.3.1.1.2 L'amphotéricine B (AmB) ……..…..……... 25

II.3.1.1.3 La Nystatine ……..…… 27

II.3.1.1.4 La cycloheximide ……..…..……. 27

II.3.1.1.5 Les benzohydrofuranes ……..…….. 28

II.3.1.2. Les antifongiques de synthèse ……..... 28

II.3.1.2.1 La 5-fluorocytosine (5-FC) …….……..…. 28

II.3.1.2.2 Les azolés ……...… 29

II.3.1.2.3 Les échinocandines …….……..……..... 30

II.4. Les corticostéroïdes …….…… 31

II.4.1 L'acétonide de triamcinolone ……..…… 31

II.5. Conclusion ……..……... 32

Chapitre II : L'etude experimentale

III.1. Introduction…… 33

III.2. Matériel et produits ……..…… 33

III.3. Méthodes d'analyse …….…… 35

III.3.1. Spectrophotométrie UV-Visible …….. 36

III.3.2. Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)……. 36

III.3.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) ……. 36

III.4 Contrôle qualité des principes actifs …… 36

III.4.1 Analyse et contrôle de la Néomycine …… 36

III.4.1.1 Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) ……..…… 37

III.4.1.2 Analyse par Spectrophotométrie FTIR…….. 38

III.4.1.3 Analyse colorimétrique……..……. 39

III.4.2. Analyse et contrôle de la Nystatine…….. 39

III.4.2.1. Analyse par Spectrophotométrie UV …….. 39

III.4.2.2. Analyse par Spectrophotométrie FTIR …… 40

III.4.2.3. Analyse colorimétrique ……... 41

III.4.2.4. Analyse par chromatographie HPLC ……..……... 42

III.4.3. Analyse et contrôle de la Triamcinolone acétonide ……. 43

III.4.3.1. Analyse par Spectrophotométrie FTIR …… 43

III.4.3.2. Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM) …….. 44

III.4.3.3. Analyse par chromatographie HPLC ……. 45

III.5. Analyse et contrôle du Biopolymère : Gomme xanthane ……. 46

III.6. Etude microbiologique de l'huile de nigelle « nigella sativa »…….…… 46

III.6.1 Etude de l'effet antimicrobien…… 46

III.6.1.1 Composition du milieu de culture…… 46

III.6.1.2. Choix des souches bactériennes……..……..….... 47

III.7. Pré formulation……...…….. 48

III.7.1. Caractérisation des émulsions placebos…… 49

III.7.1.2. Examen macroscopique ……..…… 49

III.7.1.3. Etude de la conductivité ……..……... 50

III.7.1.4.Mesure du pH des émulsions placebos …….……...…… 51

III.7.1.5 Stabilité accélérée par centrifugation …….……...… 51

III.7.1.6 Analyse microscopique ……..…… 52

III.8. Formulation de la crème …….……..… 53

III.8.1. Caractérisation du produit fini « crème » ……...……..… 54

III.8.1.1Etude de la viscosité de la crème ……..... 55

III.8.1.2 Analyse quantitative des principes actifs (Dosage) ……..…….. 55
III.8.1.2.1 *Identification et dosage du principe actif Triamcinolone acétonide* …..….. 55
III.8.1.2.2 *Identification et dosage du principe actif Nystatine* …… 57
III.8.1.3 Contrôle de la pureté microbiologique de la crème ……..……. 59
III.8.1.3.1. Préparation de l'échantillon ……..……..…..……. 59
III.8.1.3.2. Dénombrement des germes viables totaux ……..……. 59
III.8.1.3.3. Dénombrement de moisissures et levures ……..…….. 60
III.8.1.3.4. Recherche des entérobactéries ……..…… 60
III.8.1.3.5. Recherche de staphylococcus aureus …… 60
III.8.1.3.6. Recherche des salmonelles……..… 60
III.8.1.3.7. Recherche d'E. coli…….…… 61
III.8.1.3.8. Recherche des Pseudomonas aeruginosa …… 61
III.9. Evaluation de la tolérance cutanée in vivo …….. 62
III.9.1. Principe …… 62
III.9.2. Mode opératoire ……..…….. 62
III.9.3. Lecture ……..…… 63
III.9.4. Expression des résultats …… 63
III.10. Conclusion …….. 65

Conclusion générale

Références bibliographiques

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
CMC	Concentration Micellaire Critique.
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CCM	Chromatographie sous couche mince
E	Eau
E/H	Emulsion Eau dans Huile.
E/H/E	Emulsion Eau dans Huile dans Eau
EM	Emulsion
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy
H	Huile
H_2SO_4	L'acide sulfurique
HCL	Le chlorure d'hydrogène
HLB	Balance Hydrophile-Lipophile.
H/E	Emulsion Huile dans Eau.
H/L	Emulsion phase Hydrophile dans lipophile
HN	Huile de nigelle.
HPLC	High-performance liquid chromatography
IP	Indice d'irritation primaire
IR	Infrarouge
L/H	Emulsion phase lipophile dans Hydrophile
ORL	oto-rhino-laryngologiste
PA	Principe Actif
PG	Propylène Glycol
pH	Potentiel hydrogène.
UV	Ultra Violet.
XG	Gomme xanthane
XLD	Xylose-Lysine-Désoxycholate

Nomenclatures et symboles

Symbole	Désignation	Unité
v	Vitesse	$m.s^{-1}$
τ	Contrainte de cisaillement	Pa
η	Viscosité dynamique	$Pa.s$
λ	La longueur d'onde	m

Liste des figures

Chapitre I: les émulsions

Figure I.1. Structure d'une molécule amphiphile ..…….... 03

Figure I.2. Illustration d'une émulsion …..……..... 06

Figure I.3. Types des émulsion simple ……..… 07

Figure I.4. Differents types d'émulsions multiples ……..….. 08

Figure I.5. Differents types d'émulsions multiples.…..……..…. 08

Figure I.6. Processus de déstabilisation d'une émulsion…....……. 09

Figure I.7. Phénomènes de crémage et de sédimentation ……..…… 10

Figure I.8. Phénomène de floculation …….. 11

Figure I.9. Phénomène de coalescence ……... 11

Figure I.10. Phénomène de mûrissement d'Ostwald ……..….. 12

Figure I.11. Phénomène d'inversion de phase …….……. 13

Figure I.12 Double couche électrique …… 14

Figure I.13 Image de la microscopie optique : **(a)** émulsion primaire, **(b)** émulsion après homogénéisation……..... 15

Figure I.14. Schéma de formulation d'une émulsion…….…. 16

Chapitre II : les anti-infectieux

Figure II.1. Mode d'action des antibiotiques ……. 23

Figure II.2. Structure chimique de la néomycine. ……..….... 24

Figure II.3. Cible des différents antifongiques …….. 25

Figure II.4. . Mécanisme d'action de l'Amphotéricine B ……... 26

Figure II.5. La structure chimique de la nystatine …….. 27

Figure II.6. Mode d'action de la 5-FC ……..... 29

Figure II.7. Structure chimique du fluconazole, de l'itraconazole, du voriconazole et de posaconazole …….. 30

Figure II.8. Structure chimique des échinocandines ……... 31

Figure II.9 Structure chimique de la triamcinolone acétonide ……... 32

Chapitre III : L'étude expérimentale

Figure III.1. Analyse par CCM de la néomycine sulfate ……..... 37

Figure III. 2. Spectre IR de la Néomycine sulfate …. ……..... . 38

Figure III.3. Spectre d'absorption UV de la Nystatine……..……. 40

Figure III.4. Spectre FTIR de la Nystatine……..……..……. 41

Figure III.5. Chromatogramme HPLC de la Nystatine……..……. 42

Figure III.6 spectre IR de la Triamcinolone acétonide …..…… 43

Figure III.7. Plaque CCM développé de triamcinolone acétonide ……..... 44

Figure III- 8 chromatogramme de triamcinolone acétonide..... 45

Figure III.9 spectre IR de gomme xanthane…… 46

Figure III10. Antibiogrammes de l'huile de nigelle testée sur les souches : **(a)** *S. aureus ;* **(b)** *S. epidermidis* ; (**c)** *E. col*…….. 48

Figure III.11. Méthode de formulation des émulsions placebos : **(a)** Préparation des phases, **(b)** Incorporation de la phase huileuse dans la phase aqueuse, **(c)** Homogénéisation…… 49

Figure III.12 Aspect macroscopique des émulsions placebos ……..... 50

Figure III.13. Analyse de la conductivité des émulsion splacebos…...……... 50

Figure III.14. Mesure de pH des émulsions préparés ……..……..…..... 51

Figure III.15. Résultats des émulsions placebos après centrifugation ….……...……..… 52

Figure III.16 Image microscopique de l'émulsion placebo optimale (EM 1) ……...… 53

Figure III.17. Résultats de trois essais de l'incorporation des principes actifs…….. 54

Figure III.18. Aspect macroscopique de la crème…….. 54

Figure III.19. Variation de la viscosité de la crème …… 55

Figure III.20 spectre UV de la Nystatine dans la crème …… 58

Figure III.21. Antibiogramme de Nystatine dans la crème …… 59

Figure III.22. (a) développement des Germes aérobie viables totaux, (b) développement Levures et moisissures.…..……... 62

Figure III.23. Résultats du test d'irritation **(a):** 0 Erythème,0 Œdème **(b)**. : 1 Erythème, 0 Œdème **(c)** : 0 Erythème ,1 Œdème ……... 64

Liste des tableaux

Chapitre I : Les émulsions

Tableau I.1. Classement des tensioactifs ……..……. 04

Tableau I.2. Les différents types d'émulsion simple ……..……..… 07

Chapitre III : Etude expérimentale

Tableau III.1. Liste du principal matériel utilisé…….……..….... 33

Tableau III.2. Les principes actifs utilisés…….……..…..... 34

Tableau III.3. Liste des principaux excipients utilisés ……..……... 35

Tableau III.4. Résultats de test de coloration de la Nystatine**.** ……..... 42

Tableau III.5. Composition de milieu de culture…….……... 47

Tableau III. 6. Fractions des différents constituants des émulsions placebos ……..... 48

Tableau III.7. Aspect macroscopique des émulsions placebos. ……..... 49

Tableau III.8 Tests de centrifugation des émulsions placebos ……... 51

Tableau III.9. Mesure des paramètres physico-chimiques de la crème ……... 55

Tableau III.10. : Résultats de dosages des PA (s)……... 59

TableauIII.11. : résultats du contrôle microbiologique de la crème……..….. 61

Tableau III.12 Résultats représentatif de l'échelle numérique des lectures de l'érythème et de l'œdème…….. 63

Tableau III.13 : tableau représentatif des différents types de réponses cutanées…… 64

Tableau III.14. Résultats de test d'irritation ……... 64

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les infections cutanées sont des agressions de la peau essentiellement d'origine bactérienne. Habituellement, la couche superficielle de la peau, l'épiderme, est en mesure de résister à l'invasion de ces bactéries mais lorsqu'elle est blessée ou lésée, les germes peuvent y pénétrer et y trouver un milieu favorable à leur développement et multiplication. Des virus, des parasites ou des champignons appelés parfois mycoses, peuvent eux aussi être responsables de manifestations cutanées. Les infections de la peau doivent être désinfectées et soignées de façon rapide et efficace. Pour le traitement de ces infections, on trouve dans le marché pharmaceutique plusieurs formulations qui sont destinées à résolue ce problème.

De nos jours, les émulsions constituent 60% des formes utilisées comme des produits de dermopharmacie et cosmétique. Elles sont aussi bien très utilisées dans d'autres industries, notamment l'industrie pharmaceutique, agroalimentaire, les peintures, l'agrochimie et l'industrie pétrolière. Dans l'industrie pharmaceutique, les applications sont nombreuses : émulsions parentérales, topiques, orales ou ophtalmiques, et ceci du fait de leurs excellentes capacités de solubilisation des ingrédients actifs lipophiles et hydrophiles, et du fait de leur bonne tolérance.

Les émulsions sont des systèmes formés par la dispersion de fines gouttelettes d'un liquide dans un autre. Elles contiennent ainsi une phase dispersée et une phase continue. Selon la consistance de l'émulsion, on distingue les sticks, les crèmes et les laits, qui sont respectivement des préparations solides, semi-solides (pâteuses) et fluides. L'intérêt des émulsions provient de l'importance de l'aire interfaciale créée, permettant de contrôler les transferts de matière entre phases, mais aussi d'apporter des propriétés de texture recherchées.

Dans cette optique, et pour exploiter les avantages des émulsions, ce présent travail a pour objectif la formulation d'une crème générique à base de principes actifs anti-infectieux, sous forme d'une émulsion aqueuse simple permettant d'améliorer l'effet thérapeutique des principes actifs, notamment la biodisponibilité dermique.

La crème générique du princeps pommade (Mycocide ®) devra présenter également une certaine consistance, qui lui confère une bonne acceptabilité et un confort lors de son application sur la peau.

Ce mémoire est divisé en deux grandes parties :

- Une partie bibliographique exposée en deux chapitres : le premier chapitre, traitant des généralités sur les émulsions, leurs paramètres de formulation, ainsi que leurs fabrications et les contrôles effectuées sur ses formes dispersées. Dans le deuxième chapitre, une introduction sur les agents anti-infectieux et des notions sur les antibiotiques et les antifongiques, ainsi que le mode d'action de chaque classe thérapeutique a été exposée.
- Une partie expérimentale, où sont présentés le matériel et les techniques de formulation des émulsions étudiées ainsi que les méthodes de caractérisation adoptées avec l'ensemble des résultats interprétés.

Enfin, ce présent travail est clôturé par une conclusion générale résumant l'essentiel des résultats.

CHAPITRE I

LES EMULSIONS

I.1. Introduction

De nos jours, les émulsions sont partout. Elles sont très utilisées dans l'industrie, notamment l'industrie pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, les peintures, l'agrochimie et l'industrie pétrolière. Dans l'industrie pharmaceutique, les applications sont nombreuses : émulsions parentérales, topiques, orales ou ophtalmiques. Du fait de cette large utilisation, de nombreuses études sont en cours pour essayer de mieux comprendre le comportement des émulsions [1].

Les émulsions sont des systèmes formés par la dispersion de fines gouttelettes d'un liquide dans un autre, elles contiennent ainsi une phase dispersée et une phase continue. Elles sont en général formées de trois composants : une phase aqueuse, une phase huileuse et un tensioactif [1].

I.2. Les tensioactifs

I.2.1Généralités et définition

Les composés tensioactifs ou agents de surface ou encore surfactifs, appelés en anglais surfactants, ont la propriété de s'absorber aux interfaces, et donc de diminuer la tension interfaciale eau/huile afin de permettre la dispersion des deux liquides non miscibles (augmentation de l'aire de l'interface).

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles (Figure I.1) ils possèdent une partie polaire et une partie apolaire. La partie polaire, hydrophile, lipophobe, présente une affinité pour l'eau (soluble dans l'eau). La partie apolaire, hydrophobe, lipophile, présente une affinité pour les huiles (soluble dans l'huile) [2].

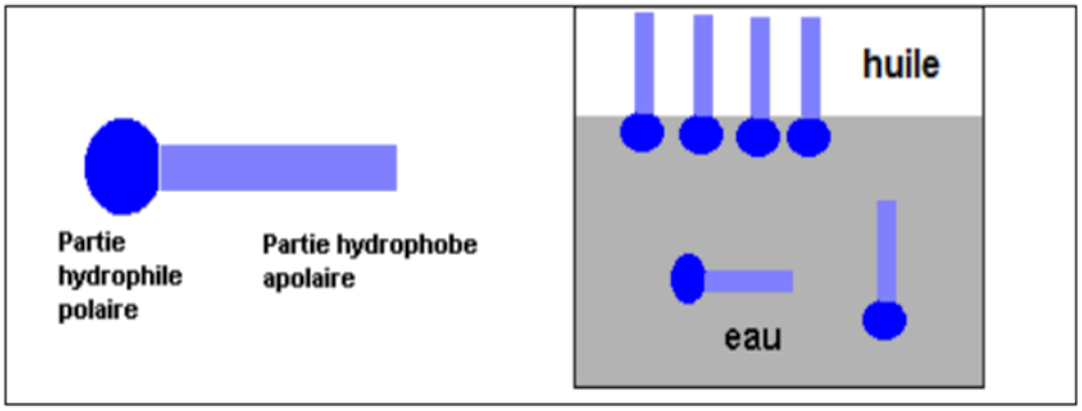


Figure I.1. Structure d'une molécule amphiphile [2]

La partie lipophile est constituée par une ou plusieurs chaînes hydrocarbonée(s) aliphatique(s), linéaire(s) ou ramifiée(s), ou aromatique(s) ou encore alkyl-aromatique(s). Le caractère hydrophobe de la partie hydrocarbonée varie avec le nombre d'atomes de carbone, le nombre d'insaturations et les ramifications. En règle générale, le caractère hydrophobe croît avec le nombre d'atomes de carbone et diminue avec le nombre d'insaturations [2].

La partie hydrophile, ou tête polaire, est constituée par un ou plusieurs groupements polaires (s), ionique (s) ou non ioniques (s). Les agents tensioactifs sont classés en fonction de la nature de la partie hydrophile puisque celle-ci gouverne leurs propriétés (Tableau I.1). On distingue les tensioactifs ioniques (anioniques, cationiques, zwitterioniques ou amphotères) et les non ioniques [2].

Tableau I.1. Classement des tensioactifs [2]



Partie lipophile	Tête hydrophile
apolaire chaîne hydrocarbonée $C_4 - C_{30}$	polaire ionique ou non ionique
Aliphatique : – linéaire – ramifiée – insaturée Aromatique Alkylaromatique Origine : – pétrochimie – huiles végétales – graisses animales	Anionique $-CO_2^-M^+$ $-OSO_3^-M^+$ $-SO_3^-M^+$ $-(RO)_n PO_{4-n}^{(3-n)-}(3-n)\,M^+$
	Cationique $-(R)_n NH_{(4-n)}^+, X^-$ $-R_4 N^+, X^-$
	Zwitterionique $-\overset{+}{N}\sim CO_2^-$ $-\overset{+}{N}\sim SO_3^-$
	Non ionique $-OR$, $-OH$, $-CO_2R$, $-CONHR$ $-(CH_2-CH_2-O)_n-$ polyol

I.2.2. Caractéristiques fondamentales des tensioactifs

I.2.2.1 Balance Hydrophile-Lipophile (HLB)

La notion de HLB, a été introduite par Griffinen 1949 et découle d'un souci de classement des tensioactifs, non par rapport à leur structure mais par rapport à leur utilisation. C'est la

méthode la plus utilisée pour caractériser les tensioactifs et exprimer leur hydrophilie ou lipophilie. La méthode consiste à attribuer à chaque tensioactif une valeur numérique qui caractérise cette balance entre les propriétés hydrophiles et lipophiles. Le choix de l'échelle fut compris entre 1 et 20. Les plus lipophiles sont en bas de l'échelle et les plus hydrophiles en haut, avec un point neutre qui se situe autour de 10 [3].

I.2.2.2. Concentration Micellaire Critique (CMC)

Lorsque le tensioactif est en concentration suffisante, les molécules de tensioactif en excès s'autoassocient en solution sous forme d'agrégats appelés micelles. La concentration à partir de laquelle un tensioactif s'autoassocie sous forme de micelles en solution aqueuse est appelée concentration micellaire critique (CMC) [4]. La valeur de la CMC est une caractéristique du tensioactif et dépend de la longueur de la chaine lipophile et de la nature de la tête polaire. Par exemple, les CMC des tensioactifs non ioniques sont plus bases que celles des tensioactifs ioniques de longueur de chaine comparable. Mais la CMC dépend également de l'environnement physico-chimique, à savoir la concentration en électrolytes ou la température [5].

I.3. Les émulsions

I.3.1. généralités et définition

Une émulsion est un système biphasique préparé en combinant deux liquides non miscibles, dans lesquels de petits globules d'un liquide sont dispersés uniformément dans l'autre liquide. Le liquide dispersé en petites gouttelettes est appelé la phase dispersée, interne ou discontinue. (Figure I.2)

L'autre liquide est le milieu de dispersion, la phase externe ou la phase continue. Lorsque l'huile est la phase dispersée et une solution aqueuse est la phase continue, le système est désigné comme une émulsion huile-dans-eau (H/E). Inversement, lorsque l'eau ou une solution aqueuse est la phase dispersée et que l'huile ou la matière grasse est la phase continue, le système est désigné comme une émulsion eau dans huile(E/H).

Les émulsions peuvent être utilisées par voie orale, topique ou parentérale, en fonction des ingrédients de la formulation et de l'application prévue [6].

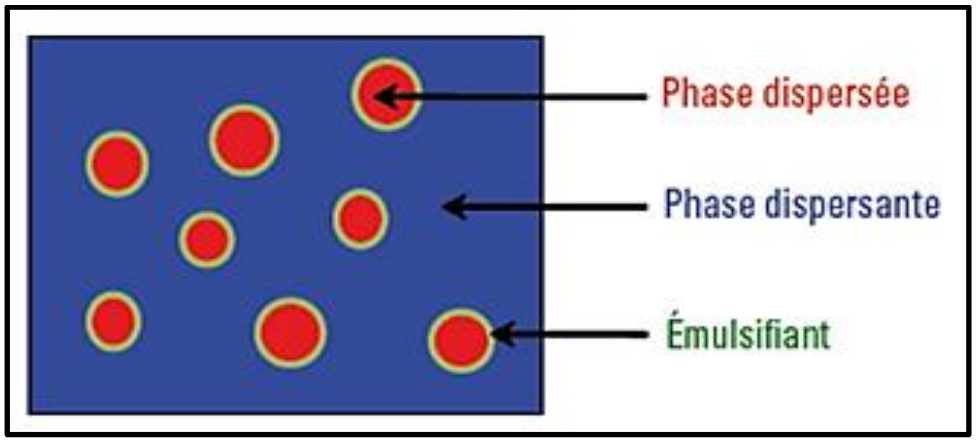


Figure I.2. Illustration d'une émulsion [7]

Les émulsions sont également classées en trois catégories en fonction de la taille des gouttelettes dispersées:

- *Les macroémulsions :* ce sont des émulsions avec des tailles de gouttelettes allant de 0,1 à 100 μm, ces tailles leur donnent une couleur blanche [8].
- *Les microémulsions* : leur taille est comprise entre 100A° et 100nm. Elles sont souvent transparentes [8,9].
- *Les nanoémulsions* : référencées à des émulsions à tailles de gouttelettes à l'échelle nanométrique, généralement de 20 à 200 nm avec un aspect transparent ou translucide [10].

Les émulsions possèdent un certain nombre d'avantages importants par rapport aux autres formes liquides [7] **:**

- Les médicaments peu solubles dans l'eau peuvent être facilement incorporés avec des taux de dissolution et une biodisponibilité améliorés.
- Le goût désagréable ou l'odeur des huiles peut être masquée partiellement ou totalement, par émulsification.
- Le taux d'absorption et la perméation des médicaments peuvent être contrôlés.
- L'absorption peut être augmentée par la taille diminuée de la phase interne.
- La formulation et la technologie pour la livraison ciblée d'organe est disponible.

I.3.2. Différents types d'émulsions

Il existe plusieurs types d'émulsions. Les émulsions simples composées de deux phases (hydrophile et lipophile) et les émulsions multiples constituées de deux phases lipophiles et d'une phase hydrophile ou de deux phases hydrophiles et d'une phase lipophile. Etant donné la complexité des émulsions multiples [7].

I.3.2.1. Les émulsions simples

Une émulsion simple est une émulsion composée d'une phase hydrophile, d'une phase lipophile et d'un émulsifiant (Tableau I.2) [7].

Tableau I.2. Les différents types d'émulsion simple [7].

Sens de l'émulsion	Phase dispersée	Phase dispersante	Symbole
Emulsion huile dans eau « Emulsion de type aqueuse »	Lipophile	Hydrophile	H/E L/H O/W
Emulsion eau dans huile « Emulsion de type aqueuse »	Hydrophile	Lipophile	E/H H/L W/O

Les émulsions simples sont appelées eau-dans-huile (E/H) quand des gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse, et huile-dans-eau (H/E) pour l'inverse [11] (figure I.3).

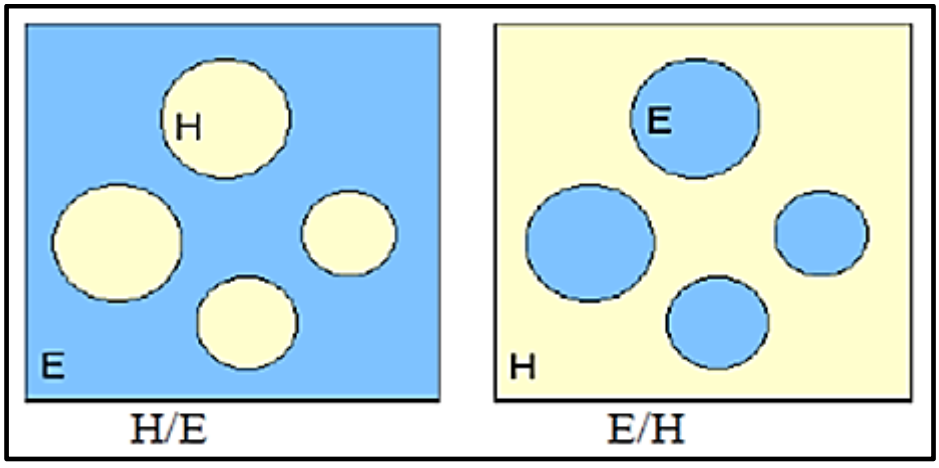


Figure I.3. Types des émulsion simple [12].

I.3.2.2. Les émulsions multiples

Les émulsions multiples sont des systèmes multiphasiques comprenant au moins deux liquides non miscibles, à savoir, deux émulsions H/L et L/H siègent des tensio-actifs hydrophiles et lipophiles qui sont utilisés pour stabiliser ces deux émulsions, respectivement

et dont l'un est dispersé sous forme de fines gouttelettes uniforme dans l'autre , ainsi sont appelées «*émulsions d'émulsions* » (Figure I.4)

Le diamètre des gouttelettes dans les émulsions multiples peut varier de *0,1 à 100* µm [13]. Les gouttelettes de l'émulsion double E/H/E devraient être d'une taille comprise entre 10-60µm, de façon à optimiser sa stabilité. Le diamètre des globules d'huile devrait atteindre préférentiellement au moins 6 fois celui du diamètre des gouttelettes aqueuses internes.

Ces valeurs sont les paramètres optimaux pour obtenir une émulsion multiple stable. De façon plus générale, les gouttelettes aqueuses internes devraient être inférieures à 10 microns et les gouttelettes externes, de taille inférieure à 100 microns [14]. Ce sont des systèmes thermodynamiquement instables, leur formulation constitue un paramètre critique à leur préparation [15].

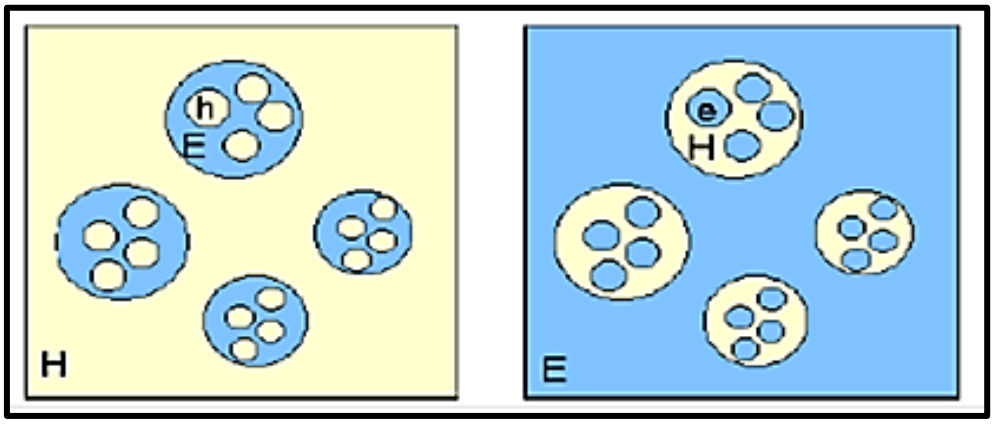


Figure I.4. Differents types d'émulsions multiples [12]

I.3.2.3. Les émulsions mixtes

Ce sont des émulsions dont la phase dispersée est constituée de gouttelettes de composés liquides différents par leur composition ou par leur concentration (figure I.5). Ces émulsions peuvent être de type (E1+E2)/H ou (H1+H2)/E [16].

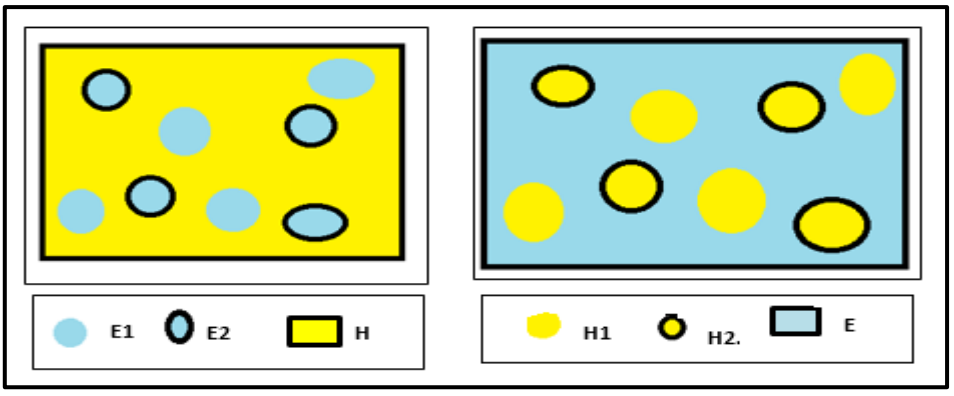


Figure I.5 Differents types d'émulsions multiples[16]

I.3.3 Mécanismes d'instabilité des émulsions

La stabilité d'une formulation revêt plusieurs aspects : physiques, chimiques et microbiologiques.

- Pour être stable physiquement, l'émulsion ne doit pas montrer de démixtion, qui peut être provoquée soit par de la coalescence, soit par un phénomène de crémage/sédimentation. La stabilité physique inclut aussi une invariance du comportement rhéologique et de la granulométrie.
- La stabilité chimique repose sur le fait qu'aucun des composants de l'émulsion ne doit participer à une réaction chimique pouvant soit modifier de manière grave la stabilité physique, soit perturber les propriétés applicatives (aspect, couleur, odeur, efficacité).
- Enfin, la formulation, pour être stable microbiologiquement, ne doit pas être un milieu de culture pour levures, moisissures, et germes bactériens [17].

Les émulsions étant thermodynamiquement instables, leurs propriétés vont se modifier dans le temps (Figure I.6.).

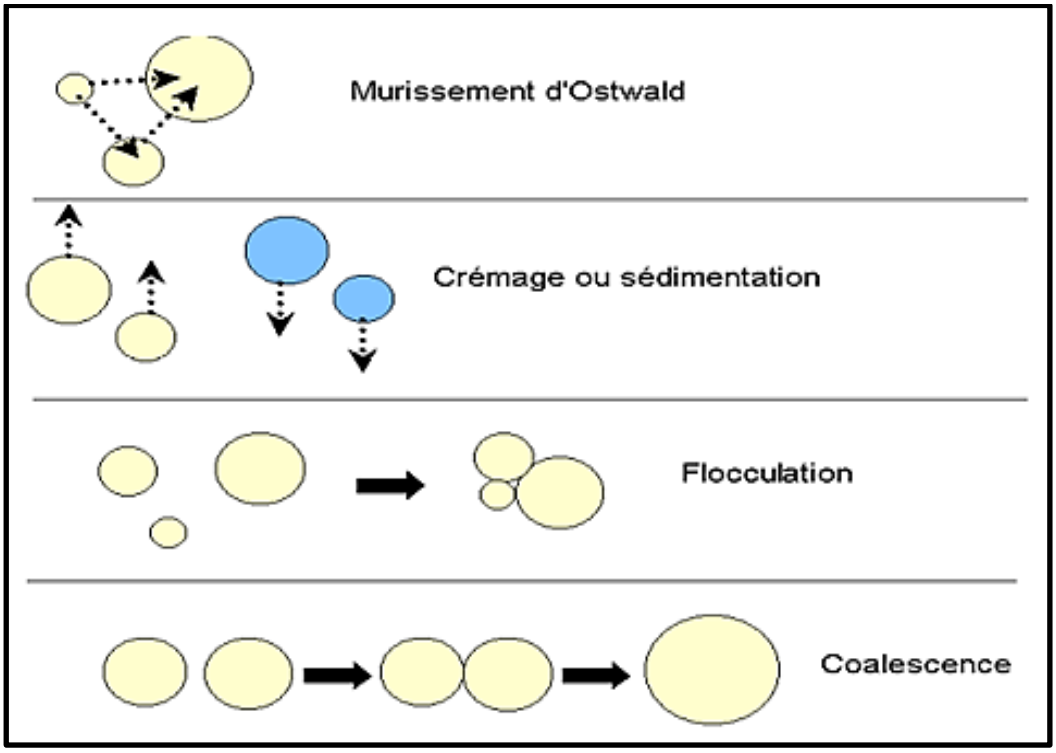


Figure I.6. Processus de déstabilisation d'une émulsion [12]

Les différentes formes d'instabilités des émulsions sont les suivantes :

I.3.3.1. Sédimentation et crémage

Ce mécanisme résulte de la différence de densité entre la phase dispersée et la phase continue (Figure I.7). On parle de crémage quand il s'agit d'une ascension de la phase dispersée et de sédimentation quand la phase dispersée chute pour revenir à l'émulsion **[**11].

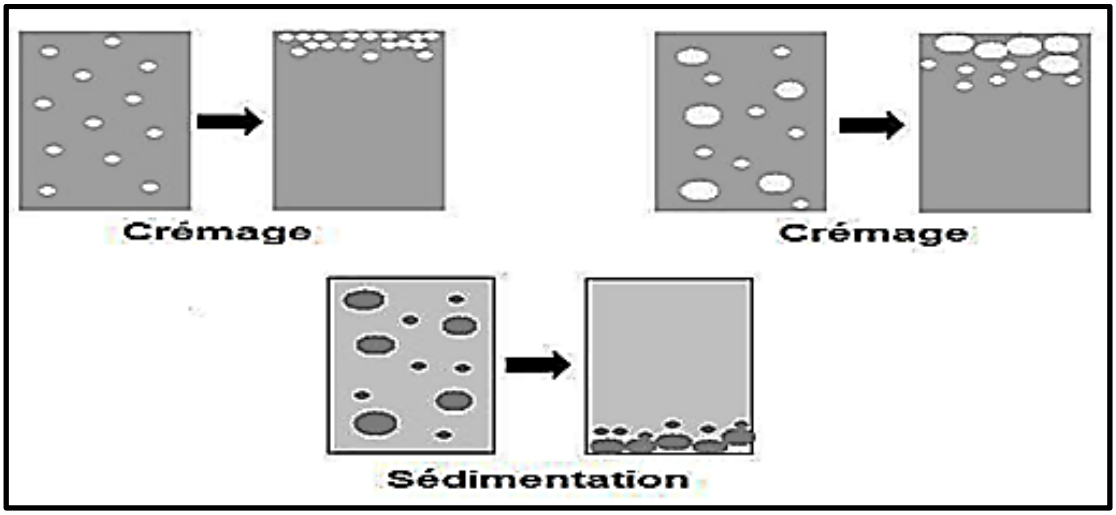


Figure I.7. Phénomènes de crémage et de sédimentation [11]

Pour limiter ce phénomène, on a plusieurs possibilités :

- Réduire la taille des gouttes de phase dispersée,
- ajouter un agent qui augmente la viscosité,
- diminuer la différence de densité entre les deux phases,
- éviter l'agrégation des gouttes.

I.3.3.2. Floculation

Ce mécanisme résulte de l'agrégation des gouttelettes due aux interactions attractives. L'énergie d'interactions entre les particules est due à la somme des forces de répulsions électrostatiques et au potentiel d'attraction de type Van der Waals. Ce phénomène peut être réversible lorsque l'attraction est peu énergétique ou irréversible lorsqu'elle est très énergétique (Figure I.8).

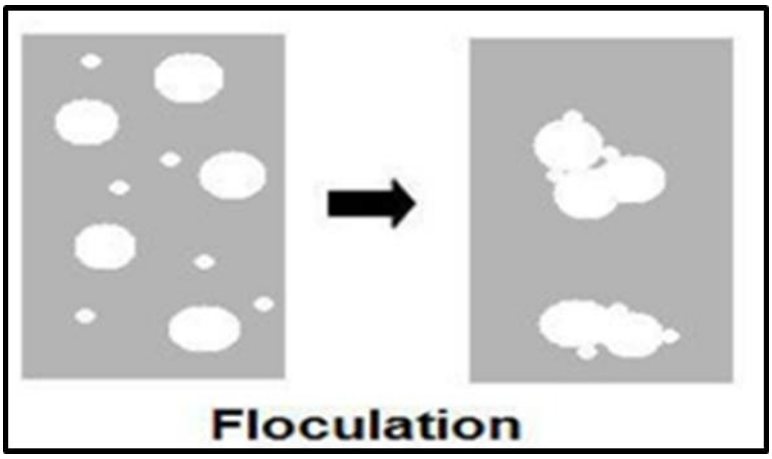


Figure I.8. Phénomène de floculation [11]

Pour éviter ce phénomène, il faut :

- Éviter le crémage et la sédimentation (car ces phénomènes mettent les gouttes en contact),
- Augmenter les répulsions stériques et électrostatiques (en utilisant des tensioactifs ioniques par exemple).

I.3.3.3. Coalescence

Ce mécanisme, irréversible, résulte de la rupture du film interfaciale entre les gouttes de la phase dispersée. Deux ou plusieurs gouttes fusionnent pour former une goutte plus grosse comme le montre la figure I.9.

Le processus se répétant, l'aire interfaciale devient de plus en plus petite et la phase dispersée démixte, et à terme on revient au système diphasique de départ. C'est un processus énergétiquement favorable [11].

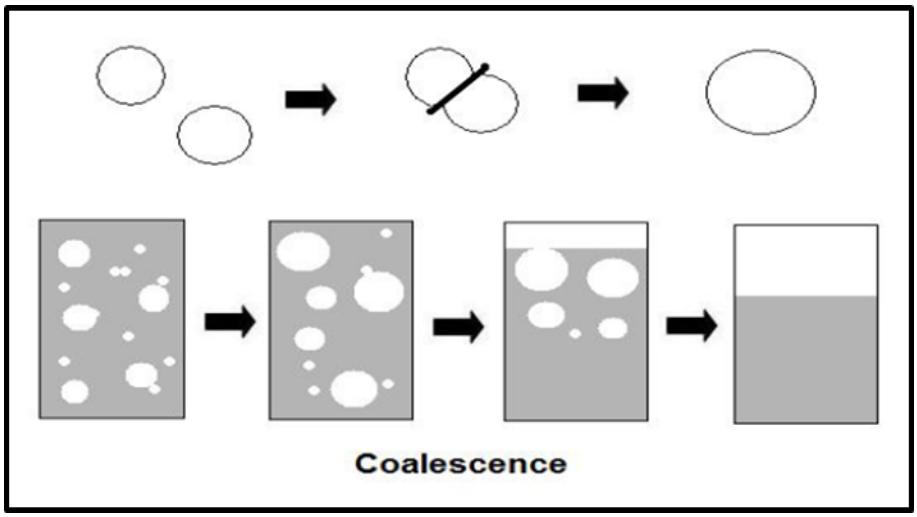


Figure I.9. Phénomène de coalescence [11]

I.3.3.4. Mûrissement d'Ostwald ou diffusion moléculaire

Il existe toujours une solubilité partielle de la phase dispersée dans la phase continue. A l'issue de l'étape d'émulsification, la population de gouttelettes n'est pas homogène en taille. Il existe un flux de matière des petites vers les grosses gouttes, au travers de la phase continue. Les petites gouttes se vident au profit des grosses, et la granulométrie se modifie puisque les classes de faible taille disparaissent (Figure I.10). Ce phénomène irréversible constitue le mûrissement d'Ostwald.

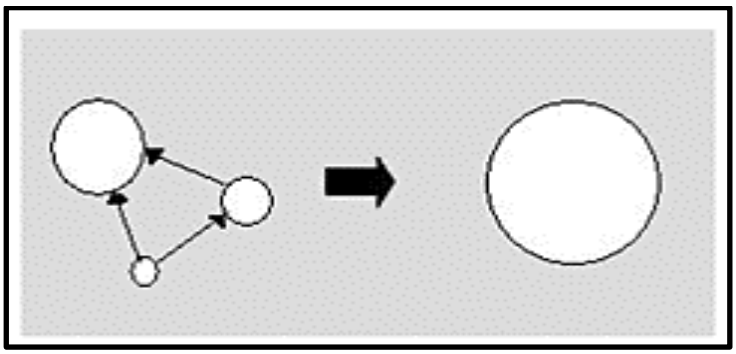


Figure I.10. Phénomène de mûrissement d'Ostwald [11]

Ce phénomène est en pratique peu gênant dans la plupart des émulsions fabriquées. Par contre, il est prédominant dans le cas de microémulsions.

Ce phénomène peut être évité par :

- Une mono dispersion de la population de gouttelettes,
- une diminution de la solubilité en ajoutant du sel dans une émulsion E/H ou un soluté apolaire de masse molaire élevée pour une émulsion H/E,
- Un tensioactifs faisant barrière à la diffusion de molécules de la phase dispersée [11].

I.3.3.5. Inversion de phase

L'inversion de phase, représenté sur la figure I.11, est un phénomène qui traduit par un changement du sens de l'émulsion c'est-à-dire une transformation d'une émulsion E/H en une H/E ou inversement Elle peut être induite par :

- La proportion de phase dispersée.
- La température.

L'inversion de phase est aussi liée à d'autres facteurs tels que, la nature de la phase huileuse, la nature et la concentration des sels existant [11].

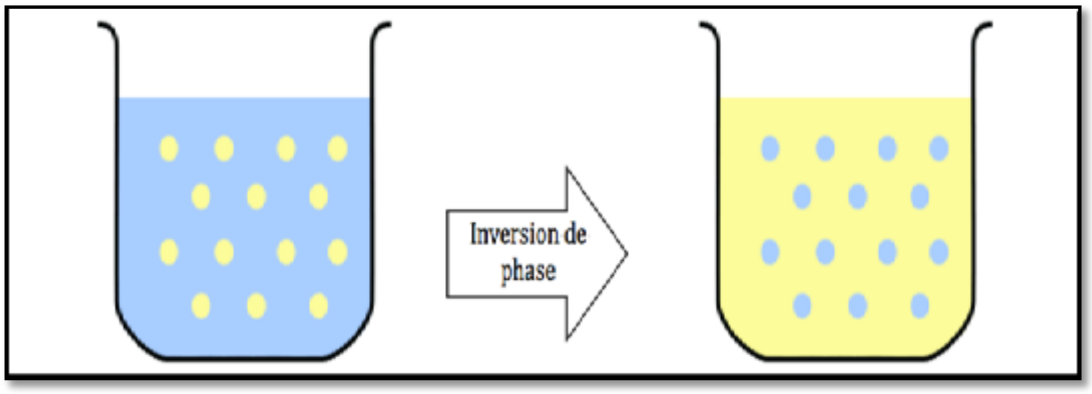


Figure I.11. Phénomène d'inversion de phase [19]

I.3.4. Stabilisation des émulsions

Une émulsion est un système qui n'est pas à l'équilibre thermodynamique, la stabilité des émulsions n'existe que parce que le formulateur est capable de ralentir ou d'inhiber les mécanismes physiques qui conduisent normalement à la démixtion des phases non miscibles. On peut trouver quatre types de stabilisation : rhéologique, stérique, électrostatique et électrostérique [20].

I.3.4.1. Stabilisation rhéologique

Il s'agit de l'incorporation d'additifs qui permettent d'augmenter la viscosité de la phase continue, tels que les polymères viscosifiants ou certains tensioactifs, de manière à ce que les gouttes dispersées soient moins mobiles et que la probabilité de choc diminue [20].

I.3.4.2. Stabilisation stérique

Cette méthode de stabilisation consiste à ajouter des macromolécules de type non ionique, qui s'adsorbent à l'interface des gouttelettes, tels que les polymères amphiphiles. Ces couches macromoléculaires agissent en créant une barrière physique qui augmente la distance entre les gouttes. Ce phénomène peut être interprété de deux manières :

La première théorie est due à un effet entropique, parce que les chaînes adsorbées se compriment, en réduisant leur volume, ce qui entraîne une réduction de l'entropie et provoque la répulsion désirée.

La deuxième, porte sur une répulsion osmotique basée sur l'interpénétration des couches adsorbées. Il y a une augmentation de la concentration en segments polymères dans la région de recouvrement et une réduction de l'entropie configurationelle. En conséquence, la pression osmotique dans cette région augmente, ce qui tend à séparer les gouttes entre elles. Ce type de stabilisation peut aussi se produire par l'ajout de particules solides comme le talc ou la nacre micronisée [20].

I.3.4.3. Stabilisation électrostatique

Dans un milieu aqueux, une particule acquiert une charge électrique en surface qui dépend de la structure de la particule, de la présence de groupements ionisables et/ou de l'adsorption sélective d'ions présents dans le milieu. Il apparaît alors une charge superficielle, positive ou négative selon le pH du milieu. Les ions avec une charge de signe opposé à celle de la particule (contre-ions) vont se concentrer autour de sa surface, tandis que les ions avec la charge de même signe (co-ions) seront repoussés vers l'extérieur. Loin de la surface, la concentration en ions positifs et négatifs est la même, ce qui induit un milieu électriquement neutre [20]. Cette distribution non homogène est appelée double couche électrique. Elle est représentée graphiquement sur la figure I.12.

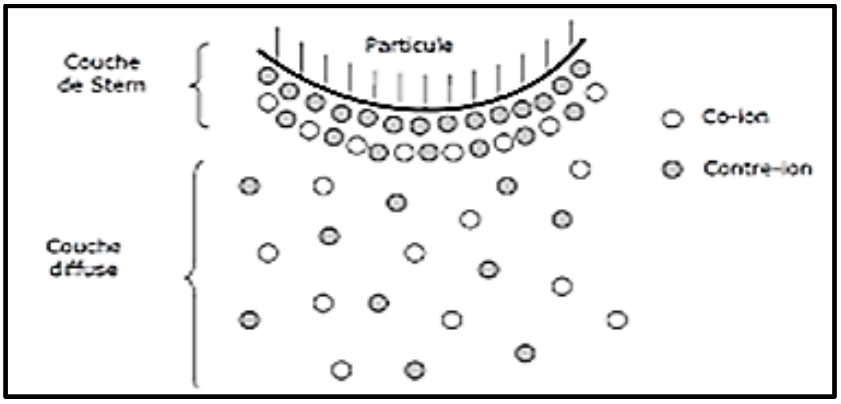


Figure I.12. Double couche électrique [20]

Lorsque deux particules chargées se rapprochent, chacune avec sa charge ionique, l'interpénétration des doubles couches électriques va générer un potentiel de répulsion électrostatique. Il faut noter que l'ajout de sel au système fait augmenter la force ionique, ce qui restreint la double couche en réduisant la portée de la répulsion, ce qui peut générer des effets d'agrégation [20].

La présence d'espèces adsorbées chargées comme dans les tensioactifs ioniques, peut évidemment produire le même effet, en générant une zone de charge nette non nulle près de l'interface et la répulsion correspondante [20].

I.3.4.4. Stabilisation électro stérique

Il s'agit d'une combinaison des deux effets expliqués antérieurement, provoquée par des macromolécules présentant des groupements ioniques distribués dans la chaîne principale ou

dans les ramifications. Ces molécules apportent un effet stérique (stabilisation à courte portée) et un effet électrostatique (stabilisation à longue portée) à la particule [20].

Dans ce type de stabilisation, on distingue l'utilisation de différentes gommes telle que la gomme xanthane, un polysaccharide utilisée pour stabiliser les systèmes dispersés, qui est le principal objectif de cette présente étude.

I.3.5 Stratégies de formulation des émulsions

I.3.5.1. Méthodes de préparation

La fabrication des émulsions doit prendre en compte les « variables de composition » ou de formulation (nature et proportion des phases, choix et quantités d'additifs, en particulier émulsifiants) et les conditions dans lesquelles ces émulsions sont produites (température…) : ces paramètres conditionnent le type de l'émulsion. D'autre part, les « variables de procédé » relatives à la technique d'emulsification (types d'agitation : pale, turbine, ancre… vitesses et temps d'agitation, mélangeur statique, procédé à membrane, etc.) et au mode opératoire (ordre d'introduction des constituants, températures à respecter aux différentes étapes de la préparation), déterminent en grande partie la qualité de l'émulsion (finesse et stabilité) [21].

Généralement, l'émulsification se décompose en deux étapes successives [21] :

- Une étape de dispersion-mélange que l'on appelle pré-émulsification et qui va conduire à une simple mise en suspension de gouttelettes de la phase dispersée dans la phase continue (gouttes de l'ordre de 100µm) (figure I.13.a).
- Une étape d'homogénéisation dont le but est de réduire la taille des gouttes de façon à conférer a l'émulsion les propriétés requises et a la stabiliser (figure I.13.b).

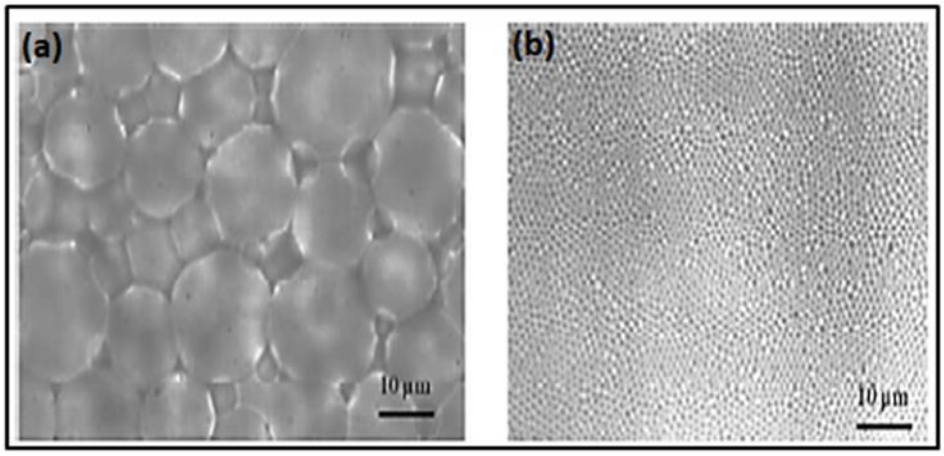


Figure I.13. Image de la microscopie optique : **(a)** émulsion primaire, **(b)** émulsion après homogénéisation[21]

Ces deux opérations s'effectuent dans des cuves agitées ou dans des conduites munies d'outils de dispersion et homogénéisation (dispositif rotor-stator).

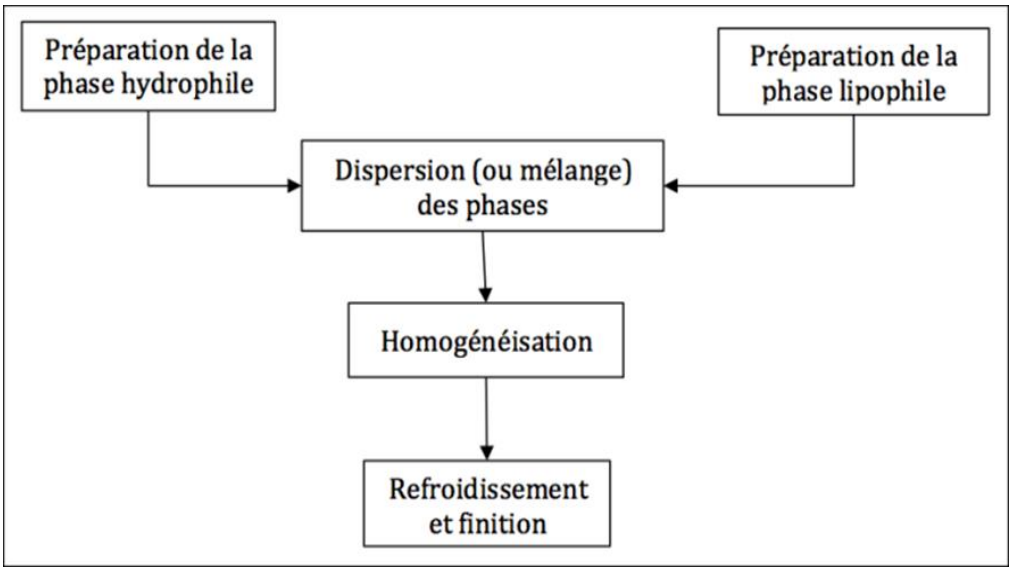


Figure I.14. Schéma de formulation d'une émulsion

I.3.5.2. Variables influençant le type d'émulsion

Il existe trois catégories de variables qui influencent le type de l'émulsion [22,23] :

I.3.5.2.1 Variables de formulation : Il s'agit de tous les paramètres physico-chimiques comme la température, la pression, le pH, la nature des constituants et le type d'électrolytes [22.23].

Pour que l'émulsion soit persistante (c'est-à-dire que l'état dispersé demeure lorsque l'agitation mécanique cesse), il est nécessaire d'utiliser un agent émulsionnant.

Parmi les agents émulsionnants, citions les tensioactifs, les polymères et les solides divisés. Un émulsionnant ou émulsifiant peut agir sur la stabilité d'une émulsion de trois façons [21] :

1- Soit en diminuant la tension interfaciale entre les deux liquides, donc augmentation de la surface de séparation ; c'est le des surfactifs dont les molécules viennent former un film à l'interface. Une extrémité de chaque molécule se plaçant dans l'eau et l'autre dans l'huile.

2- Soit en augmentant la viscosité de la préparation, cas des gommes par exemple.

3- Soit en agissant à la fois sur la tension interfaciale et sur la viscosité ; c'est ce qui se produit lorsqu'on met un surfactif non-ionique en excès. Une partie agit à l'interface, pour baisser la tension interfaciale, et l'autre augmente la viscosité de la phase aqueuse dispersante.

I.3.5.2.2. Variables de processus : Ce sont les variables associées au protocole d'émulsification comme l'ordre d'incorporation des composants, la géométrie du dispositif d'agitation, la vitesse d'agitation ou l'énergie mécanique fournie[22.23].

En discontinu, la position e l'agitateur et la vitesse d'agitation pouvaient déterminer le type de dispersion créée E/H ou H/E. Il a été vérifié que la phase ou est placé l'agitateur devient la phase continue. De plus, le protocole d'incorporation, spécialement la dynamique d'introduction de la deuxième phase, joue un rôle primordial sur la taille de gouttes [21].

La taille moyenne des gouttes de phase dispersée diminue lorsque la vitesse de rotation augmente jusqu'à l'obtention d'un palier, les autres paramètres étant maintenus constants. La forme de la courbe de distribution de taille varie depuis une distribution normale vers une distribution log-normale en augmentant la vitesse d'agitation. En effet, l'augmentation de la vitesse de rotation induit des zones de turbulences plus fortes, ce qui favorise la rupture au détriment de la coalescence.

Ces observations sont valables quelles que soient la vitesse d'agitation et la concentration initiale en tensioactif : elles confirment l'existence d'un équilibre dynamique entre rupture et coalescence [21].

La taille moyenne des gouttes décroit en fonction de la durée d'agitation et se stabilise au-delà d'une durée optimale ; ce comportement est typique des dispersions préparées en régime turbulent. Dans les premières secondes de l'émulsification, le diamètre moyen très rapidement puis atteint lentement une valeur limite qui résulte de l'équilibre entre les processus de rupture et de coalescence[24]. Toutefois, il faut signaler que, dans certains cas, la taille des gouttes n'est pas strictement constante, même pour des temps d'agitation très longs. En effet, les fluctuations de l'énergie dissipée dans la cuve peuvent être assez énergétiques pour induire la rupture des gouttes.

Un autre aspect important à considérer est l'évolution de la distribution de taille des gouttes en fonction de la durée de l'agitation .En général, la distribution de taille tend à devenir plus étroite en fonction de la durée de l'agitation. Sous agitation, une distribution de taille bimodale peut évoluer vers une distribution monomodale. Cependant, pour des émulsions concentrées, l'augmentation de la durée d'agitation peut, au contraire, provoquer l'apparition d'une distribution bimodale, qui s'explique par l'augmentation de la viscoélasticité du milieu avec la diminution de la taille de la goutte.

I.3.6.Contrôle des émulsions

Une émulsion est d'autant plus stable qu'elle pourra résister, dans des conditions déterminées, aux phénomènes de destruction (mûrissement d'Ostwald, coalescence et inversion de phase) et aux tendances à l'inhomogénéité (crémage et sédimentation, floculation) [8].

I.3.6.1. Contrôle macroscopique

Ce test est basé sur les critères suivants :

a. Caractères visuels

- **Aspect :** il dépend de la nature des phases constituantes et de l'état du principe actif, il peut être brillant, satiné ou mat ou bien transparent, translucide ou opaque.
- **Consistance :** elle revêt différents qualitatifs, il est possible par exemple de décrire une rigidité compacte ou filante ou une gélification, ferme ou tremblante.
- **Homogénéité :** elle est primordiale et doit être vérifié au niveau de l'aspect qui est lisse ou granuleux et de la couleur.

b. ***Critères olfactifs :*** Il faut détecter d'une part la présence ou l'absence de particules étrangères et d'autre part l'odeur typique (PA, excipients, parfums).

c. ***Critère tactile :*** C'est l'aspect d'étalement sur le revêt de la main, si la préparation n'est pas caustique, il faut préciser le toucher qui peut être gras, évanescent, collant, granuleux, lisse, ou rugueux [17].

I.3.6.2. Examen microscopique

L'examen microscopique est le premier essai effectué pour identifier les systèmes obtenus. Il constitue un excellent moyen pour suivre la stabilité de ces systèmes lors du vieillissement. Le microscope optique est une méthode d'analyse usuelle pour la multiplicité des systèmes, cette méthode permet d'avoir une idée sur la taille des globules aqueux internes souvent de l'ordre du micromètre [6].

I.3.6.3. Détermination du sens de l'émulsion

Pour lever toute ambiguïté sur le sens d'une émulsion, il convient de réaliser une des méthodes proposées [18].

- **Méthode de dilution :** Elle correspond à introduire dans un tube à essai contenant de l'eau une petite quantité de l'émulsion, si cette dernière surnage sur l'eau, c'est que la

phase continue est huileuse. Dans le cas contraire, on assiste à une dispersion facile, et on a une émulsion à phase continue aqueuse.

- **Méthode de coloration :** C'est l'introduction d'un colorant de nature connue. Si le colorant est liposoluble et l'émulsion est de type E/H on a la propagation de la couleur, si non l'émulsion est de type H/E. Les émulsions de type H/E sont colorée par les colorants hydrosolubles.
- **Méthode de mesure de la conductivité électrique :** La conductivité électrique est celle de la phase continue. L'émulsion est conductrice de l'électricité si elle est de type H/E, et non conductrice si elle est de type E/H.

I.3.6.4. Contrôle de stabilité

La stabilité d'une émulsion peut être appréciée dans une éprouvette graduée, par l'observation à intervalles réguliers de la sédimentation, de crémage, de la coalescence et de la séparation de phase. D'autres types de contrôles de la stabilité peuvent être ajoutés [18]:

- **Stabilité à la centrifugation :** Cette détermination est utilisée comme test prévisionnel de stabilité des émulsions par de nombreux auteurs, fixant une limite d'un certain nombre de tours/minute pour lesquelles aucun phénomène d'instabilité n'est apparu (déphasage ou crémage) [6].
- **Stabilité aux températures élevées de stockage :** Les échantillons sont stockés à des températures et pendant des durées définies suivant une procédure bien établies .Les températures du stockage variée généralement entre 5 et 55°C pendant des périodes allant de 3 mois , 6mois , 1an , et peuvent aller jusqu'à 4 ans [6].

I.3.6.5. Contrôle microbiologique

Les émulsions de type H/E peuvent être contaminées puisqu'elles contiennent des hautes teneurs en eau qui favorise la prolifération bactérienne [19].

I.3.6.6. Détermination de pH

Ce contrôle n'est pas spécifique. Cette détermination se fait avec des réactifs colorés ou des pH mètres [6].

I.3.6.7. Qualité de l'émulsification

La qualité de l'émulsification, en relation avec le procédé utilisé, concerne principalement la taille des gouttelettes formées, leur interaction, et éventuellement l'état de dispersion des

polymères viscosifiants ou la cristallisation de principes actifs ou d'adjuvants. Pour cela, on utilise plusieurs techniques pour apprécier la qualité de l'émulsification [20].

- **Granulométrie :** il existe de nombreuses techniques pour déterminer la granulométrie d'une émulsion, c'est-à-dire déterminer la distribution en taille des gouttelettes formées. Actuellement on utilise des granulomètres laser.
- **Turbidité :** l'émulsion est éclairée par un faisceau lumineux monochrome, et l'on mesure l'intensité transmise. Selon les valeurs de la turbidité, on peut évaluer la qualité de l'émulsion multiple.
- **Diffraction laser :** cette technique s'intéresse surtout à la dépendance angulaire de l'intensité diffusée. Une particule sphérique diffusante n'émet en effet pas de manière homogène dans l'espace, et l'étude de la variation d'intensité diffusée lorsque l'on se déplace autour de la particule renseigne sur la taille. Pour une population de gouttelettes, le PA reste le même, la contribution de chaque particule étant additive à l'ensemble.

I.4. Conclusion

Ce chapitre sur la physico-chimie des émulsions montre la complexité de la formulation et de la stabilisation de ces systèmes. Beaucoup de paramètres physico-chimiques sont à considérer pour contrôler la stabilisation de l'émulsion. Le choix de l'émulsifiant semble être un paramètre clé pour l'émulsification.

De nouvelles études sont basées récemment sur la formulation des émulsions sans tensioactifs, cela peut s'effectuer par la stabilisation stérique et électrostatique en utilisant des particules colloïdales telles que les polysaccharides. En effet, il est possible d'utiliser des biopolymères pour améliorer la stabilité des émulsions telles que les polysaccharides qui ont un caractère émulsionnant naturel pour éviter l'usage des tensioactifs synthétiques et s'orienter vers l'obtention des émulsions stables pour protéger la santé humaine.

CHAPITRE II

LES ANTI-INFECTIEUX

II.1. Introduction

L'adjectif anti-infectieux sert à définir un médicament préconisé dans le traitement des infections d'origine microbienne. Les antibiotiques, les antiviraux et les antiseptiques font partie des médicaments anti-infectieux.

De manière simplifiée un antibiotique est, dans le domaine médical, « une substance chimique organique d'origine naturelle ou synthétique inhibant ou tuant les bactéries pathogènes à faible concentration et possédant une toxicité sélective ». Par toxicité sélective, on entend que celle-ci est spécifique des bactéries et que la molécule antibiotique n'affecte pas l'hôte infecté, au moins aux doses utilisées pour le traitement.

Les antifongiques sont aux champignons ce que les antibiotiques sont aux bactéries. Ils sont donc utilisés pour lutter contre les infections locales ou profondes à champignons microscopiques.

Cette partie fait le point sur les différents antibiotiques et antifongiques existent, leurs classifications et leurs modes d'action.

II.2. Les antibiotiques

Un antibiotique est une substance antibactérienne naturelle ou synthétique d'origine microbienne ou synthétisée chimiquement, capable d'inhibé spécifiquement la croissance d'autres micro-organismes par un mécanisme particulier jouant sur les mécanismes vitaux du germe [25]. Pour qu'il soit actif, un antibiotique doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne [26]**.**

II.2.1. Mode d'action des antibiotiques

On considère les antibiotiques comme le groupe le plus important de médicaments pour la médecine. À côté de leurs propriétés de lutter contre les infections humaines dues aux bactéries pathogènes, ils sont également utilisés en médecine vétérinaire [27]. Les antibiotiques agissent à un niveau précis dans les structures bactériennes et chaque famille possède son site d'action propre (figure II.1).

II.2.1.1. Action sur la paroi bactérienne : La Bacitracine, Pénicilline, Céphalosporines agissent sur les germes en croissance inhibent la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité, ce qui lui permet de résisté à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) [28].

Or, la pénicilline est un antibiotique qui empêche la synthèse de peptidoglycane ; par conséquent, la paroi cellulaire est grandement affaiblie, et la cellule finit par se lyse. Puisque la pénicilline agisse seulement sur les cellules en croissance active [29].

II.2.1.2. Action sur la structure de la membrane : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échange électrolytique avec le milieu extérieur [30]**.**

II.2.1.3. Action sur la synthèse protéique sur les ribosomes : ce qui entraine l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéine anormale. Les aminoglycosides ou aminosides (Streptomycine, gentamycine, amykacine), empêchent la traduction de l'ARNm en se fixant sur la petite sous-unité des ribosomes [31]**.** Les phénicols (chloramphénicol, thiamphénicol) bloquent la formation de la liaison peptidique sur la grosse sous-unité du ribosome bactérien. Les cyclines (tétracycline, doxycycline) bloquent l'élongation de la chaine peptidique en se fixant sur la petite sous-unité [30] les macrolides et les kétolides (érythromycine, azithromycine) bloquent l'élongation de la chaine peptidique [32]**.** La puromycine copie l'extrémité d'un ARNt, prend sa place dans le ribosome et bloque l'élongation de la chaine peptidique.

II.2.1.4. Action sur la synthèse de l'ADN : Certaines familles d'antibiotiques empêchent la réplication d'ADN en bloquant la progression de l'ADN polymérase. L'actinomycine bloque la progression de l'ARN polymérase. Les sulfamides provoquent une inhibition de la synthèse des bases nucléiques et la cellule meurt par carence en bases nucléiques [30]**,** les quinolones et les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase [33]**.**

II.2.1.5.Autres actions : en agissant entant qu'antimétabolites bactériens (c'est-à-dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries), par exemple en agissant sur le métabolisme de l'acide folique [29]**.**

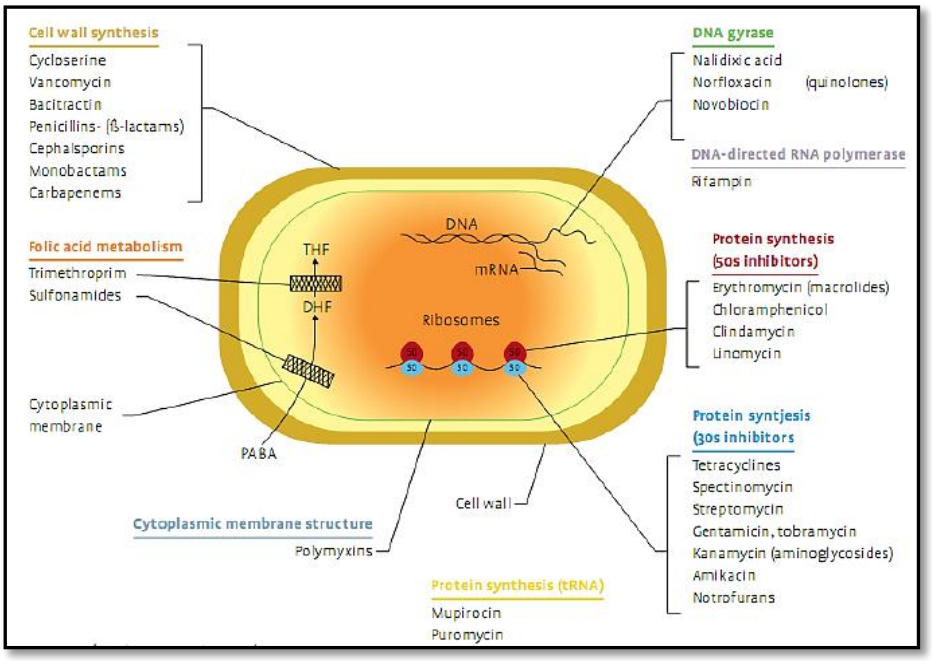


Figure II. 1. Mode d'action des antibiotiques [34]

II.2.2.Critères de classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- **L'origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit synthèse (synthètique ou semi synthètique).
- **Le mode d'action** : paroi ,membrane cytoplasmique , synthèse des protèines, synthese des acides nucléiques .
- **Le spectre d'activité** :liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).
- **La nature chimique** : très variable,elle est basée souvent une structure de base (ex :cycle béta-lactamine) sur lesquelles il y a ensuite hémi synthèse.

Les classifications selon la nature chimique permet de classer les antibiotiques en familles (beta-lactamines,aminosides,tétracyclines ….etc)

II.2.3. La Néomycine

Les néomycines constituent un ensemble ou plusieurs aminosides voisins produits notamment par s*treptomyces fradiae.* La génine est unie suivant les cas à une ou deux unités de sucres (figure II.2). La néomycine à usage thérapeutique, inscrite à la pharmacopée est sous forme sulfate contenant 8 % d'eau [35].

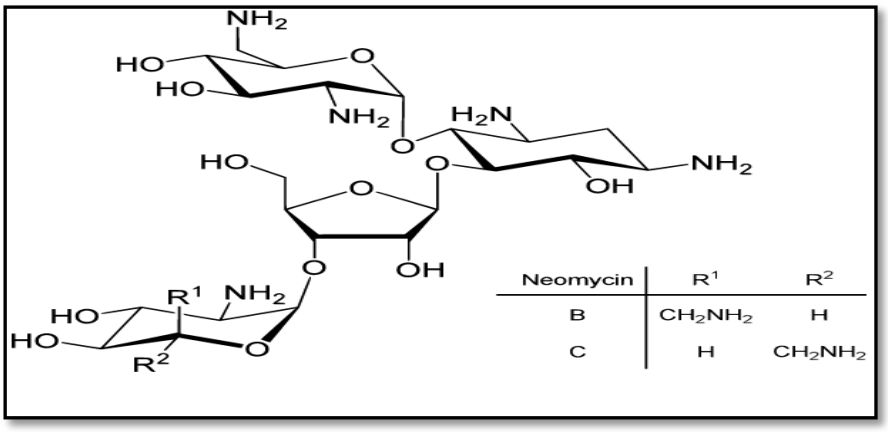


Figure II. 2. Structure chimique de la néomycine [35]

Comme tous les aminosides naturels, la néomycine est obtenue par fermentation à partir des souches bactériennes [35].

Les microorganismes producteurs de la néomycine sont :

- *Les Streptomyces fradiae,*
- *Les Streptomyces albogriseolus,*
- *Les Streptomyces decaris*

L'action de la néomycine est proche de celle de la streptomycine avec une sensibilité supérieur vis-à-vis des salmonelles. Les phénomènes résistance sont plus discrets, sans doute par suite d'un usage moins intensif. Par contre, sa néphrotoxicité est sensiblement plus élvée que celle des aminosides du groupe précédent, ce qui exclut un emploi par voie systématique.

D'autre part, la néomycine n'est pas absorbée par la muqueuse intestinale et, en définitive, elle est surtout intéressante pour traiter par voie orale des infections intestinale à Gram – est pour assurer une couverture antibiotique en chirurgie digestive. Elle entre dans la formule d'un assez grand nombre d'association à visée anti-infectieuses locale.

Lors de son emploi en ORL, on devra se méfier d'un passage accidentel dans la circulation à travers la muqueuse, avec risque de toxicité rénale et, bien entendu, cochléovestibulaire en cas d'usage prolongé [35].

II.3.Les antifongiques

Les antifongiques sont des agents capables d'inhiber la croissance des différents champignons isolés en mycologie médicale. Alors que de nombreux antibiotiques antibactériens sont apparus depuis 1945, le nombre d'antifongiques est très restreint.

La nature des molécules utilisées pour combattre les champignons rencontrés en pathologie humaine a grandement évolué au cours des dernières décennies. Toute substance susceptible

d'agir sur la cellule fongique doit être capable de traverser la paroi chitineuse et épaisse du champignon. Parmi les plus anciennes, on trouve l'iode sous forme d'iodure de potassium, utilisée encore de nos jours pour le traitement de la sporotrichose, ainsi que certains dérivés organiques iodés (polyvinylpyrrolidone), des produits soufrés (pyrithione, sulfure de sélénium, tonalfate) et des acides organiques, encore employés dans le traitement de certaines mycoses superficielles. A partir des années 1950, ces substances ont laissé place à des substances d'origine naturelle (polyènes), et plus récemment à des substances synthétiques (5-fluorocytosine, azolés) ou semi-synthétiques (candines) (Figure II.3) [36].

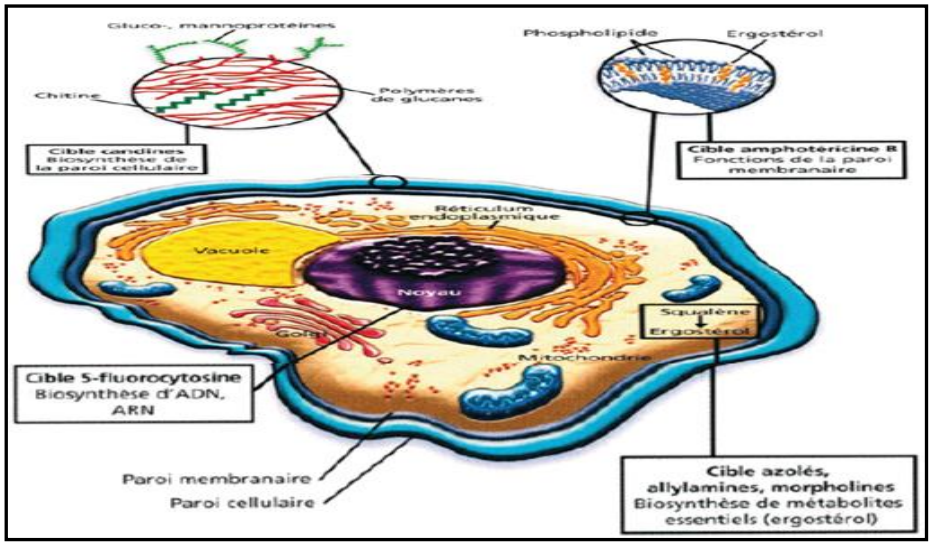


Figure II. 3. Cible des différents antifongiques [37]

II.3.1. Classifications des antifongiques

II.3.1.1. Les antifongiques naturels

II.3.1.1.1. Les polyènes : Les polyènes ont une structure complexe caractérisée par un nombre variable de doubles liaisons conjuguées CH=CH. Les polyènes sont extraits de la culture de Streptomyces à partir des années 1950, les principaux représentants de cette classe sont la nystatine (extraite en 1950 à partir S. noursei) et l'amphotéricine B (extraite en 1955 à partir S.nodosus). Il existe une relation entre la sensibilité des champignons aux polyènes et la teneur en stérol de leur membrane plasmique : les organismes dépourvus de stérols sont résistants aux polyènes [38].

II.3.1.1.2. L'amphotéricine B (AmB) : L'amphotéricine B agit sur la membrane cytoplasmique du champignon. Elle possède une forte affinité pour l'ergostérol, principal constituant de la membrane, avec lequel elle va former un anneau de 8 molécules d'AmB

reliées de manière hydrophobe aux stérols de la membrane fongique (Figure II.4) [39]. Ce complexe forme un port au travers duquel les ions monovalents vont s'échapper. L'altération de la perméabilité de la paroi conduit à la mort du champignon : l'AmB est fongicide [40].

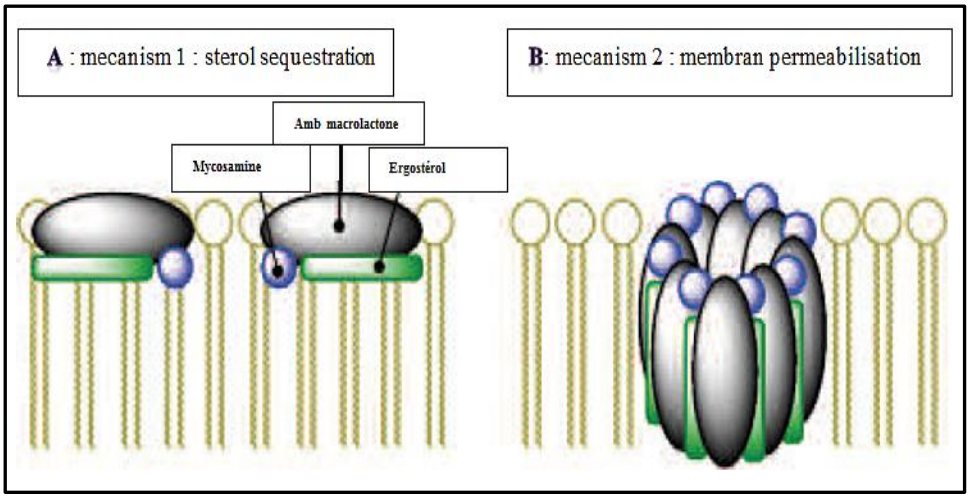


Figure II. 4. Mécanisme d'action de l'Amphotéricine B [39]

Cependant, l'AmB n'est pas spécifique de l'ergostérol, elle interagit également avec les stérols des mammifères (cholestérol), ce qui explique sa toxicité. Pour réduire ces effets secondaires délétères, de nouvelles formulations ont vu le jour depuis les années 1990 : préparations liposomales (Ambisome®) ou lipidiques (Abelcet®) et suspensions colloïdales (Amphotec®) [40].

Le spectre de l'AmB est très large et comprend la majorité des levures pathogènes (Candida, Cryptococcus) et certains champignons filamenteux (Aspergillus fumigatus). Les concentrations minimales inhibitrices sont de l'ordre de 0,25 à 1µg/mL selon des critères de mesure établis par le NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standards).

Cependant, certains champignons sont moins sensibles, voire résistants à l'AmB : Candida lusitaniae, Candida guillermondii, Aspergillus terreus, certaines espèces de Fusarium, Scopulariopsis, Scedosporium. [40].

L'AmB ne franchit pas la barrière intestinale, seule la voie sanguine permet d'obtenir des concentrations plasmatiques satisfaisantes. Sa demi-vie est de 24 à 48 heures, sa fixation aux protéines plasmatiques est élevée, 90 % et elle diffuse au niveau des méninges (3 à 10 %). Elle est non dialysable et l'élimination est principalement biliaire (2%).

L'AmB est stocké au niveau tissulaire et sera progressivement relarguée dans un deuxième temps. Le principal inconvénient de cette molécule est sa toxicité hématologique (anémie, thrombopénie, granulopénie), rénale (hyperkaliémie, hyperuricémie) pour les deux principales. L'AmB est l'antifongique de référence pour les mycoses profondes [36].

II.3.1.1.3. La Nystatine : La nystatine est une macrolactone polyénique de Streptomyces noursei, une actinobactérie du genre Streptomycetes. Il est utilisé comme agent antifongique pour le traitement des infections fongiques (par exemple Candida albicans et Aspergillus fumigatus).

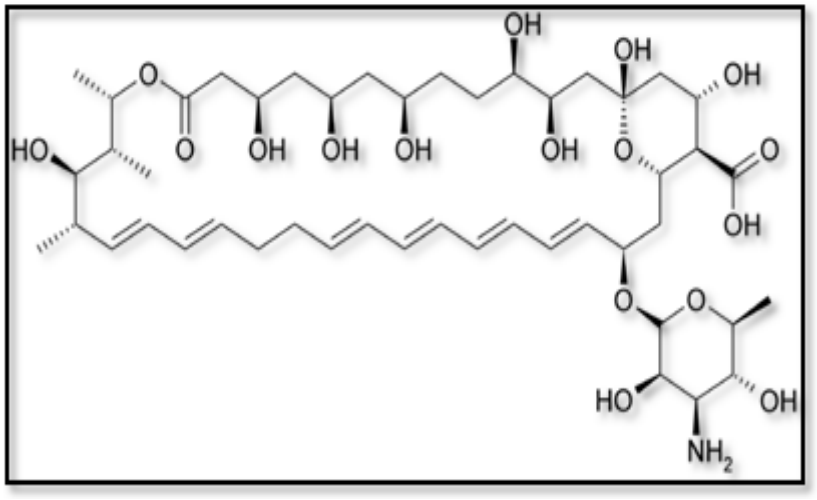


Figure II.5. Structure chimique de la nystatine

La nystatine est biosynthétisée par une souche bactérienne, Streptomyces noursei [41]. La structure de ce composé actif est caractérisée en tant que macrolide de polyene avec un D-mycosamine de deoxysugar, un aminoglycoside. La séquence génomique de la nystatine révèle la présence du module de chargement de polycétide (nysA), de six modules de polycétide synthases (nysB, nysC, nysI, nysJ et nysK) et de deux modules de thioestérase (nysK et nysE) [42]. Le mode d'action de la nystatnine et ses proprietes antifongiques sont tout à fait comparables à ceux de l'AMB [43].

II.3.1.1.4. cycloheximide : La cycloheximide est extraite de culture de Streptomyces griseus. Elle est active sur Cryptococcus neoformans, mais sa toxicité limite son emploi. Elle est désormais uniquement utilisée dans les milieux de culture car elle inhibe la croissance de la majorité des moisissures et de certaines levures comme le cryptocoque [36].

II.3.1.1.5.Les benzohydrofuranes : La griséofulvine, un derivé des benzohydrofurane est extraite de culture de Penicillium griseofulvum en 1939. Elle fut utilisée tout d'abord par les phytopathologistes. Ce n'est qu'en 1958 que l'on découvre son action antidermatophytique. Malgré une certaine toxicité, la griséofulvine est principalement utilisée pour le traitement des teignes anthropophiles, dont elle a permis une régression quasi totale en Europe de l'Ouest.

Elle agit au niveau de la paroi du champignon, lors de la mitose cellulaire par inhibition de la synthèse des acides nucléiques et de la fonction des microtubules, lorsqu'elle est utilisée à dose fongicide. De plus, elle empêche la pénétration des dermatophytes au sein des cellules kératinisée [36].

La griséofulvine est fongistatique, son spectre comprend exclusivement les dermatophytes. Elle possède de nombreux effets secondaires : digestifs, neurologiques, cutanés et hépatiques. Elle interagit avec de nombreux médicaments : elle diminue les effets des oestroprogestatifs, des anticoagulants ou au contraire potentialise les effets délétères de l'alcool, la toxicité hématologique de l'isoniazide et du kétoconazole.

Elle est administrée par voie orale, son absorption est améliorée par l'ingestion d'un repas riche en lipides. Le pic sérique est atteint en 2-4 heures, sa demi-vie est de 10-15 heures, elle se lie à 80 % aux protéines plasmatiques, elle se concentre sélectivement au niveau de la peau et des phanères (détectable en 1-2 jours dans l'épiderme, elle atteint la surface de la peau en 25-30 jours). La griséofulvine est indiquée dans le traitement des teignes, des kérions, des sycosis, des dermatophyties de la peau glabre, du pied d'athlète et des onyxis à dermatophytes [36].

II.3.1.2. Les antifongiques de synthèse

II.3.1.2.1. La 5-fluorocytosine (5-FC) : La 5-FC est une pyrimidine fluorée découverte à la fin des années 1950, qui va perturber la synthèse des acides nucléiques du champignon [40].

Elle pénètre dans la cellule par une perméase (cytosine-perméase), elle est désaminée puis subit 3 phosphorylations pour aboutir à la 5-fluorouridine qui peut s'intégrer à l'acide ribonucléique (ARN) du champignon, et rentrer en compétition avec l'uracile endogène[40]. Cette incorporation altère ou bloque la traduction de l'ARN (Figure II.6).

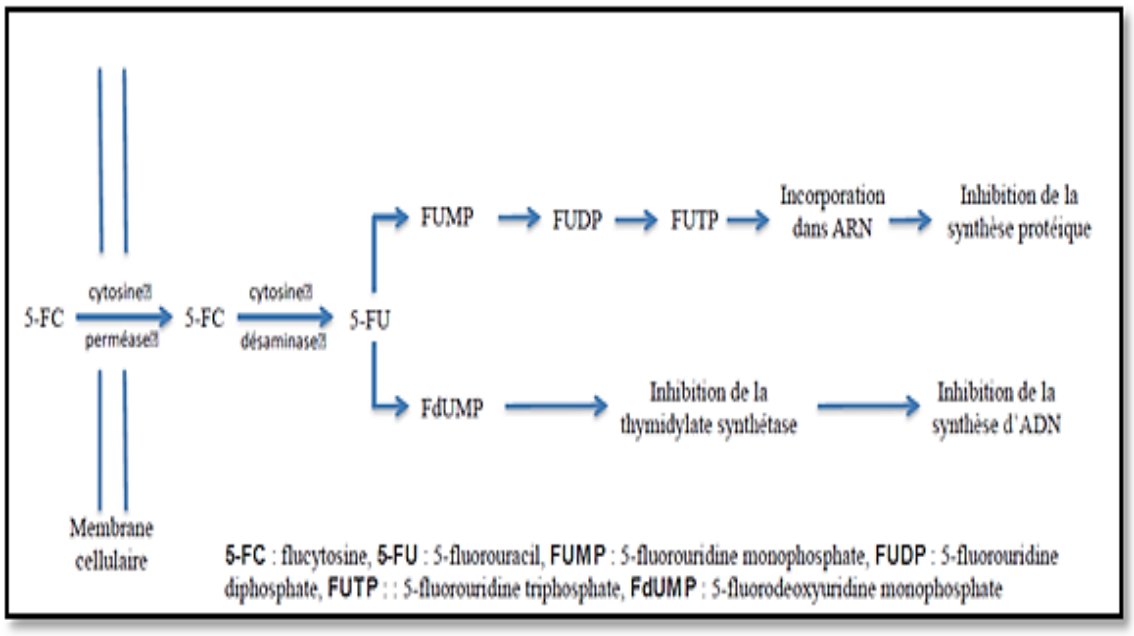


Figure II. 6. Mode d'action de la 5-FC [44]

La 5-FC est administrée par voie orale, avec une absorption supérieure à 90 %. Elle diffuse dans le LCR et l'humeur aqueuse, avec des concentrations proches de celles obtenues dans le sang. Le pic sérique est atteint en 3 heures, elle est très peu liée aux protéines plasmatiques (5 %), sa demi-vie est de 4 à 6 heures. Elle est principalement éliminée par voie rénale, sous forme active. Les doses administrées devront être adaptées à la fonction rénale pour éviter toute accumulation sanguine [36].

La 5-FC présente peu d'effets secondaires, car elle est sélective pour les cellules fongiques. La 5-FC est active le plus souvent sur Candida spp. (sauf C. krusei) et C. neoformans, avec des CMI basses de l'ordre de 0,5 à 4 µg/mL. Par contre, elle est inefficace sur la plupart des champignons filamenteux. Les effets secondaires sont de type digestif, hépatique (cytolyse), hématologique (anémie, thrombopénie, leucopénie, aplasie, agranulocytose) [44].

Les traitements prolongés en monothérapie favorisent l'apparition de résistance, on utilise donc la 5-FC en association avec l'AmB (association synergique) ou avec des antifongiques azolés (association additive) [44].

II.3.1.2.2. Les azolés : Ces substances entièrement synthétiques sont apparues dans l'arsenal thérapeutique au milieu des années 1960. Les azolés de premiére génération sont des imidazolés dont le miconazole est le représentant le plus utilisé, notamment dans le traitement des mycoses cutanéo- muqueuses à levures et dermatophytes. Le kétoconazole est un imidazolé de deuxiéme génération, c'est le premier azolé à être bien absorbé par

voie orale, mais son hépatotoxicité et ses interactions avec de nombreuses molécules limitent ses conditions d'utilisation [45]. Il n'est désormais utilisé que sous forme locale dans le traitement des dermites séborrhéiques de l'adulte. Enfin les azolés de troisième génération, composés triazolés, avec le fluconazole, l'itraconazole, le posaconazole et le voriconazole (Figure II.7).

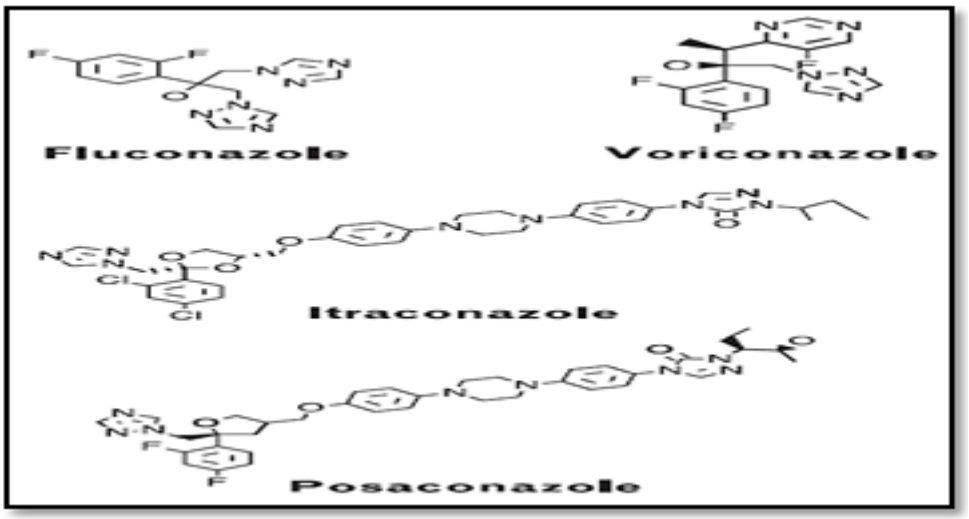


Figure II. 7. Structure chimique du fluconazole, de l'itraconazole, du voriconazole et du posaconazole [46]

Leur mécanisme d'action consiste en une inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol, qui provoque un ralentissement de croissance des cellules fongiques, d'où un effet seulement fongistatique [40]. Les azolés interviennent aussi au niveau du métabolisme oxydatif et peroxydatif, ils déclenchent l'accumulation de peroxyde d'oxygène qui aboutit à l'asphyxie de la cellule fongique [36].

II.3.1.2.3. Les échinocandines : Il s'agit de la dernière génération d'antifongiques systémiques, semi-synthétiques, dont les représentants sont la caspofungine, la micafungine et l'anidulafungine (Figure II.8). Ce sont des lipopeptides cycliques qui empêchent la synthèse de la paroi fongique par inhibition non compétitive de la béta-1,3-glucanesynthétase, enzyme constituée de 2 sous unités, Fksp et Rho1p [47]. Elles empêchent ainsi l'incorporation des glucanes et des protéines associés aux glucanes au sein de la paroi fongique [48]. Les glucanes étant des polysaccharides essentiels à l'intégrité de la paroi, les candines vont provoquer des anomalies de structure et une instabilité osmotique qui aboutira à la mort cellulaires : les échinocandines sont donc fongicides [49].

L'activité des échinocandines se concentre sur la synthèse de la paroi, avec réduction du bourgeonnement des levures et inhibition de la croissance à l'extrémité des filaments pour les champignons filamenteux [48].

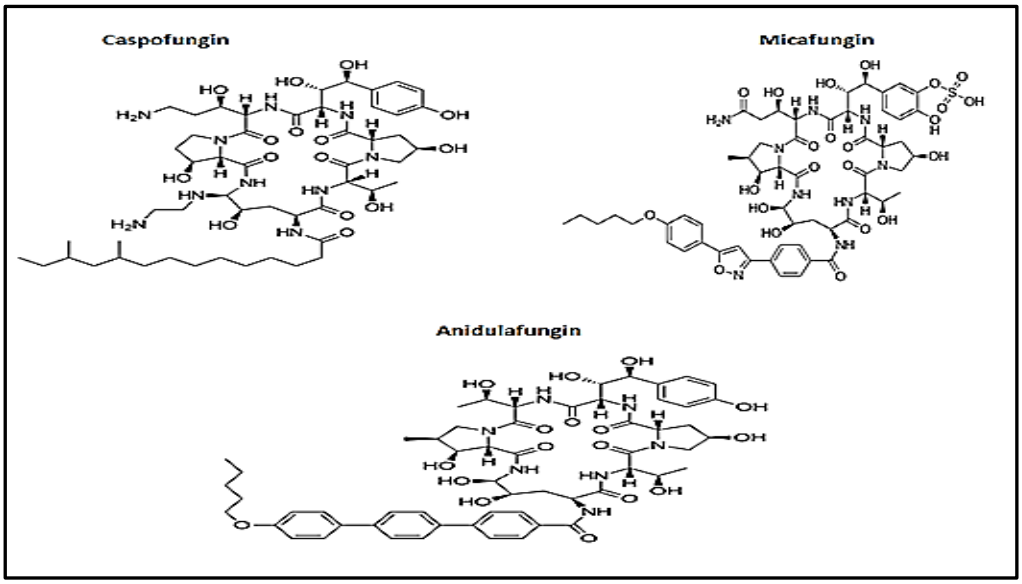


Figure II.8. Structure chimique des échinocandines [47]

Le spectre d'action des échinocandines comprend les levures et les champignons filamenteux ayant dans leur paroi cellulaire une majorité de polymère béta-1,3-glucane : Candida spp., Aspergillus spp., Pneumocystis jirovecii. C'est pourquoi, les Basidiomycètes, qui possèdent essentiellement des polymères béta-1,6-glucanes, ne sont pas affectés par les échinocandines, il s'agit des espèces C. neoformans et Trichosporon spp [48].

II.4 Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes sont des hormones produites par la paire de glandes surrénales, localisées au-dessus des reins, précisément au niveau d'une partie appelée la corticosurrénale.

Les corticostéroïdes topiques déterminent une classe de stéroïdes principalement synthétiques utilisés comme agents anti-inflammatoires et antiprurigineux. Les stéroïdes dans cette catégorie incluent l'acétonide de triamcinolone [49].

II.4.1 L'acétonide de triamcinolone

L'acétonide de triamcinolone est un glucocorticoïdehormones métaboliques essentielles Il exerce une activité anti-inflammatoire locale. C'est un dérivé plus puissant que

la triamcinolone, .il est chimiquement défini en tant que 16,17-acétal cyclique de 9-fluoro-11ß, 16a, 17,21-tétrahydroxypregna-1,4-diène-3,20-dione avec de l'acétone. Avec la formule moléculaire de C24H31FO6 et un poids moléculaire de 434.51. La formule structurelle est representé dans la figure II.9 [50].

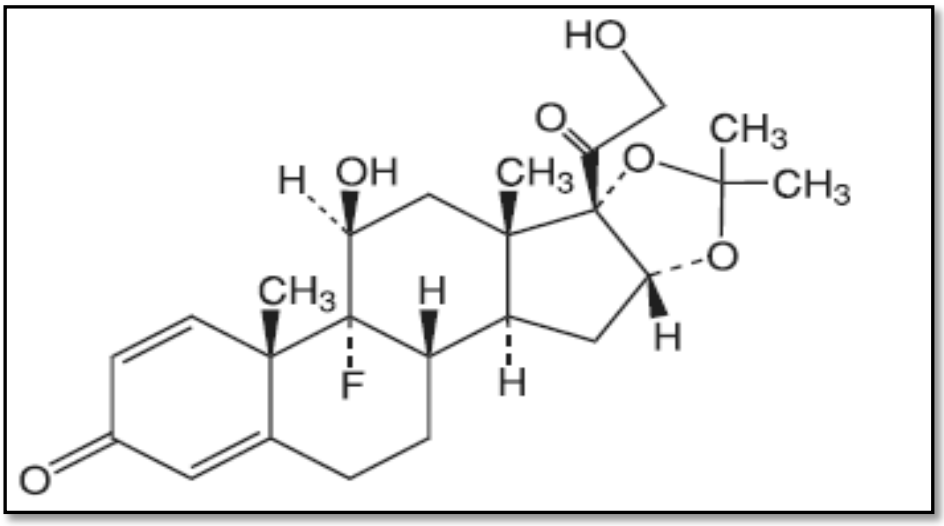


Figure II.9 Structure chimique de la triamcinolone acétonide [50]

II.5. Conclusion

L'adjectif anti-infectieux sert à définir un médicament préconisé dans le traitement des infections d'origine microbienne. Les antibiotiques font partie des médicaments anti-infectieux. Ces dernières années, la résistance aux substances anti-infectieuses se révèle être une problématique importante de santé publique. En effet, la préconisation massive d'antibiotiques par les médecins a entrainé une apparition de souches extrêmement résistantes mettant en péril ce type de traitement thérapeutique.

CHAPITRE III
ETUDE EXPERIMENTALE

III.1. Introduction

Ce présent travail expérimental a été réalisé au niveau de l'entreprise ANTIBIOTICAL-Saidal en collaboration avec le laboratoire d'analyse de la faculté des Sciences et le laboratoire de recherche 'Laboratoire de matériaux et environnement- LME' de l'université de Médéa.

L'objectif de cette étude est la formulation et la caractérisation d'une crème pour application topique. La crème est formulée à base de trois principes actifs qui sont : la triamcinolone, la nystatine et la néomycine sous forme d'une émulsion H/E. La phase huileuse est composée d'huile végétale (huile de nigelle). La phase aqueuse est composée d'un polymère gélifiant (gomme xanthane) et d'un agent humectant (propylène glycol).

Plusieurs formules ont été étudiées et la caractérisation a été effectuée du point de vue :

- Caractérisation physicochimique
- Caractérisation microbiologique
- Caractérisation toxicologique.

Ainsi, dans cette partie expérimentale, nous présenterons les caractérisations physicochimiques des produits utilisés pour la mise en œuvre de notre travail. Par la suite, nous décrirons en détail toutes les méthodes appliquées lors de la formulation et de la caractérisation de la crème.

III.2. Matériel et produits

Le tableau III.1 résume l'ensemble des équipements utilisés dans ce travail.

Tableau III.1. Liste du principal matériel utilisé

Matériel	Modèle
Balance électrique	Sartorius (BP 121 S)
Plaque chauffante agitatrice	Heidolph (MR Hei-Standard)
Agitateur à hélice	EURO-ST 20
Homogénéiseur	ULTRA-TURRAX T25
Centrifugeuse	Hettich (EBA 3S)
Conductimètre	WTW (Cond 197i)
pH-mètre	Metrohm (827 pH lab)
Viscosimètre	HAAKE, Visco-Tester VT5^{R}
Microscope optique	MICRO AUSTRIA

Les principaux produits utilisés pour la réalisation de nos expériences sont classés dans le tableau suivant :

Tableau III.2. Les principes actifs utilisés

Principes actifs	Caractéristiques
Néomycine	▪ **ASPECT :** Poudre blanche ou blanc jaune hygroscopique. ▪ **SOLUBILITE :** - Très soluble dans l'eau. - Très peu soluble dans l'alcool. - Pratiquement insoluble dans l'acétone.
Nystatine	▪ **ASPECT :** Poudre jaune à légèrement brunâtre, hygroscopique. ▪ **SOLUBILITE :** - Pratiquement insoluble dans l'eau. - Facilement soluble dans le diméthylsulfoxyde dans le diméthylformamide. - Peu soluble dans le méthanol. - Pratiquement insoluble dans l'alcool.
Triamcinolone	▪ **ASPECT :** Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, présentant le phénomène du polymorphisme. ▪ **SOLUBILITE :** - Pratiquement insoluble dans l'eau. - Assez soluble dans l'éthanol à 96%.

Tableau III.3. Liste des principaux excipients utilisés

Produits	Caractéristiques
Phase huileuse : **Huile végétale de nigelle**	**Nom commercial :** abu alkacim . **PH :** 6.84 **Densité :** 0,896 **Indice de réfraction :** 1.472 **Indice d'acide :** 25.242 **Indice de saponification :** 168.24 **Indice d'ester (I_e=I_S-I_a) :** 142,998 **Miscibilité à l'ethanol :** Miscible
La phase aqueuse : **Eau distillée**	**Formule chimique :** H_2O. Elle est préparée par la distillation de l'eau potable.
L'agent humectant : **Propylène glycol**	**Formule chimique :** $C3H8O2$ **Masse moléculaire :** 76.0944±0.0036 g/mol. **T° fusion :** -59°C **T° ébullition** : 188.2°C **Solubilit**é : soluble dans ether, Insoluble dans les huiles.
Biopolymère stabilisant : **Gomme xanthane**	**Synonyme :** E415, Keltrol **Densité (g/cm^3):** 1,6 (25°C). **Caractère :** Poudre jaunâtre ultra légère. **Solubilité :** Insoluble dans l'éthanol. **Viscosité :** 1200–1600 cP pour une solution concentrée à 1%.

III.3. Méthodes d'analyse

Trois techniques d'analyses ont été appliquées pour caractériser les principes actifs et analyser le produit fini « crème ».

III.3.1. Spectrophotométrie UV-Visible

Cette technique est basée sur la propriété des molécules d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-Visible. Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de beer-Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration.

Dans ce travail, un spectrophotomètre lambda 25 perkinElmer a été utilisé pour l'obtention du spectre UV-Visible de l'échantillon entre 200 et 400 nm. Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz avec un trajet optique de 1 cm.

III.3.2. Spectrophotométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Spectrophotométrie infrarouge est une technique d'analyse structurale fonctionnelle, basée sur l'analyse vibrationnelle des liaisons. Elle permet de caractériser les fonctions des produits organiques.

Une molécule soumise à des radiations dans l'infrarouge peut absorber certaines d'entre elles à des longueurs d'ondes qui correspondes aux fréquences de vibration des groupements chimiques qui la constituant. La mesure de l'intensité de la lumière absorbée à chaque longueur d'onde (λ) conduit à un spectre caractéristique du produit étudié. Par comparaison avec les spectres d'absorption infrarouge des substances de référence, il est possible d'identifier les structures inconnues.

III.3.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

Les composes à séparer sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide. Poussée par une pompe sous haute pression, le mélange parcourt par la suite le système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile stationnaire.

A la sortie de la colonne, les différents solutés sont caractérisés, grâce à un détecteur approprié, par des pics avec des temps de rétention bien définie. La hauteur des pics ou l'intégration de la surface de ces pics permet d'obtenir la concentration des produits [51]

III.4 Contrôle qualité des principes actifs

III.4.1 Analyse et contrôle de la Néomycine

Le principe actif Néomycine utilisée lors de cette étude est sous forme de Néomycine (Sulfate de). Une analyse physicochimique de la matière première est réalisée selon les normes de la pharmacopée Européenne [52].

III.4.1.1.Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

L'analyse par CCM de la Néomycine sulfate se fait selon le mode opératoire suivant :

- **Préparation de la solution standard :** Dissolvez une quantité de Néomycine sulfate standard de référence dans l'acide chlorhydrique 0,1 N pour obtenir une solution contenant 3,5 mg/ml de néomycine (base).
- **Préparation de la solution échantillon :** Dissolvez une quantité de néomycine dans l'acide chlorhydrique 0,1 N pour obtenir une solution contenant 3,5 mg/ml de néomycine (base).
  - Utiliser une plaque CCM recouverte de 0,25 mm de gel de silice.
  - Phase mobile : (Methanol , alcool isopropylique ,chlorure de méthylène , hydroxyde d'ammonium , eau) dont les proportions sont les suivantes : (4V , 2V , 2V , 2V ,1,5V).
  - Déposer 10µl de chaque solution.
  - Développer le solvant sur le 3 / 4 de la plaque.
  - Après avoir retiré la plaque, laisser sécher à 105 °C pendant 10 min.
  - Pulvériser la plaque avec une solution de Ninhydrine à 0,2 % dans l'alcool butylique puis chauffer105°C pendant 5 min.

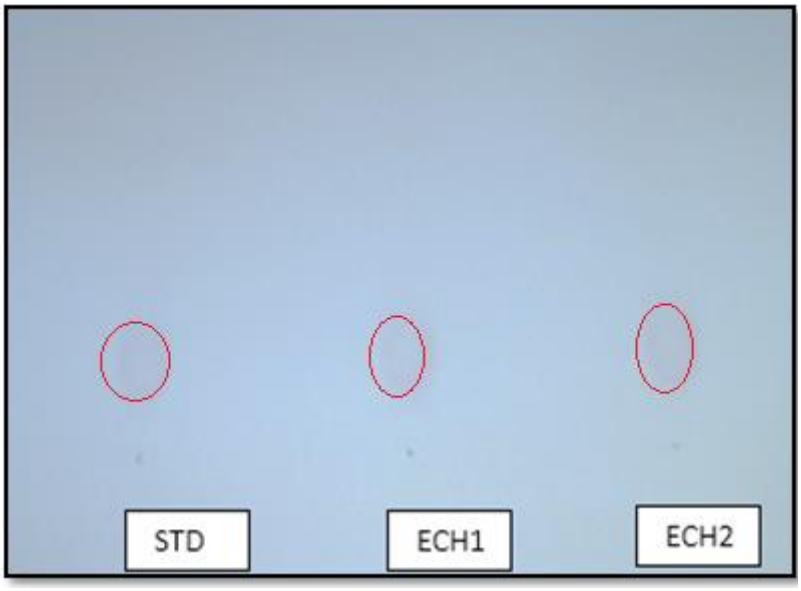


Figure III.1. Analyse par CCM de la néomycine sulfate

D'après la figure III.1, le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande principale semblable quant à sa position et sa coloration à celle du chromatogramme obtenu avec la solution standard de la néomycine. Ce résultat permet l'identification de la Néomycine sulfate.

III.4.1.2. Analyse par Spectrophotométrie FTIR

L'analyse se fait selon le mode opératoire suivant :

- Prélever un échantillon de Néomycine sulfate à analyser.
- Préparé une micro pastille de 1 à 2 mm d'épaisseur dans le bromure de potassium à une concentration d'environ 1% en masse en soumettant la poudre à une pression d'environ 80 bars/cm.
- Analyser par FTIR ente 400 cm^{-1} et 4000 cm^{-1}.

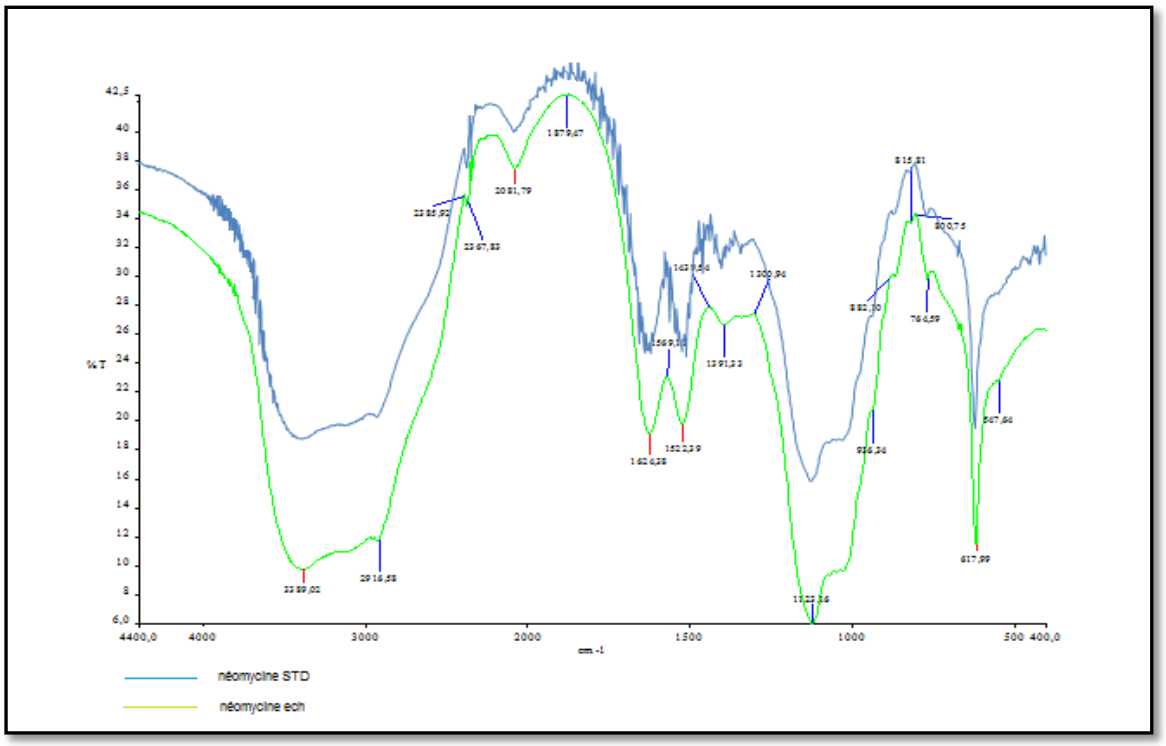


Figure III. 2. Spectre IR de la Néomycine sulfate

La figure III.2 montre le spectre FTIR de la Néomycine sulfate. On observe une bande d'absorption comprise entre 2900 cm^{-1} et 3400 cm^{-1}, elle est caractéristique des groupes -OH et –NH, groupements spécifiques de la Néomycine. Une forte absorption est signalé entre 900 cm^{-1} et 1300 cm^{-1} , caractéristique de la présence de la liaison C-O-C. Un pic de forte intensité est signalé entre 550 cm^{-1} et 650 cm^{-1} correspondant à la présence de groupement -C-OH.

Les résultats obtenus montrent l'existence de différents groupements caractéristiques de la Néomycine sulfate, confirmé par la superposition du spectre de l'échantillon analysé à celui du standard de référence de la Néomycine sulfate.

III.4.1.3. Analyse colorimétrique

L'analyse colorimétrique est réalisée selon le mode opératoire suivant :

- Dissolvez 10 mg de la substance à examiner dans 1 ml d'eau,
- Ajouter 5 ml d'acide sulfurique 15N,
- Chauffer à 100°C pendant 100 min.
- laisser refroidir, et ajouter 10 ml de xylène,
- Agiter pendant 10 min, et laisser se décanter.
- A la phase de xylène ajouter 10 ml de p-Bromoaniline TS et agiter.
- Il y a formation d'une couleur rouge rosé.

Le résultat du test de coloration de la Néomycine sulfate est positif (formation d'un couleur rouge rosé).

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'analyse physicochimique de la Néomycine sulfate indique que le principe actif est conforme à la Pharmacopée Européenne [52].

III.4.2. Analyse et contrôle de la Nystatine

Le principe actif Nystatine utilisée lors de cette étude est soumis à des analyses physicochimiques selon les normes de la pharmacopée Européenne [52].

III.4.2.1. Analyse par Spectrophotométrie UV

L'analyse se fait selon le mode opératoire suivant :

- **Préparation de la solution échantillon**

- Dissolvez 0,10 g de Nystatine dans un mélange de 5,0 ml d'acide acétique glacial R et de 50 ml de méthanol R.
- Complétez à 100,0 ml avec du méthanol R.
- Prélevez 1,0 ml de solution et complétez à 100,0 ml avec du méthanol R.
- Examinez la solution préparée dans l'intervalle 220 nm à 350 nm.
- La solution doit présenter 4 maximums d'absorption à 230 nm, 291 nm, 305 nm et 319 nm.
- Elle présente également un épaulement à 280 nm.
- Le rapport de l'absorbance mesurée au maximum d'absorption à 291 nm à celle mesurée au maximum d'absorption à 305 nm est de 0,61 à 0,73.
- Le rapport de l'absorbance mesurée au maximum d'absorption à 319 nm à celle mesurée au maximum d'absorption à 305 nm est de 0,83 à 0,96.

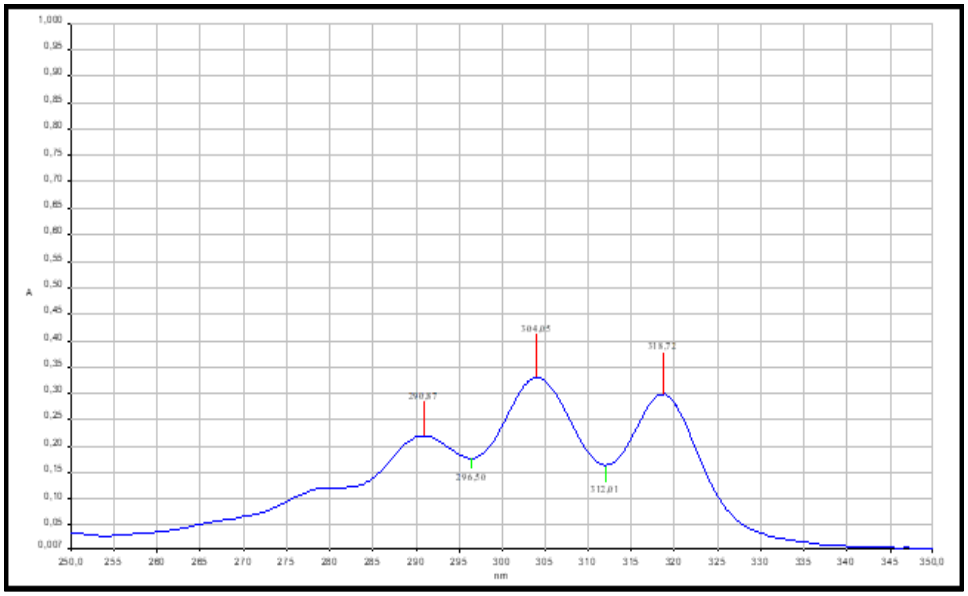


Figure III.3. Spectre d'absorption UV de la Nystatine

La figure III.3 montre trois pics d'absorption à 290.37 nm, 304.05nm, et 318,72nm. Le rapport d'absorbance entre l'épaulement de 290.37 nm et 304.05 égale à 0.66, le rapport d'absorption entre l'épaulement de 318.72 nm et 304.05 est égale à 0.83 et le rapport d'absorption entre l'épaulement de 305 nm et 320 est égale à 0.7. Ces résultats répondent aux exigences de conformité de l'analyse spectrophotométrique UV de la Nystatine

III.4.2.2.Analyse par Spectrophotométrie FTIR

Le mode opératoire :

- Prélever un échantillon de Néomycine sulfate à analyser.
- Disperser le solide dans de l'huile de paraffine.
- Déposer la suspension sur une pastille de chlorure de sodium monocristallin.
- Analyser par FTIR ente 400 cm^{-1} et 4000 cm^{-1}.

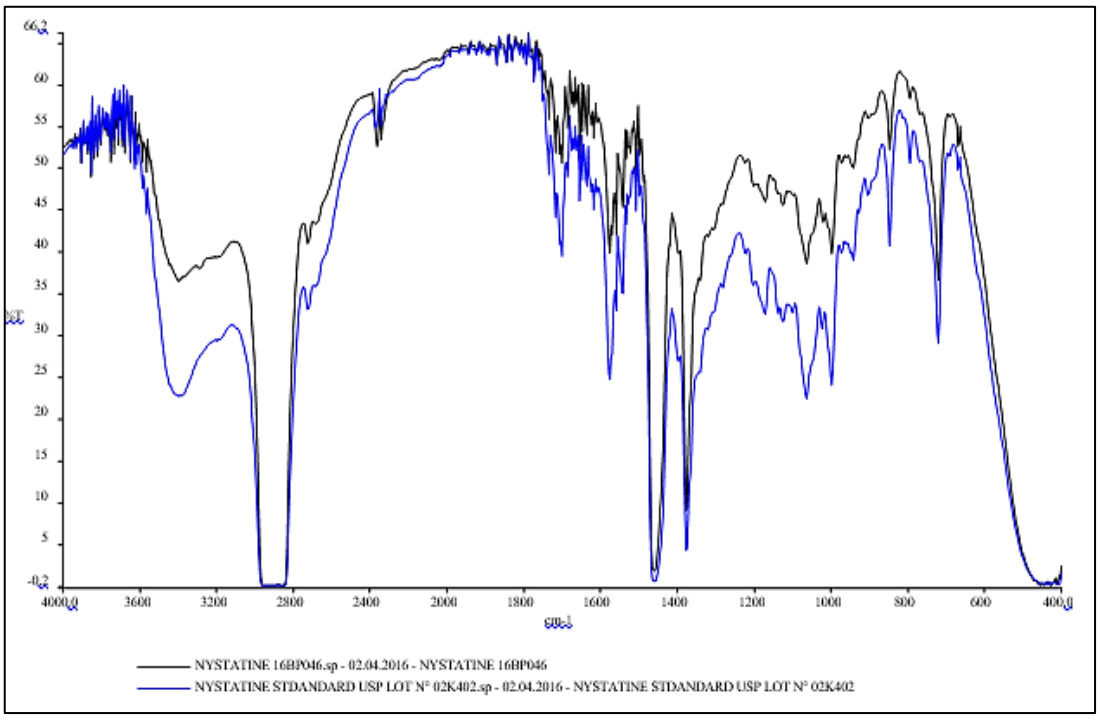


Figure III.4. Spectre FTIR de la Nystatine

On observe dans la figure III.4 une bande d'absorption comprise entre 700 cm^{-1} et 850 cm^{-1} est la bande caractéristique du groupement O-C=O, groupement spécifique de la Néomycine. Une forte absorption est signalé entre 1650 cm^{-1} et 1800 cm^{-1} caractéristique de la présence du groupement RR'C=O. Une forte intensité d'absorption est aussi observée entre 2900 cm^{-1} et 3500 cm^{-1}, indiquant la présence des liaisons -OH et -NH.

Les résultats obtenus montrent l'existence de différents groupements caractéristiques de la Nystatine, confirmé par la superposition du spectre de l'échantillon analysé à celui du standard de référence de la Nystatine.

III.4.2.3. Analyse colorimétrique

L'analyse colorimétrique est réalisée selon le mode opératoire suivant :

- Prélever 2 mg de Nystatine échantillon,
- Ajoutez 0,1 ml d'acide chlorhydrique R,
- Il se développe une coloration brune**,**
- Prélever 2 mg de Nystatine échantillon,
- Ajoutez 0,1 ml d'acide sulfurique R,
- Il se développe une coloration brune qui vire au violet après quelques instants.

Tableau III.4. Résultats de test de coloration de la Nystatine

Tests	Normes	Résultats obtenus
Coloration par HCL	Couleur brune	Conforme
Coloration par H_2SO_4	Couleur brune vire au violet après quelques instants	Conforme

III.4.2.4. Analyse par chromatographie HPLC

L'analyse est réalisée selon le mode opératoire suivant à l'abri de la lumière.

- **Préparation de la solution à examiner (échantillon)**: Dissolvez 20 mg de Nystatine dans du diméthylsulfoxyde R et complétez à 50 ml avec le même solvant.
- **Préparation de la solution témoin (étalon) :** Dissolvez 20 mg de nystatine SCR dans du diméthylsulfoxyde R et complétez à 50 ml avec le même solvant.
- **Conditions chromatographiques**

- Colonne gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie, désactivé pour les bases, postgreffé R (5 µm), 15 cm x 4,6 mm.
- Longueur d'onde: 305 nm.
- Température de la colonne: 30 °C.
- Volume d'injection : 20µl.
- Débit : 1,0 ml/min.
- Phase mobile : acétonitrile R, solution d'acétate d'ammonium R à 3,85 g/L (29:71 *V/V*).

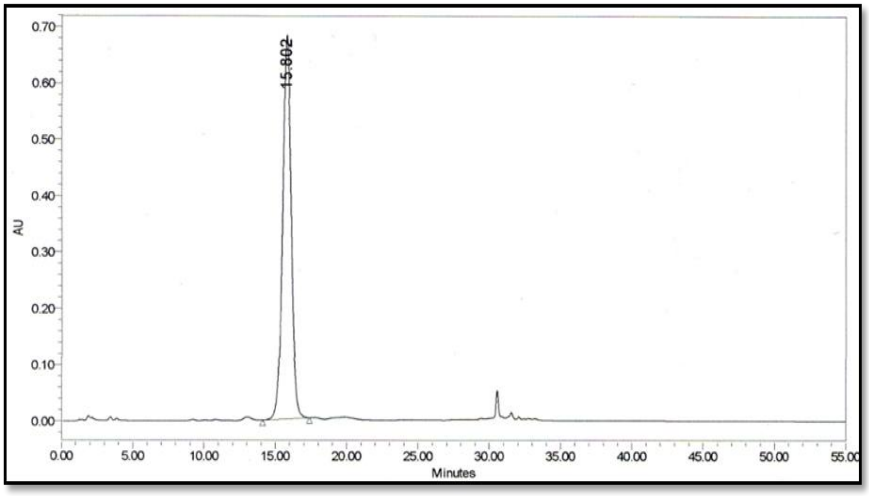


Figure III.5. Chromatogramme HPLC de la Nystatine

La figure III.5 montre que le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner a un pic principal semblable quant à son temps de rétention et ses dimensions au pic principal du

chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a). Le temps de rétention de l'échantillon est de 15.802 min.

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'analyse physicochimique de la nystatine indique que le principe actif est conforme à la Pharmacopée Européenne [52].

III.4.3. Analyse et contrôle de la Triamcinolone acétonide

Le principe actif Triamcinolone acétonide utilisée lors de cette étude est soumis à des analyses physicochimiques selon les normes de la pharmacopée Européenne [52].

III.4.3.1.Analyse par Spectrophotométrie FTIR

Le mode opératoire suivi lors de l'analyse de la Triamcinolone par FTIR est identique que celui de l'analyse de la Néomycine sulfate mentionné précédemment (section III.3.1).

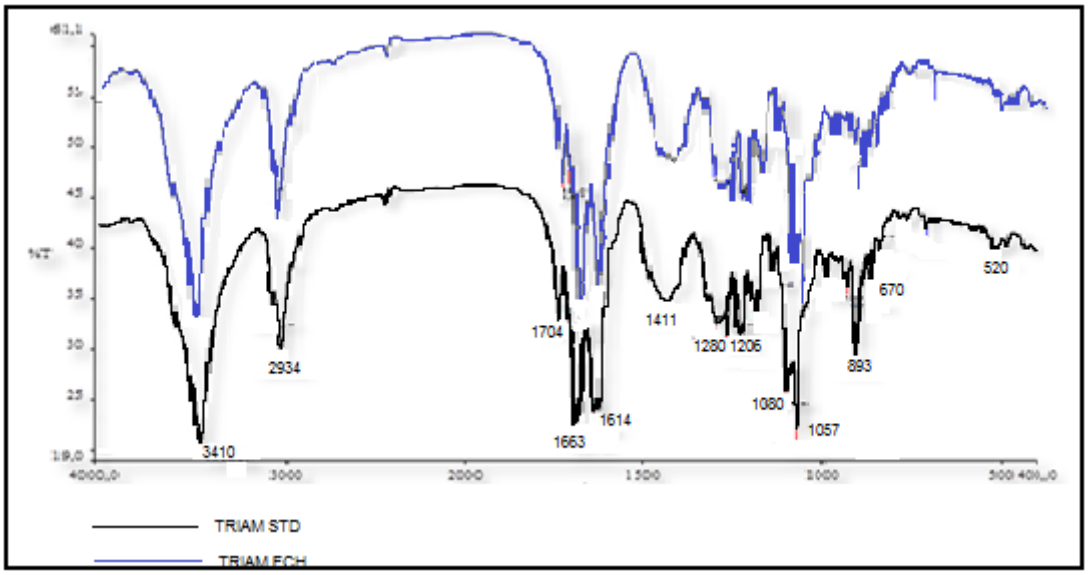


Figure III.6 spectre IR de la Triamcinolone acétonide

La figure III.6 montre le spectre FTIR de la triamcinolone acétonide. On obseve une bande d'absorption comprise entre 1600 cm^{-1} et 1750 cm^{-1} caractéristique du groupement RR'C=O, spécifique de la triamcinolone acétonide. Une forte absorption est signalée à 3300 cm^{-1} caractéristique de la présence de la liaison O-H aliphatique.

Une absorption est signalé aussi a 590 cm^{-1} correspondant à la liaison O-H aromatique, une forte absorption entre 1000 cm^{-1} et 1100 cm^{-1} caractéristique de liaison C-OH et une forte absorption a 2900 cm^{-1} qui représente la liaison C-H.

Les résultats obtenus montrent l'existence de différents groupements caractéristiques de la triamcinolone acetonide, confirmé par la superposition du spectre de l'échantillon analysé à celui du standard de référence de la triamcinolone acetonide.

III.4.3.2.Analyse par Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

L'analyse par CCM de la Néomycine sulfate se fait selon le mode opératoire suivant :

- **Solution à examiner** : Dissolvez 10 mg d'acétonide de triamcinolone dans du méthanol R et complétez à 10 ml avec le même solvant.
- **Solution témoin (a)** : Dissolvez 20 mg d'acétonide de triamcinolone SCR dans du méthanol R et complétez à 20 ml avec le même solvant.
- **Solution témoin (b)** : Dissolvez 10 mg d'hexacétonide de triamcinolone SCR dans la solution témoin (a) et complétez à 10 ml avec la solution témoin (a).
- Plaque : plaque au gel de silice F_{254} pour CCM R.
- Phase mobile : ajoutez un mélange de 1,2 volume d'eau R et de 8 volumes de méthanol R à un mélange de 15 volumes d'éther R et de 77 volumes de chlorure de méthylène R.
- Dépôt : 5 µL.
- Développement : sur les 3/4 de la plaque.
- Séchage : à l'air.
- Détection : examinez en lumière ultraviolette à 254 nm, immédiatement après le développement.

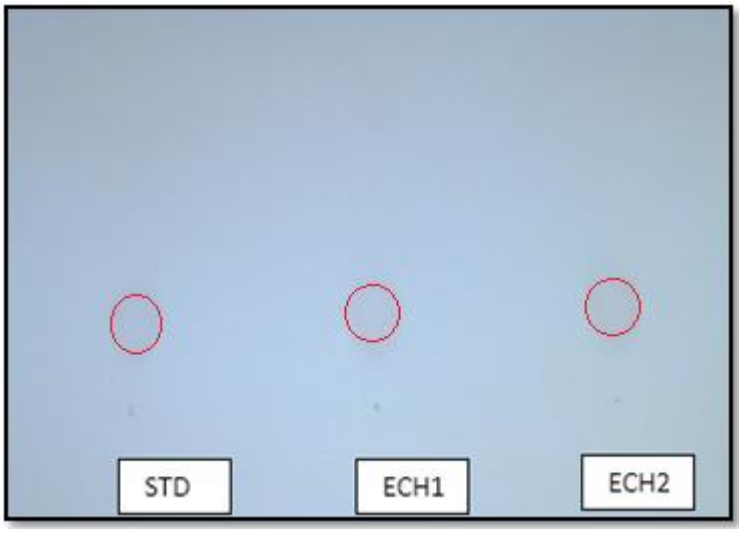


Figure III.7. Plaque CCM développé de triamcinolone acétonide

Le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner présente une bande principale semblable quant à sa position et sa coloration à celle du chromatogramme obtenu avec la solution standard de la néomycine (figure III.7).

III.4.3.3. Analyse par chromatographie HPLC

L'analyse est réalisée selon le mode opératoire suivant à l'abri de la lumière

- **Solution à examiner** : Dissolvez 25,0 mg d'acétonide de triamcinolone dans la phase mobile et complétez à 25,0 ml avec la phase mobile.
- **Solution témoin :** Dissolvez 25,0 mg d'acétonide de triamcinolone SCR dans la phase mobile et complétez à 25,0 ml avec la phase mobile.
- **Conditions chromatographiques :**

- Colonne en gel de silice octadécylsilylé post-greffé pour chromatographie R (5 µm), 25 cm x 4,6 mm.
- Longueur d'onde: 254 nm.
- Température de la colonne: 40 °C.
- Volume d'injection : 20µl.
- Débit : 1,5 ml/min.
- Phase mobile : acétonitrile R, eau pour chromatographie R (32:68 *V/V*).

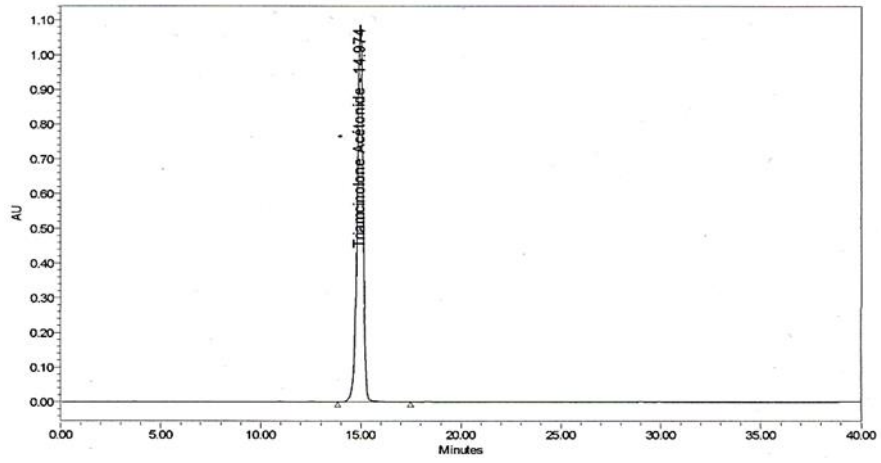


Figure III. 8 chromatogramme de triamcinolone acétonide

La figure III.8 montre que le chromatogramme obtenu avec la solution à examiner a un pic principal semblable quant à son temps de rétention et ses dimensions au pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a). Le temps de rétention de l'échantillon est de 14.974 min.

L'ensemble des résultats obtenus lors de l'analyse physicochimique de la triamcinolone acétonide indique que le principe actif est conforme à la Pharmacopée Européenne [52].

III.5. Analyse et contrôle du Biopolymère : Gomme xanthane

- **Analyse par FTIR**

Le mode opératoire suivi lors de l'analyse de la nystatine par FTIR est identique que celui de l'analyse de la néomycine Mentionné précédemment (section III.3.1)

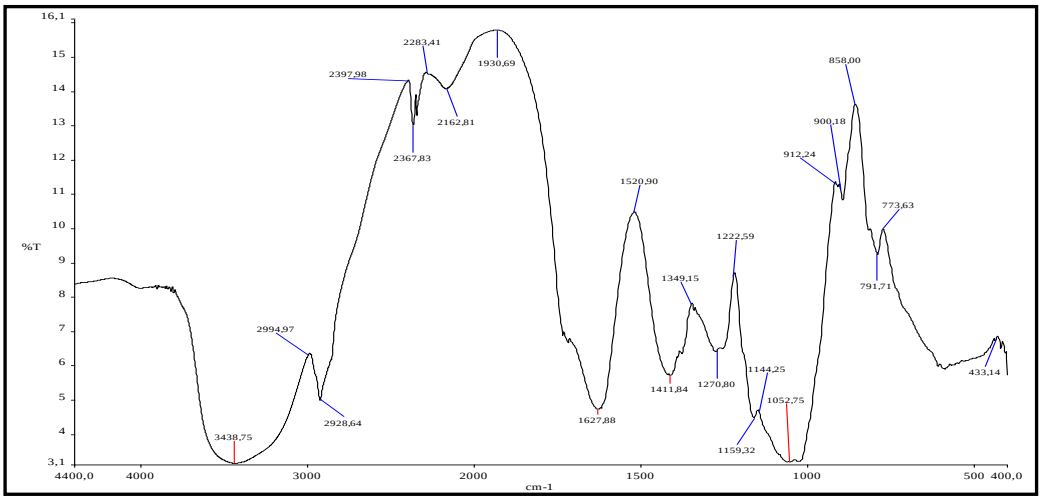


Figure III.9 spectre IR de gomme xanthane

La figure III.9 montre le spectre FTIR de gomme xanthane. On observe une bande d'absorption comprise entre 1110 cm^{-1} et 1140 cm^{-1}, elle est caractéristique du groupe R'C-O-CR. Une forte absorption est signalée entre 1600 cm^{-1} et 1800 cm^{-1}, caractéristique de la présence de la liaison R'RC=O. Une bande d'absorption comprise entre 3000 cm^{-1} et 4000 cm^{-1} correspondant aux liaisons OH. Ces résultats confirment l'identification des déférents groupements caractéristiques de la gomme xanthane.

III.6. Etude microbiologique de l'huile de nigelle « nigella sativa »

III.6.1. Etude de l'effet antimicrobien

Plusieurs souches ont été utilisées afin de vérifier l'effet antimicrobien de l'huile de nigelle. Pour cette étude, la méthodologie suivante a été adoptée.

III.6.1.1.Composition du milieu de culture

Le choix de milieu de culture utilisé pour les tests microbiologiques est primordial. La composition et le pH du milieu de culture influent sur l'activité antimicrobienne et la diffusion du produit à étudier.

Dans cette présente étude, il a été utilisé le milieu topique soja agar dont la composition est indiquée dans le tableau III.5. Le pH final de milieu est ajusté à 7.3 ±0.2.

Tableau III.5. Composition de milieu de culture

Constituants	Quantité (g/L)
Digestion pancréatique de caséine	15
Digestion paraphique de soja	05
Chlorure de sodium	05
Gélose	15

III.6.1.2. Choix des souches bactériennes

Quatre souches bactériennes existantes dans la flore cutanée ont été choisies pour les tests antimicrobiens réalisés sur l'huile de nigelle. Les souches bactériennes utilisées sont :

- La souche *Staphylococcus aureus (S. aureus),*
- La souche *Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis),*
- La souche *Escherichia coli (E. coli),*
- La souche *Candida albicans (C. albicans).*

- ***Mode opératoire* :** Après préparation et autoclavage de milieu de culture, ce dernier est coulé dans des boites de pétri. Après solidification du milieu, la souche est ensemencée en nappe à la surface de chaque boite. Des disques en papier vierge sont déposés à la surface de la gélose, puis imbibée à l'aide de micropipette de 25µl d'huile de nigelle pour chaque disque. Les boites sont incubées à 37± 0.5 °C pendant 24h.

- ***Résultats et discussions :*** Les résultats des tests montrent que d'huile de nigelle a un effet antimicrobien sur les souches *S. epidermidis* et *S .aureus*, qui sont des souches a Gram (+) (figure III.10 a et b), et aucun effet sur les C. albicans et E.coli de Gram (-) (figure III.10).

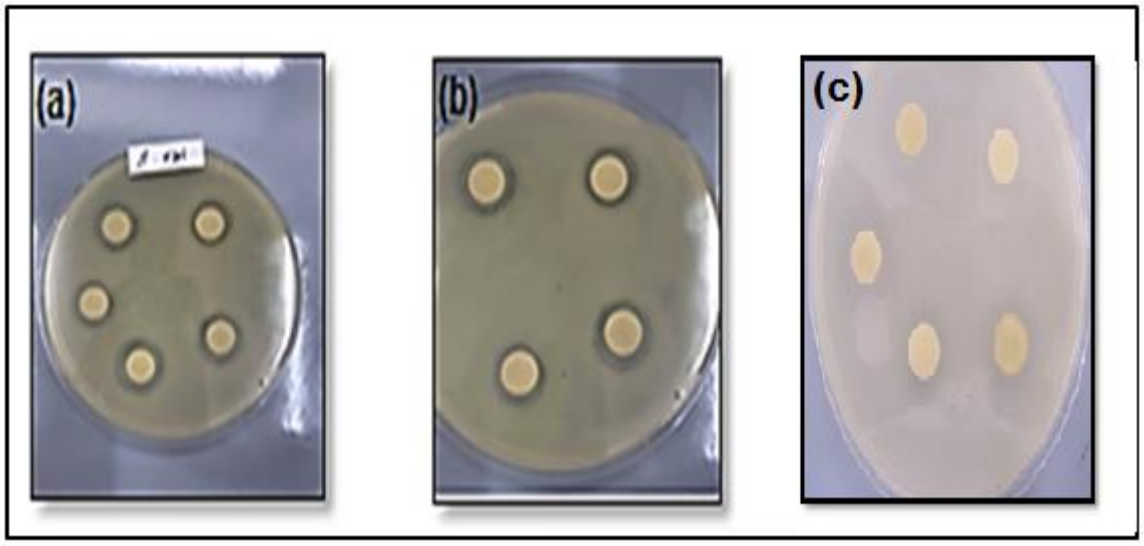


Figure III.10. Antibiogrammes de l'huile de nigelle testée sur les souches :
(a) *S. aureus ;* **(b)** *S. epidermidis* ; (**c**) *E. coli*

III.7. Pré formulation

Différentes émulsions H/E ont été préparées avec différentes proportions en phase huileuse et phase aqueuse (Tableau III.6).

Tableau III. 6. Fractions des différents constituants des émulsions placebos [21]

Composants (%)	**EM1**	**EM2**	**EM3**	**EM4**	**EM5**
Huile de Nigelle (HN)	20	15	10	5	0
Vaseline (VS)	0	5	10	15	20
Eau distillée	70	70	70	70	70
Propylène Glycol (PG)	10	10	10	10	10
Gomme Xanthane (XG)	2	2	2	2	2

Le mode de préparation des différentes formules étudiées (placebos) est le suivant :

- ***Préparation de la phase aqueuse*** : La phase aqueuse est préparée par dispersion de 1g de gomme de xanthane dans l'eau distillée jusqu'à la solubilisation totale. Les solutions ainsi obtenues sont stockées à température ambiante pendant 24 h pour une meilleure hydratation.

- ***Préparation de la phase huileuse :*** La phase huileuse est constituée d'huile de nigelle et de vaseline à différentes fractions (Tableau III.4). Les deux phases huileuse et aqueuse sont

Chauffées dans un bain marie à une température de 60 ± 1 °C. 4. La phase huileuse est ajoutée goutte à goutte à la phase aqueuse, sous agitation magnétique vigoureuse (1300 tr/mn), jusqu'à température ambiante. Enfin, une homogénéisation de l'émulsion est effectuée en utilisant un homogénéisateur ultra turrax à 22000 tr/mn pendant 5 mn.

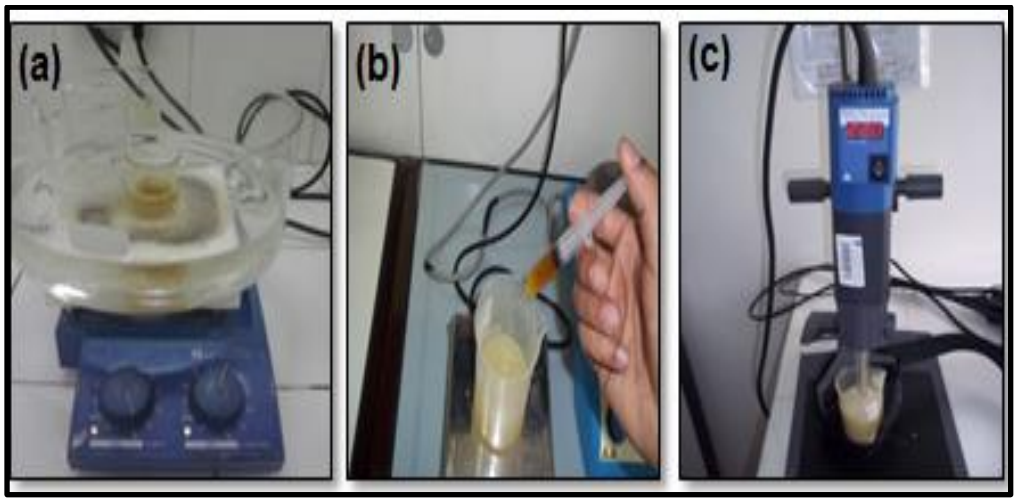


Figure III.11. Méthode de formulation des émulsions placebos :
(a) Préparation des phases, **(b)** Incorporation de la phase huileuse dans la phase aqueuse, **(c)** Homogénéisation.

III.7.1. Caractérisation des émulsions placebos

Les émulsions préparées ont été caractérisées en étudiant :

- L'aspect macroscopique
- La conductivité,
- La mesure de pH
- La stabilité accélérée par centrifugation
- L'imagerie microscopique

III.7.1.1 Examen macroscopique

Une analyse macroscopique basée sur une visualisation à l'œil nu des émulsions a été réalisée. L'aspect de chaque formulation est résumé dans le tableau III.7.

Tableau III.7. Aspect macroscopique des émulsions placebos

N° formule	**EM 1**	**EM 2**	**EM 3**	**EM 4**	**EM 5**
Aspect visuel	liquide	Liquide laiteux	Visqueux	Très visqueux	Solide

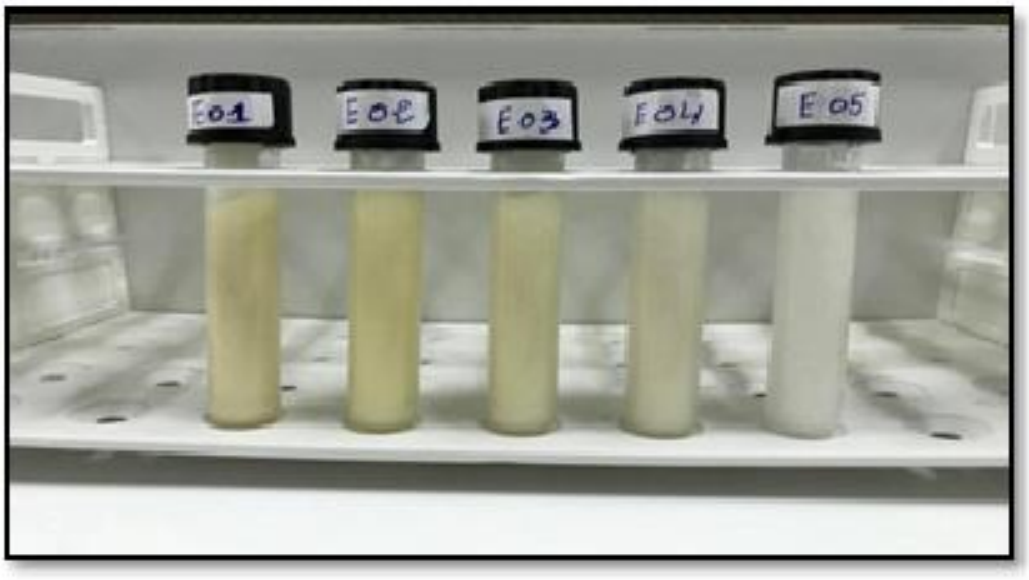


Figure III.12 Aspect macroscopique des émulsions placebos

III.7.1.2.Etude de la conductivité

La mesure de la conductivité a pour but de déterminer le sens de l'émulsion.

Les résultats de la conductivité des émulsions placebos (Figure III.13) montrent des valeurs de conductivités électriques variant entre 243 et 284 µs/cm, Ces valeurs sont élevées pour toutes les formulations placebos étudiées. Ces résultats indiquent que la phase continue est une phase aqueuse alors que la phase dispersée est une phase huileuse. Selon la pharmacopée Européenne, les résultats confirment que les formulations sont des émulsions de type H/E [52].

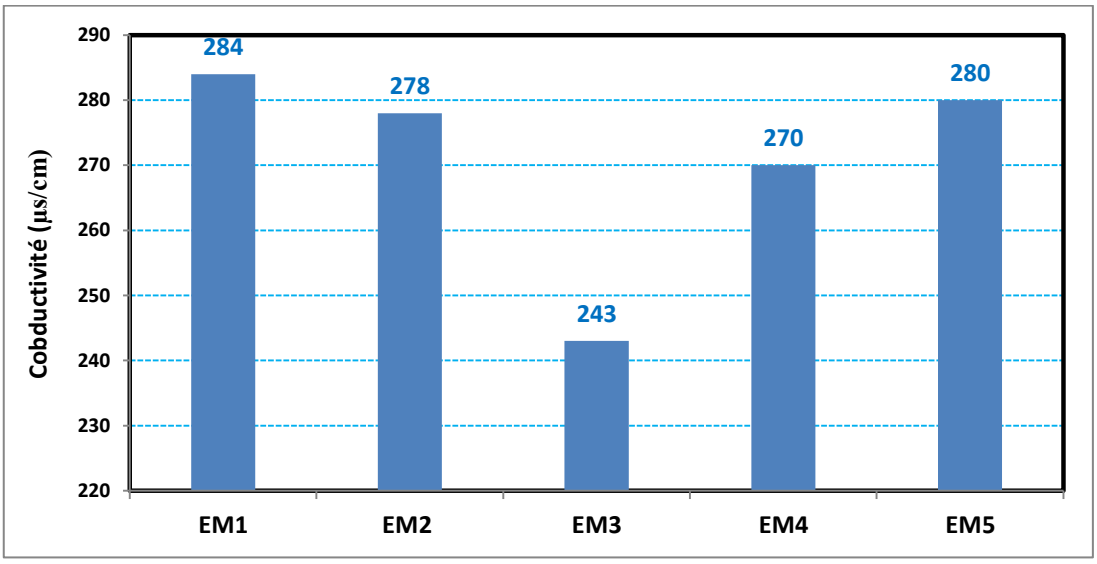


Figure III.13. Analyse de la conductivité des émulsions placebos

III.7.1.3. Mesure du pH des émulsions placebos

La mesure de pH a pour but de vérifier que les émulsions ont des valeurs de pH compatible avec le pH de la peau, et par conséquent peuvent être utilisée comme véhiculant pour voie dermique, Sachant que le pH de la peau varie entre 5.2 et 7.

Les résultats du pH des émulsions placebos (Figure III.14) sont compris entre 5.8 et 7.0 dans toutes les formulations. Ces résultats montrent que les émulsions obtenus peuvent être utilisées sur la peau sans aucune irritation possible.

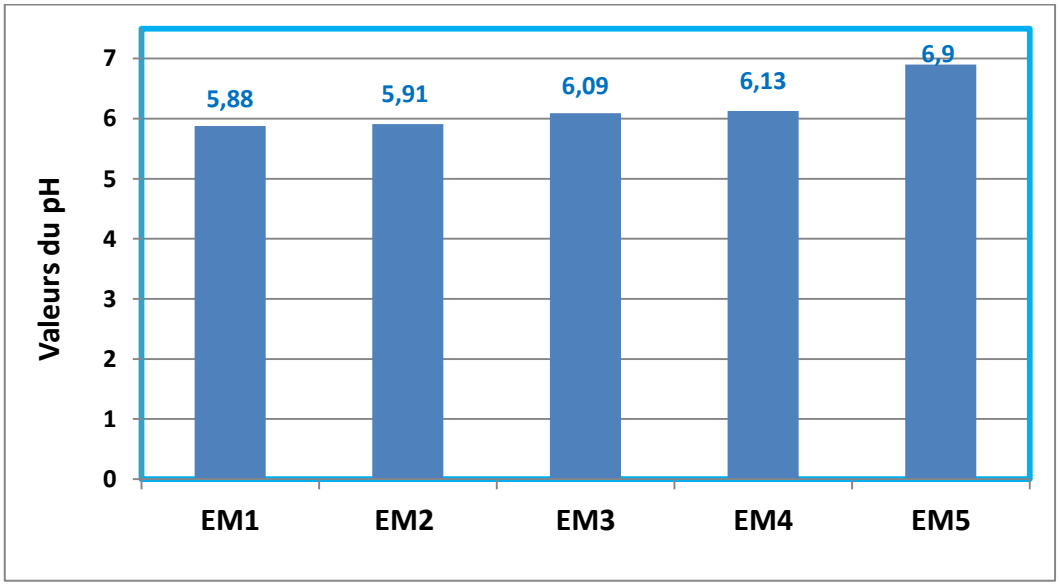


Figure III.14. Mesure de pH des émulsions préparés

III.7.1.4. Stabilité accélérée par centrifugation

Les émulsions préparées ont été soumises à une vitesse de centrifugation de 6000 et 40000 tr/min pendant 5 minutes. Les résultats obtenus sont représentés sur le tableau III.8.

La vitesse de la centrifugation a été appliquée pour forcer l'instabilité (phénomène de crémage) des émulsions placebos étudiées. Ce test permet de prédire la stabilité des émulsions dans le temps.

Tableau III.8. Tests de centrifugation des émulsions placebos

Vitesse de Centrifugation	**EM1**	EM2	EM3	EM4	EM5
6000 tr/min	**Stable**	Stable	Stable	Stable	Instable
40000 tr/min	**Stable**	Instable	Instable	instable	Instable

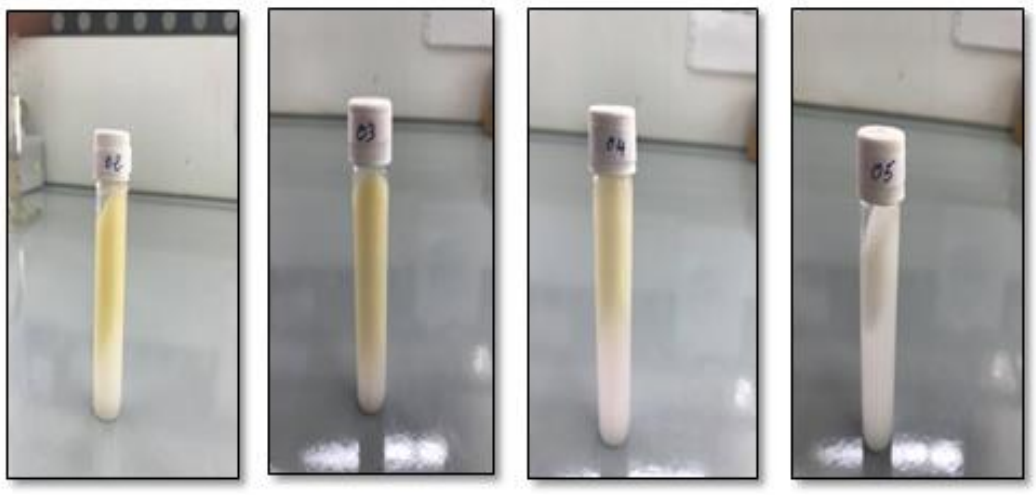


Figure III.15. Résultats des émulsions placebos après centrifugation

Le test de la centrifugation à une vitesse de 6000 tr/min pendant 5 min montre une instabilité de la formulation EM 5 (figure III.15), avec apparition d'un phénomène de crémage. Les formulations EM 1, EM 2, EM 3 et EM 4 restent stables dans les mêmes conditions de centrifugation. Lors de l'application d'une vitesse de centrifugation de 40000 tr/min, la seule formulation qui reste stable est l'émulsion EM 1.

Ces résultats indiquent que les formulations renfermant de la vaseline seule ou en association avec l'Huile de nigelle sont moins stable que les émulsions à base d'huile de nigelle seule.

III.7.1.5. Analyse microscopique

L'examen microscopique de l'émulsion H/E la plus stable (formulation EM 1) a été effectuée directement après les procédés d'émulsification. L'échantillon est placé entre une lame et une lamelle puis analysé sous microscope optique de marque Micros Austria. à un grossissement (x 10).

L'image microscopique (Figure III.14), montre une bonne dispersion des globules huileux dans la phase continue (phase aqueuse). Les particules présentent une taille homogène, ce qui indique que le système est mono dispersé.

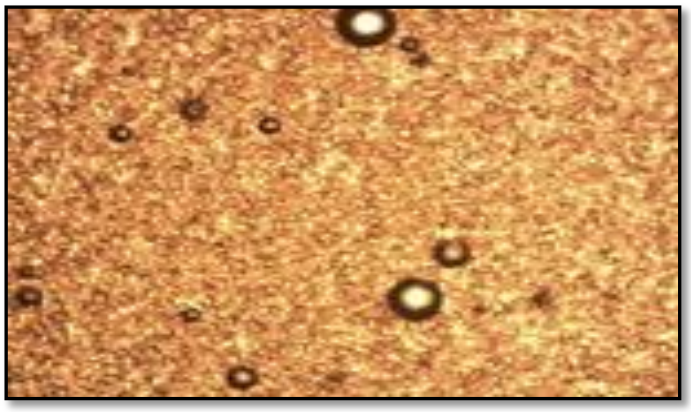


Figure III.16. Image microscopique de l'émulsion placebo optimale (EM 1)

III.8. Formulation de la crème

Le procédé de formulation de la crème est identique que celui appliqué pour les précédentes émulsions placebos, sauf que dans cette partie il y aura incorporation des trois principes actifs: Néomycine, Nystatine et Triamcinolone acétonide.

Le procédé de formulation de la crème est le suivant :

- ***Préparation de la phase aqueuse*** : La phase aqueuse est préparée par dispersion de 2g de gomme xanthane dans l'eau distillée jusqu'à la solubilisation totale. Les solutions ainsi obtenues sont stockées à température ambiante pendant 24 h pour une meilleure hydratation.
- ***Préparation de la phase huileuse :*** La phase huileuse est constituée d'huile de nigelle. Les deux phases huileuse et aqueuse sont chauffées dans un bain marie à une température de 60 ± 1 °C.
- La phase huileuse est ajoutée goutte à goutte à la phase aqueuse, sous agitation magnétique vigoureuse (1300 tr/mn), jusqu'à température ambiante. Enfin, une homogénéisation de l'émulsion est effectuée en utilisant un homogénéisateur ultra turrax à 22000 tr/mn pendant 5 mn.
- ***L'incorporation de principes actifs :*** l'incorporation de principes actifs a été faite selon trois essais tel que :

- ***1 er essais :*** est basée sur la dissolution de chaque PA(s) dans un solvant tel que : la néomycine dans la solution de XG, la nystatine dans HN, et la triamcinolone dans le PG (Figure III.17.a)
- ***2 ^{eme} essais :*** dissolution de la nystatine et de triamcinolone dans HN et la néomycine dans PG (figure III.17.b).

- ***3emeessais :*** dissolution de la nystatine et de triamcinolone dans la phase aqueuse et la néomycine dans la phase huileuse (figure III.17.c).

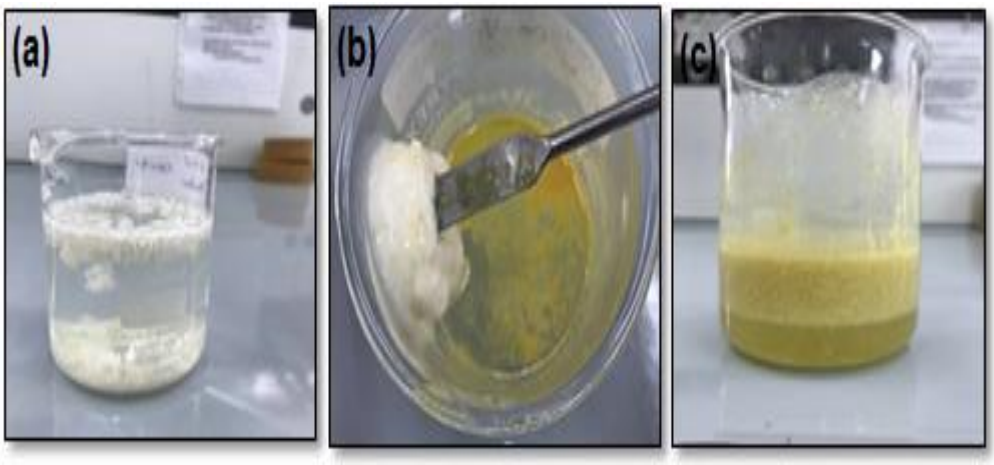


Figure III.17. Techniques d'incorporations des principes actifs lors de la formulation de l'émulsion

Les résultats des trois essais effectués pour l'incorporation des principes actifs indiquent que la néomycine ne peut jamais être mélanger avec une solution de XG. Une incompatibilité apparait entre la XG et le princie actif Néomycine.

Une étude plus approfondie devra être menée pour élucider les causes de cette incompatibilité.

Pour rester dans l'objectif principal de ce présent travail expérimental, on se propose de formuler une crème à base de Nystatine et de Triamcinolone acétonide.

III.8.1. Caractérisation du produit fini « crème »

Une analyse macroscopique basée sur une visualisation à l'œil nu des émulsions a été réalisée. La crème est Jaune, brillant et visqueuse (Figure III.18).



Figure III.18. Aspect macroscopique de la crème

Le tableau III.9 résume les contrôles de pH, conductivité et stabilité à la centrifugation de la crème.

Tableau III.9. Mesure des paramètres physico-chimiques de la crème

Paramètres	**pH**	**Conductivité (µs/cm)**	**Stabilité (tr/min)**
Crème	5.89 ± 0.12	520 ± 3.54	40000

III.8.1.1. Etude de la viscosité de la crème : La viscosité de l'émulsion a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre rotatif de type HAAKE, Visco-Tester VT5^{R} en utilisant le mobile (Sp 5) à différentes vitesses de rotation situées entre 5 et 200 tr/mn. Les résultats de la viscosité en fonction de la vitesse de rotations sont regroupés dans le graphe (Figure III 19), représentant la variation de la viscosité apparente en fonction de la vitesse de rotation : η=f(V).

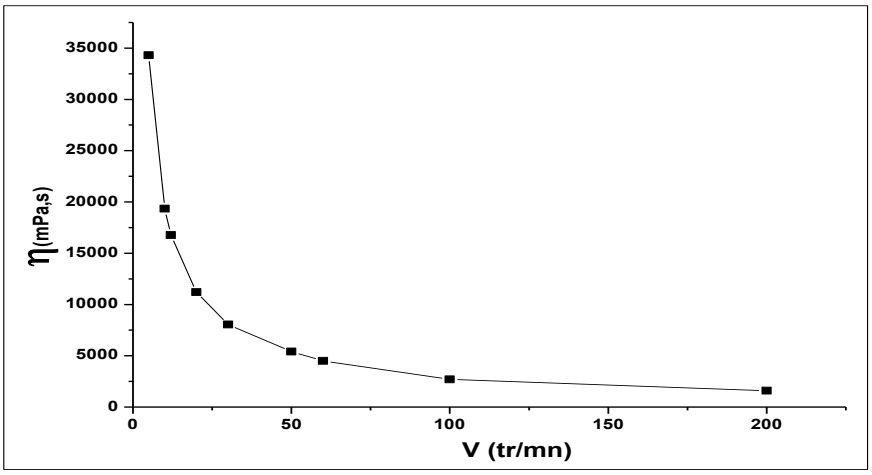


Figure III.19. Variation de la viscosité de la crème

On remarque que la viscosité apparente diminue en fonction de la vitesse de cisaillement, ce qui montre que les émulsions exhibent un comportement viscoélastique typique des fluides rhéofluidifiant.

III.8.1.2. Analyse quantitative des principes actifs (Dosage)

III.8.1.2.1. Identification et dosage du principe actif Triamcinolone acétonide : Une analyse par chromatographie à haute performance phase liquide(HPLC) a été effectuée pour l'analyse et le dosage du principe actif [52].

- **Conditions opératoires :**

- Régime isocratique.
- Colonne : C 18: 25cm×4,6mm×5µmPhénomenex ® 00G- 42 52 E0.

- Détection: UV 254nm.
- Volume d'injection 25µl
- Débit: 1,6ml/min.
- Phase mobile: Acétonitrile grade HPLC/ Eau distillée (35 : 65).puis filtrer avec un filtre de 0,45µm dégazer pendant 10 minutes.

▪ **Préparation de la solution standard :**

- Dans une fiole de 50 ml, introduire une prise d'essai exactement pesée de 38 mg en Triamcinolone Acétonide.
- Faire dissoudre avec de l'alcool isopropylique puis compléter au volume avec le même solvant.
- Dans une fiole de 20 ml, prélever 2ml de la solution précédente et compléter jusqu'au trait jauge avec le même solvant.
- Dans une fiole de 20 ml, prélever 10 ml de la solution précédente et compléter jusqu'au trait jauge avec la phase mobile.

▪ **préparation de la solution échantillon :**

- Dans un bécher, introduire une prise d'essai exactement pesée de 1,5 g du mélange final crème.
- Ajouter 10 ml d'alcool isopropylique. Fermer le bécher. Chauffer la solution pendant 10 minutes à 50°C puis, agiter vigoureusement pendant 1 minute.
- répéter l'opération du chauffage et l'agitation 3 fois.
- Refroidir la solution dans un bain glacé de méthanol pendant 20minutes.
- Centrifuger pendant 15 minutes.
- Prélever 5ml du surnageant dans une fiole jaugée de 20 ml et ajouter 5ml alcool isopropylique puis compléter jusqu'au trait jauge avec la phase mobile.
- Refroidir pendant 15 minutes dans un bain glacé de méthanol tout en agitant et filtrer la solution à travers un filtre membrane de 0,45 µm afin d'obtenir une solution limpide

▪ **Formule de calcul :**

Le titre en Triamcinolone Acétonide dans le mélange final est donné par la formule suivante :

$$\boldsymbol{T}(\%) = \frac{\boldsymbol{A_{éch} * C_{std} * puiss(std)}}{\boldsymbol{A_{std} * C_{éch}}}$$

- A éch : Aire de l'échantillon.
- A std : Aire de standard de référence.
- Puiss (std) : puissance en mg/mg du standard de référence.
- C std : Concentration de standard de référence en mg/ml.
- $C_{éch}$: Concentration de l'échantillon en mg/ml.

Le pic de l'échantillon doit être semblable à celle du standard et la limite du titre de principes actif est (0,090 et 0,110) g/100 g soit (0,090 à 0,110)%.

III.8.1.2.2. Identification et dosage du principe actif Nystatine : Une analyse qualitative par spectrophotométrie UV /Vis par comparaison entre les spectres obtenus pour une solution standard et une solution échantillon a été effectuée [52]. L'analyse quantitative est effectuée par dosage microbiologique [52].

- **Solution standard**
  - Peser 5.76 mg de la nystatine standard de référence dans 10 ml de chloroforme
  - Ajouter 40ml de méthanol puis agit,
  - Filtrer la solution et prélever 1 ml du filtrat dans 25 ml de méthanol
- **Solution échantillon**
  - Disperser une quantité contenant 25000UI équivalent à 0.25 g de la Crème dans 10 ml de chloroforme
  - Ajouter 40ml de méthanol puis agit,
  - Filtrer la solution et prélever 1 ml du filtrat dans 25 ml de méthanol.

Les spectres obtenus lors de l'analyse de la solution standard de Nystatine et de la solution échantillon (Figure III.18) présentent les mêmes maximums d'absorption illustrés par des pics à 291nm, 305nm et 319 nm. Ces résultats indiquent une identification (qualitative) du principe actif dans la crème.

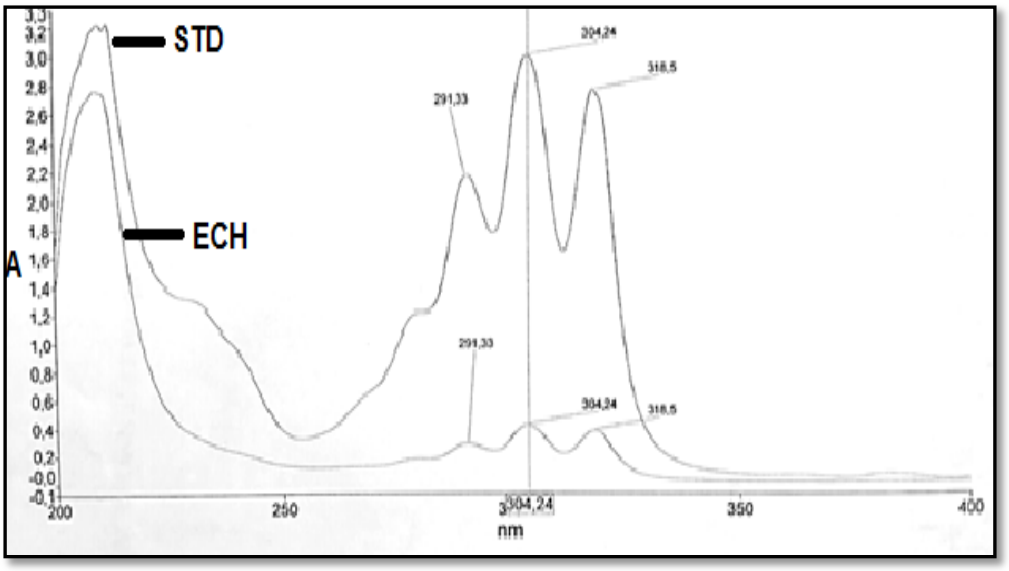


Figure III.20. Spectre UV de la Nystatine dans la crème

- **Dosage microbiologique de la nystatine** [52]
  - **Préparation de solution standard**
  - Peser 50 mg de STD Nystatine,
  - Compléter jusqu'à 50 ml par dimethyl-formamide
  - Prendre par une pipette 12.5 ml de solution dans une fiole de 100 ml
  - Compléter jusqu'à 50 ml par une solution tampon pH6 à 10%, et agiter bien le mélange
  - Dans 5 fiole de 50 ml, prendre les quantités suivante 3.2ml 4ml 6.2ml 7.8 ml et compléter au 50 ml par solution tampon pH6pour chaque solution de ces derniers on prépare 3 boites de pétri, chaque une contient 6 cylindres.
  - **Préparation de solution échantillon**
  - peser 1 g de la crème
  - ajouter 100 ml de dimethyl-formamide
  - agiter filtrer la solution par un papier filtre de 0.45
  - prendre 3.8ml de la solution filtrée. Dans une fiole de 50 ml
  - Compléter jusqu'au 50ml par une solution tampon pH6
  - à l'aide d'une pipette pasteur mettre une goute dans chaque cylindre incubé la boite pétri 18h à 25h.

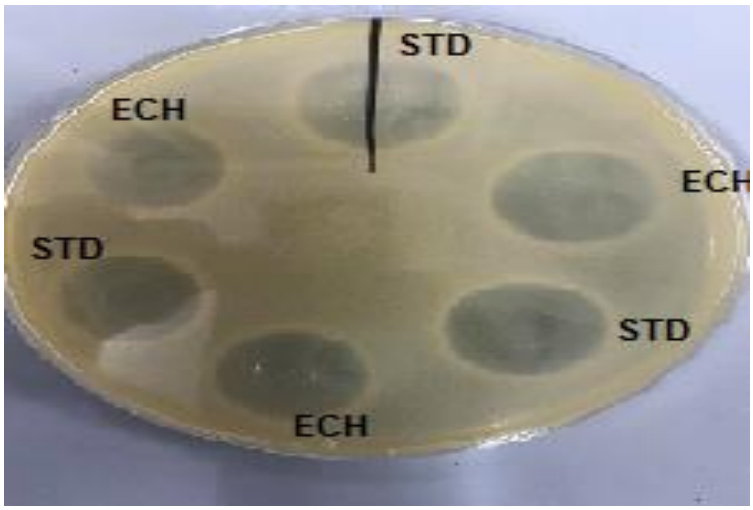


Figure III.21. Antibiogramme de Nystatine dans la crème

Tableau III.10. : Résultats des dosages des PA (s)

Dosage	**T (%)**	**Limites (%)**
Triamcinolone acétonide	0.098 ± 0.001	**0,090 - 0,110**
Nystatine	1.71± 0.02	**1.39- 0.201**

III.8.1.3. Contrôle de la pureté microbiologique de la crème

Dans cette partie, un contrôle microbiologique de la crème est effectué afin de confirmer la qualité microbiologique (pureté microbiologique) de la préparation pharmaceutique administrée par voie locale [52].

Les principales étapes de l'étude de la pureté microbiologique de la crème sont résumées ci-après [52] :

III.8.1.3.1. *Préparation de l'échantillon*

- Désinfecter l'échantillon par l'alcool éthylique puis exposer à l'UV sous une hotte a flux laminaire pendant 20min
- Peser 10 g ou 10 ml de la crème à analyser dans une fiole stérile
- Chauffer au bain marie à 40 – 45°C jusqu'à la solubilisation de crème

III.8.1.3.2. *Dénombrement des germes viables totaux*

- A l'aide d'une pipette stérile Introduire 1 ml de la suspension préparer dans une boite de pétri, et 20 ml de milieu de soja liquéfie Où la T° n'est pas supérieur à 45°c
- Mélanger en remuant la boite de pétri dans le sens circulaire à gauche puis à droite et laisser reposer jusqu'à solidification.

- Faire incuber à 30°C-35°C pendant 5 jours
- Dénombrer les colonies qui se développent
- Calculer le nombre de colonies par gramme ou par millilitre du produit.

III.8.1.3.3. *Dénombrement de moisissures et levures*

- Introduire dans une boite de pétri 1 ml, avec une pipette stérile de la suspension préparer, et 20 ml de milieu de sabouraud liquéfie additionné à quelque gouttes d'antibiotique (Gentamine ou oxytétracycline) stérile.
- Mélanger en remuant la boite de pétri dans le sens circulaire à gauche puis à droite et laisser reposer jusqu'à solidification.
- Faire incuber à 20°C-25°C pendant 5 jours
- Dénombrer les colonies qui se développent
- Calculer le nombre de colonies par gramme ou par millilitre du produit.

III.8.1.3.4. *Recherche des entérobactéries*

- Peser 10 ml de la crème et diluer dans un flacon de 90 ml du milieu liquide bouillon lactosé.
- Chauffer au bain marie à T° 40-45° C pendant un minimum de temps et jusqu 'à obtention d'une solution.
- Faite incubée à 35 – 37°C pendant 2h à 5h.
- Agiter le flacon puis prélver 1 ml de la solution dans un tube contenant 9ml de milieu d'enrichissement Mossel stérile.
- Incuber à 35-37°C pendant 18h-24h.
- Effectuer une subculture sur gelosé F et incuber à 35-37 °C pendant 18h-24h.
- Le produit satisfait à l'essai, s'il ne se développe aucune colonie de bactéries à Gram négatif sur le milieu.

III.8.1.3.5. Recherche de staphylococcus aureus

- Ensemencer 90 ml du milieu bouillon de soja avec 10 ml de solution
- Incuber à 35-37°C pendant 24-48 h.
- Faire une subculture sur milieu Chapman.
- Incuber à 35-37 °C pendant 24-48h.

III.8.1.3.6. *Recherche des salmonelles*

- Prélever 1 ml de la lecture enrichie du 2eme flacon du milieu bouillon lactosé (B.L2) Et ensemencer 10 ml de milieu sélénite.
- Faire incuber à 42°C pendant 24h
- Faire des subcultures sur un milieu gélosé XLD à partir du bouillon enrichi précédent.

- L'apparition de colonies rouges présentant ou non un centre noir ; approuver par test API 20 E confirme les salmonelles.

III.8.1.3.7. Recherche *d'E. coli.*

- Ensemencer 90ml du 1er flacon du milieu bouillon lactosé (B.L.1) avec 10ml ou 10g de la crème.
- Incuber à 37°C pendant 24 h.
- Ensemencer 90ml du 2eme flacon du milieu bouillon lactosé (B.L2) avec 10ml du milieu bouillon lactosé du 1er flacon.
- Incuber à 42°C pendant 24h.
- Effectuer une subculture sur plaque de milieu gélosé de mac-conkey
- Incuber à 42°C pendant 24h.
- L'apparition de colonies rouges, non muqueuses, Gram (-) en bâtonnets et approuver un test API 20 E confirme E coli.

III.8.1.3.8. Recherche des *Pseudomonas aeruginosa*

- Faire une culture sur milieu gélosé cétrimide c'est-à-dire. A partir du milieu bouillon de soja précédent ensemencé.
- En absence de microorganismes, le produit satisfait à l'essai l'apparition des colonies en bâtonnets Gram (-) verdâtre et fluorescentes oxydes (+) ; faire une culture à 42h °C sur milieu liquide aux peptones de caséine et de soja et approuver avec galerie API 20 E confirme le *pseudomonas aeruginosa.*

Les résultats du contrôle microbiologique de la crème sont représentés par le (tableauIII.11)

TableauIII.11. : résultats du contrôle microbiologique de la crème

Test	**Normes** [52]	**Résultats obtenus**
Germes aérobie viables totaux	≤ 200 UFC/g	03 UFC/g
Levures et moisissures	≤ 20 UFC/g	07 UFC/g
Entérobactéries	Absence	Absence
Staphylococcus aureus	Absence	Absence
Pseudomonas aeruginosa	Absence	Absence
E. coli	Absence	Absence
Salmonelle	Absence	Absence

Les résultats du contrôle microbiologique de la crème sont conformes aux normes décrites par la pharmacopée européenne [52].

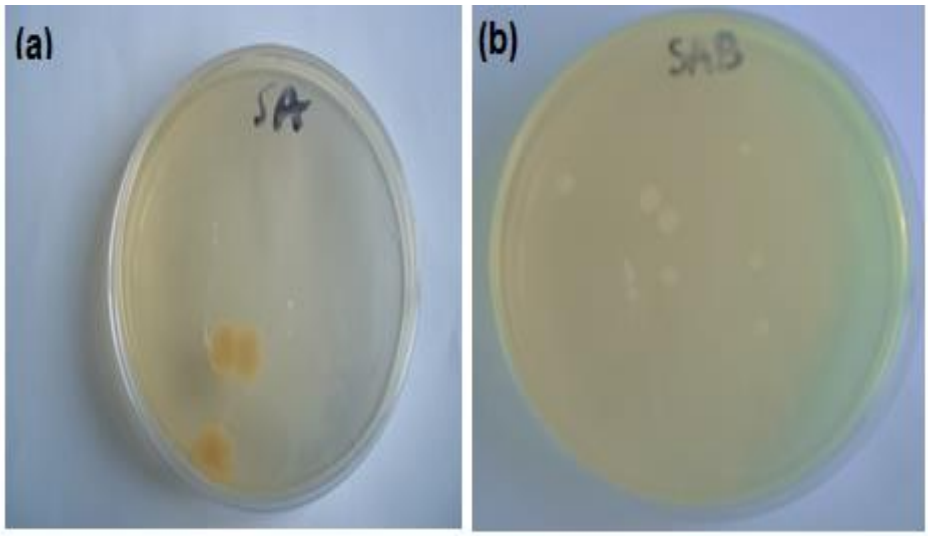


Figure III.22. (a) Développement des Germes aérobie viables totaux,
(b) Développement Levures et moisissures

III.9. Evaluation de la tolérance cutanée in vivo

Les tests de la tolérance ont pour but de prédire à partir de la connaissance de la toxicité sur un organisme vivant animale, le risque toxicologique chez l'homme [53].

III.9.1. Principe

La méthode est réalisée sur 6 lapins de souche néo-zélandaise, et californienne. La méthode est inspirée d'une méthode standardisée par DRAIZE [54]. C'est un test de toxicité aigüe (application unique de produit) des médicament topique (gel, pommade et crème).

Le système de cotation des phénomènes observés permet de dégager par un calcul un indice d'irritation primaire cutanée (IP). Pour classer les produits en 4 catégories.

III.9.2. Mode opératoire

- La veille du jour d'application du produit « crème », les fourrures des lapins sont rasés à l'aide d'un Rasoir au niveau du dos et des flancs sur une surface d'environ 14*14 c, sont conservés pour la suite de l''essai. 6 lapins par produit présentent une peau saine et glabre.
- Le jour de l'essai, on effectue sur le flonc droit à l'aide d'une lame de scalpel stérile, trois scarifications espacées de 0.5 cm et longées 2 cm.
- Le flanc gauche restent tel quel, les scarifications doivent abraser la couche cornée sans provoquer de saignement.

- On dépose à l'aide d'une seringue de 1 ml, 0.5ml de produit sur une compresse stérile de 2.5×2.5 cm appliqué ensuite sur le flanc scarifie et le flanc normal et recouvert par une bande de sparadrap perforé.
- Les lapins sont réunis dans leurs cages.

III.9.3. Lecture

- Après 24 h, les pansements sont ôtés, les résultats sont lus au bout d'une demi-heure, Une seconde et une troisième lecture sont faits respectivement 48h et 72h après l'application du produit.
- Les lectures consistent à apprécier l'érythème et l'œdème selon l'échelle numérique figurant dans le tableau III.12

Tableau III.12 Résultats représentatif de l'échelle numérique
Lectures de l'érythème et de l'œdème [54]

Echelle	Erythème	Œdème
0	Pas d'érythème	Pas d'œdème
1	Leger d'érythème	Très Léger œdème
2	Erythème bien visible	Léger œdème
3	d'érythème important	Œdème moyen (épaisseur environ 1 mm)
4	d'érythème grave(rouge pourpre) avec ou sans escarre (lésions profondes)	Œdème grave (épaisseur supérieure de 1 mm et surface supérieur à la zone d'application)

III.9.4. Expression des résultats

- Pour calculer l'indice d'irritation primaire cutanée (IP), on additionne les chiffres relevés pour l'érythème et l'œdème à chaque temps (24 et 72 h) après l'application sur 6 zones scarifies d'une part et les zones non scarifies d'autre part, puis on calcule la moyenne des résultats observes.
- La somme totale est divisée par le nombre d'examens effectués.
- La moyenne des notes obtenues constitue l'indice d'irritation primaire cutanée (IP) ; celui-ci permet de classer le produit en 4 types de repenses (Tableau III.13).

Tableau III.13 : tableau représentatif des différents types de réponses cutanées [54]

Type de réponses	**L'indice d'irritation primaire cutanée**
Non irritant	IP ≤ 0.5
Légèrement irritant	0.5 ≤ IP ≤ 2
Irritant	2 ≤ IP ≤ 5
Tés irritant	5 < IP ≤ 8

L'indice d'irritation primaire (IP) calculé de 0.25 est inférieur à 0.5 ce qui montre que la crème produite est non irritante (Tableau III.14**)**

Tableau III.14. Résultats de test d'irritation

	Erytheme		Oedeme	
	Gouche	Droite	Gouche	Droite
Lapin 1	0	0	0	0
Lapin 2	0	0	1	0
Lapin 3	0	0	0	0
Lapin 4	1	0	0	1
Lapin 5	1	0	0	0
Lapin 6	0	0	1	1

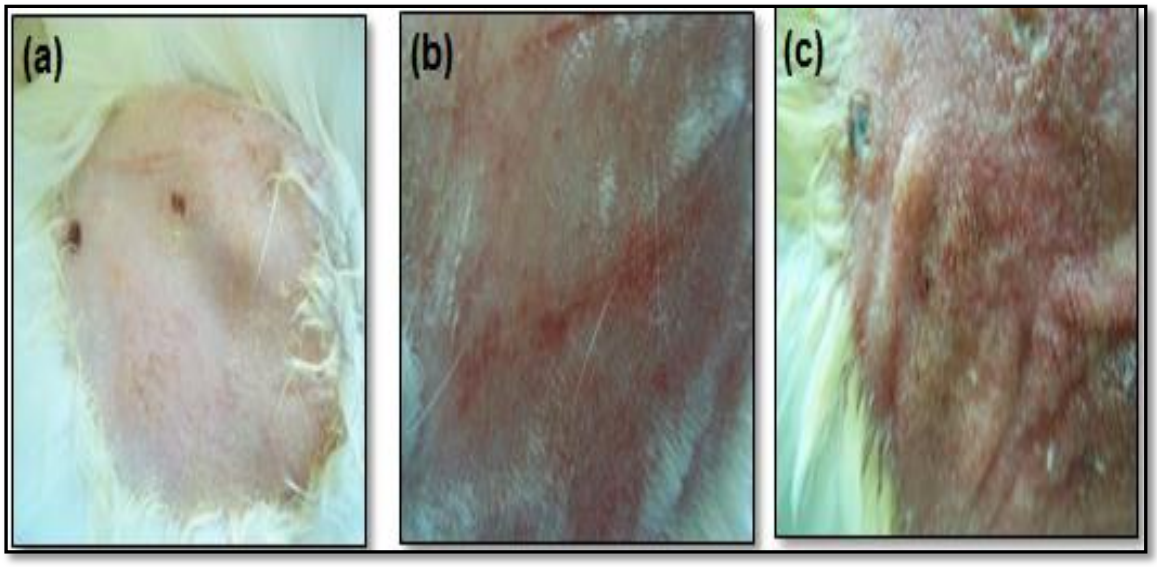


Figure III.23. Résultats du test d'irritation **(a):** 0 Erythème,0 Œdème **(b)**. : 1 Erythème, 0 Œdème **(c)** : 0 Erythème ,1 Œdème

III.10. Conclusion

Lors de cette presente étude, le contrôle qualité des matiéres premiéres utilisées selon les normes de la pharmacopée en rigueurs a montré une conformité des tests physico-chimiques et microbiologiques des principes actifs utilisés.

Une étude de pré formulation a permis la préparation de plusieurs essais placebos à base de déférentes fractions des constituants de l'émulsion. La mesure de pH ont montré que les émulsions ont des valeurs de pH compatible avec celui de la peau, et par conséquent peuvent être utilisée comme véhiculant pour voie dermique. Les valeurs élevée de la conductivité confirme le type d'émulsion H/E.

L'étude de la stabilité accélérée des systèmes dispersés a montrée que les formulations renfermant de la vaseline seule ou en association avec l'huile de Nigelle sont moins stable que les émulsions à base d'huile de nigelle seule. Une caractérisation par la microscopie optique montre que les particules de l'émulsion à base d'huile de nigelle seule, présentent une taille homogène, ce qui indique que le système est mono dispersé.

Une formule placebo optimale a été choisie selon les résultats de la caractérisation physicochimique. Des tests de stabilité accélérées (Stabilité à la centrifugation) et l'étude microscopique ont permis de confirmer la formule placebo optimale. La formulation optimale de l'émulsion finale est composée de 70% en phase aqueuse (solution de XG à 2 %) et 30% de phase huileuse (10% de Propylène glycol et 20% d'Huile de Nigelle). Cette émulsion est la base de la créme composée de Nystatine et de Triamcinolone acétonide.

Cette étude a permis de mettre en évidence les effet antibacteriens sur plusieurs type de souches étudiées de l'huile de nigelle. Une incompatibilité a été confirmé entre le principe actif « Néomycine » avec la gomme Xanthane, lors des études de formulation.

Les contrôles physico-chimiques et microbiologiques de la crème ont donnés des résultats satisfaisant. Les résultats de la viscosimétrie ont montré que la crème présente un comportement viscoélastique typique des fluides rhéofluidifiant.

Des tests pharmaco-toxicologiques ont été réalisés sur la crème obtenue afin de vérifier la sécurité du produit obtenue. En effet, un test d'irritation a permis de révéler que la crème est non irritante pour usage cutané.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

L'objectif de ce présent travail était la formulation d'une crème générique à base de principes actifs anti-infectieux (la Néomycine , la Nystatine et la Triamcinolone acétonide). La crème formulée est une émulsion de type H/ E à base d'huile de nigelle devant répondre aux normes de la pharmacopée Européenne.

Dans un premier temps, le contrôle qualité des principes actifs utilisés à été effectuées selon les normes de la pharmacopée en vigueur. Des analyses physicochimiques ont révélés la conformité des matières utilisées.

Une étude de preformulation a permis de mettre au point une émulsion stabilisée par la gomme Xanthane. Le mécanisme de stabilisation a été interpretée par un effet electrosterique de la molécule du biopolymére sur la dispersion d'huile de nigelle dans la phase continue aqueuse. En effet, les emulsions étudiées sont stable à une concentration de 2% en gomme Xanthane.

Cette étude a permis de mettre en évidence les effet antibacteriens sur plusieurs type de souches étudiées de l'huile de nigelle. Une incompatibilité a été confirmé entre le principe actif « Néomycine » et la gomme Xanthane, lors des études de formulation.

Enfin, une crème a été formulée avec succès à base d'huile de nigelle contenant la Nystatine et la Triamcinolone acétonide. La crème est une émulsion H/E, dont les tests physicochimiques, microbiologiques, viscosimétriques et toxicologiques sont conformes aux normes pharmaceutiques. La crème répond positivement au test de tolerence dermique et assure un effet therapeutique proche que celui de plusieurs preparations pharmaceutiques notamment la pommade princeps « mycotide ».

Ce travail doit être complété par une étude des interactions éventuelle des principes actifs avec la gomme xanthane par des méthodes physicochimiques plus performantes telle que la DSC ou le potentiel zêta.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

[1] Canselier J.P., Poux M., Procédés d'émulsification: Mécanismes de formation des émulsions, Techniques de l'ingénieur, 2004.

[2] Larpent C., Tensioactifs. Techniques de l'ingénieur, traité constantes physicochimiques K342 : 1-14 p.1995

[3] Ficheux F., Bonakdar L., Lea-Caldaron F., Bibette J., Some stability criteria for double emulsions, Langmuir, 1998.

[4] Bognolo G., Tensioactifs non ioniques: Mise en œuvre industrielle, Techniques de l'ingénieur, 2004.

[5] Kabalnov A., Wennerstrom H., Macroemulsion stability: the oriented wedge theory revisited, Langmuir, 1996.

[6] Felton L., Remington., Essentials of pharmaceutics **.** Pharmaceutical press, Philadelphia, 448- 449 p, 2013.

[7] Doumeix O., Opérations Unitaires En Génie Biologique**.** Tome 1: Les Émulsions, CRDP d'Aquitaine,2011.

[8] Fiberg S., Venable R., Microemulsions, In Becher P., Encyclopedia of emulsion technology vol 1, New York, Marcel Dekker, 1983.

[9] Solans C., Pons R., Kunieda H., Overview of basic aspects of microemulsions, In Solans C., Kunieda H., Industrial applications of microemulsions vol 66, New York, Marcel Dekker, 1997.

[10] Solans C., Izquierdo P., Nolla J., Azemar N., Garciz-celma M., Nano-emulsions. Current opinion in colloid and interface science, 2005.

[11] Pierat N., Préparations d'émulsions par inversion de phase induite agitation, Université Henri Poincare, Nancy, 2010.

[12] Joachim A., developpement de nouvelles methodes pour l'elaboration d'emulsions multiples eau/huile/eau. Institut national polytechnique de lorraine ecole national superieure des industries chimique. discipline : genie des procedes, 8p. 2003.

[13] Bhandari B.R., Dumoulin E., Richard H., Techniques de préparation d'arômes élaborés (chapitre 7) dans Les arômes alimentaires, Éd. Lavoisier, Paris, 438p, 1992.

[14] Guimberteau F., Dagleish D., Bibette J.M.J. Emulsion multiple alimentaire composée d'une emulsion primaire inverse dispersée au sein d'une phase continue aqueuse. Brevet FR 2 828 378-A1, 22p, 2001.

[15] Anisha A ., Sunisha k ., Shyam bihari S ., recent advancements and applications of multiple emulsions. school of studies in pharmaceutical sciences, jiwaji university, gwalior, madhya pradesh, india , international journal of advances in pharmaceutics, 2015.

[16] Clausse D., Daniel-david D., Gomez F., Komunjer L., Pezron I., Dalmazzone C., Noik C., Emulsion stability and interfacial properties - Application to comple emulsions of industrial interest.in: Tadros, T.F. (Ed), Wiley- VCH Pub, Weinheim, Colloid and interface science series - colloid, Stability and application in pharmacy, 2007.

[17] Brochette P., Emulsification : Elaboration et étude des émulsions. Techniques de l'ingénieur, traité Génie des procédés. J2150, 1-18p, 1999.

[18] Denine R., Cours de pharmacie galénique .Office des publications universitaires, 149p, 2008.

[19] http://ressources.unisciel.fr/formulation_cosmetique/co/1-3.html consulter le 28/04/2018

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

[21] Yahoum.,M.M., Formulation et caractérisation de fluides a structure complexe : Application aux dispersions.Thèse de doctorat en génie des procédés. Université de Médéa. Algérie.2017.

[22] Damodaran S., Protein stabilization of emulsions and foams, Journal of food science, 2005.

[23] Carlos J.M.H., W/O Emulsions: Formulation, characterization and destabilization, Caracas, Venezuela, 2009.

[24] Hou C., Characterization of new yeast lipases, Journal of the american oil chemists' society, 1997.

[25]Gogny. M.,Puyt.J.D.,Pellerin.J.L., Classification des principes actif. L'arsenal thérapeutique Vétérinaire, Edition le point vétérinaire, 165-168p, 2001.

[26] Ogawara H., Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. Microbial, Rev,45(4), 591-619p, 1981.

[27] Emmanuel E., Evaluation des risques sanitaires et ecotoxicologiques lies aux effluents hospitaliers. L'institut national des sciences appliquées de Lyon pour l'obtenir de grade du docteur, Formation doctorale: science et technique du déchet école doctoral de chimie de Lyon, 59-60p, 2003.

[28] Zeba B.,Overview of β-lactamase incidence on bacterial drug resistance, African journal of biotechnology,4 (13):15591562, 2005.

[29] Gérard J., Tortora., Berdell R., Funke., Christine L., Case., Introduction à la microbiologie,608-612p, 2003.

[30] Flandrois J.C., Courco L., Lemeland J.F., Ramuc M., Sirot J., et Souny C.J., Bactériologie médicale , Pesses Universitaire de Lyon, ISBN : 2729705678, 1997.

[31] Hermann T., Drugs targeting the ribosome. Corrent opinion in microbiolgie. 15, 335-366p, 2005.

[32] Nilius A.M., et Ma Z., Ketolides: the future of microlides?. Current Opinion in Pharmacology, 2 : 1-8p, 2002.

[33] Chopra I., Research and developpement of antibacterial agents. Current opinion in Microbiology. 1:495-501p, 1998.

[34] Madigan M.T., Martinko J.M., and Parker J., in brockbiology of microogranisms, prentice hall upper saddle river, nj,usa, ninth edition , 749-717p, 2000.

[35] Brion J.D et al , Médicament antibiotique vol 3, traité de chimie pharmaceutique ,paris : Tec et Doc Lavoisier, 291-321p,1992

[36] Chabasse D., Guigen C., Contet-audonneaun. mycologie médicale, Masson, paris :isbn 2-225-82912-8,324p,1999.

[37] Sanglard D., mécanismes de résistance aux antifongiques. in : infections fongiques : résistance et nouvelles modalité thérapeutiques, jidif : optimed ed ,29-45p, 2003.

[38] Ghannoum M.A., Rice L.B. antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin, microbiol, Rev ,12(4):501-517p, 1999.

[39] Palacios D.S., Dailey I., Siebert D.M., Wilcock B.C., et al. Synthesis- enabled functional group deletions reveal key underpinnings og amphotericin B ion channel and antifungal activities, PNAS,108(17)6733-6738, 2011.

[40] Sanglard D., Bille J., Résistance aux antifongiques, implications en clinique. Annales de l'institut Pasteur/Actualités : les mycoses, ISSN 0924-4204,2003.

[41] Fjaervik E., Zotchev SB., "Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in Streptomyces noursei", Appl, Microbiol. Biotechnol,67 (4): 436–443p,2005.

[42] Dewick ., Paul M., Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach . UK: John Wiley & Sons Ltd,3rd ed, ISBN 0-471-97478-1,2009.

[43] Patricia P., antifongiques intérêt des associations ,2007.

[44] Vermes A., Guchelaar H J., Dankert J., Flucytosine : a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions.J Antimicrob Chemother,46: 171-179p,2000.

[45] Mimoz O., Traitements antifongiques. In : communications scientifiques. Edition MAPAR: Le Kremlin Bicêtre, 2000.

[46] Lewis R.E., Pharmacokinetic-pharmacodynamic optimization of triazole antifunTherapy, Curr,Opin, Infect, Dis ,24(suppl2):14-29p, 2011.

[47] Kofla G., Ruhnke M., Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin In the treatment of invasive candidosis – review of the literature. Eur J Med Res, 16:159-166p, 2011.

[48] Lacroix C., Dubach M., Feuilhade M., Les échinocandines: une nouvelle classe d'antifongiques. Med et Mal infect, 33(4):183-191p, 2003.

[49] sante-medecine.journaldesfemmes.fr/faq/15771-corticosteroide-definition

[50] https://www.rxlist.com/triamcinolone-cream-drug.htm.consulter le 19/04/2018

[51] Antonot et Marchal. Statistical confidence for likrhood-based paternity inference in natural populations. Molecular ecology, 7 : 639-655p,1998.

[52] La pharmacopée Européenne

[53] Pradeau D., L'analyse pratique du médicament, France: édition médicale Internationale, 17, 22, 69, 70p, 1992.

[54] Snoussi H.,Mayouf M, mise au point d'une crème dermique à base d'extrait d'eucalyptus globulus controle physicochimique,microbiologique et toxicologique,université saad Dahlab,Blida, algerie ,2008.