# الجمهوريسة الجزائرية الديمق راطية الشعبية

## République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAÎD FACULTÉ DE MÉDECINE DR. B. BENZERDJEB - TLEMCEN



وزارة السستعليم العسالسسي والبحث العسسلمسي جامعة أبو بكر بلقا يد كلية الطب د. ب. بن زرجب – تلمسان

# DEPARTEMENT DE PHARMACIE DIRE DE FIN D'ETUDES POUR L'ORTENT

# MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

# Formulation d'un écran solaire à base d'extrait de feuilles de *Camellia sinensis*

#### Présenté par :

OUAHRANI Fethallah

MOHAMMEDI Akram Yassine

**Soutenu le :** 17/10/2021

#### Les membres de jury :

#### Président

• Pr. ABOUREJEL Nesrine

Maitre de conférence A en Toxicologie

**Membres:** 

• Dr. BABA AHMED Sihem

Maitre assistante en Pharmacognosie

• Dr. BENATTA Dalila

Maitre assistante en pharmacie galénique

**Encadrant:** 

Pr. SELKA Adil

Maitre de conférences classe A en Pharmacognosie

Co-encadrant

Dr GUENDOUZ Souhila

Maitre assistante en pharmacie galénique

Année Universitaire: 2020-2021

# Remerciements

Alhamdoulillah, nous remercions d'abord Allah de nous avoir aidé à conclure ces longues années d'études sur ce modeste travail, d'avoir répondu à nos prières et de nous avoir guidé pour avoir ce métier noble que nous espérons pouvoir honorer. Nous remercions toutes les personnes qui ont participé à ce travail.

Nous souhaitons remercier **Pr SELKA Adil**, MCA en Pharmacognosie à l'université de Tlemcen, faculté de médecine, département de pharmacie, pour avoir accepté de nous encadrer, de l'avoir fait avec beaucoup de compréhension et de bienveillance, votre rigueur dans le travail et votre simplicité nous ont beaucoup impressionnée. Puisse ce modeste travail être à la hauteur de vos attentes. Soyez assuré de notre profonde gratitude!

Nos sincère remerciement à **Dr ABOUREJEL Nesrine**, MCA en toxicologie à l'université de Tlemcen, faculté de médecine, département de pharmacie, pour avoir accordé l'honneur et le privilège de présider ce jury de thèse et cela malgré vos multiples occupations. Nous avons bénéficié de vos enseignements au cours de notre cursus universitaire. Veuillez trouver ici notre respectueuse considération. Que Dieu vous bénisse!

Je voudrais présenter mes remerciements à **Dr BABA AHMED Sihem**, maître assistante en pharmacognosie à l'université de Tlemcen, faculté de médecine, département de pharmacie, pour avoir accepté de faire partie de notre jury .Nous avons pu apprécier l'étendue de votre connaissance et votre grande qualité humaine.

Veuillez accepter, nos sincères remerciements et notre profond respect.

Je remercie **Dr BENATTA**, maître assistant en pharmacie galénique à l'université de Tlemcen, faculté de médecine, département de pharmacie, pour avoir accepté de siéger parmi notre jury, et pour la qualité du savoir que vous nous avez transmis, soyez assuré de ma gratitude et haute considération.

Je voudrais présenter mes remerciements à **Dr GUENDOUZ Souhila**, maître assistante en pharmacie galénique à l'université de Tlemcen, faculté de médecine, département de pharmacie, pour tout ce que vous avez apporté à notre étude, vos qualités humaine et professionnelles, votre modestie et bienveillance suscitent notre admiration, veuillez accepter notre reconnaissance et nos sincères gratitude.

# **Dédicaces**

Ce travail représente toutes ses longues années de persévérance, de travail, et de patience, il représente chaque petit instant de ce parcours plein d'amour pour la pharmacie, je remercie chaque personne qui ma soutenue, aider, aimer ... c'est à vous tous que ce travail est dédié.

# A mes très chers parents:

Aucun mot ne saurait exprimer ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance envers les deux personnes les plus chères à mon cœur ! Je vous dois ce que je suis. Vos prières et vos sacrifices m'ont comblé tout au long de mon existence. Que ce mémoire soit au niveau de vos attentes, présente pour vous l'estime et le respect que je voue, et qu'elle soit le témoignage de la fierté et l'estime que je ressens. Puisse dieu tout puissant vous procurer santé, bonheur et prospérité.

# A mes chères soeurs (Affaf et Yousra);

Pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré, pour toute la spontanéité et vos élans chaleureux, Je vous dédie ce travail. Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous vos vœux.

# A ma bien aimée

Ma fiancée **Hanane**, j'ai trouvée en toi l'oreille qui m'écoute, la lumières qui illumine mes nuits sombres, l'épaule qui me soutient merci d'avoir été là, de m'avoir poussé dans les moments difficiles je ne te remercierai jamais assez pour ce que tu as fait pour moi.

# A mes grands parents :

Vos prières et vos bénédictions m'ont été un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

# A mon cher binôme « Jethallah»

Tu as été pour moi plus qu'un ami! Je ne saurais trouver une expression qui témoigne de ma reconnaissance et des sentiments de fraternité que je te porte. Je te dédie ce travail en témoignage de notre amitié que j'espère durera toute la vie.

# A l'équipage :

Pour tous ces agréables et inoubliables moments passés ensemble, je vous souhaite plein succès dans votre vie professionnelle.

A mon frères de vie, de chemin Yacine.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

Mohammedi Akram Yassine

Ce mémoire est le fruit d'un long trajet plein de contraintes, mais aussi de vivacité et de persévérance, un parcours qui a commencé d'un pas, un rêve et qui s'achève par un titre honorable noble celui d'un Docteur en Pharmacie .A travers les mots suivants, je dédie ce mémoire

# A mes parents:

Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, je suis devenu la personne que je voulais être .Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect. Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

# A ma sœur (radia) et mes frères ( abdelkader, abdelhak et younes)

Toutes mes expressions de mes sentiments, de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.

# A mon cher binôme « Akram » et toute sa famille:

Nous avons eu beaucoup d'échanges riches et intéressants qui nous ont amené à mieux nous connaître .Tu es gentil, sensible et pleine de vie .J'avoue que j'apprécie énormément cet adorable personnage que tu es. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de santé

# A mes frères de vie

Bilal, Ibrahim, Mourad, Charaf et tous 'LES INDIENS'

# A l'équipage

Amine, Akram, Azzedine, Fouad, Ibrahim, Imad, Slimane et Saighi.

Le groupe de départ est resté le même jusqu'à l'arrivée.

# A mes coéquipiers

Gouti baba ahmed et ibrahim boushaba

**OUAHRANI** Fethallah.

# Liste des abréviations

**CCM**: chromatographie sur couche mince.

Cm: centimètres.

ECG: épicatéchine gallate.

EGC: épigallocatéchine.

EGCG: épigallocatéchine gallate.

GC: gallocatéchine.

GCG: gallocatéchine gallate.

Nm: nanomètre.

Ph: potentiel hydrogène.

μg: microgrammes.

UV: ultra-violet.

# Liste des figures

FIGURE 1: ASPECT GENERALE DU CAMELLIA SINENSIS (L.) KUNTZE	5
FIGURE $2$ : POUDRE DE FEUILLE THE VERT OBSERVEE AU MICROSCOPE OPTIQUE (GROSSISSEMENT $2$ )	
FIGURE 3 : PLAQUE CCM SOUS LAMPE UV2	8
Figure 4 : Courbe d'etalonnage de l'acide gallique2	9
FIGURE 5 : COURBE D'ETALONNAGE DE LA CATECHINE (FLAVONOÏDES)2	9
FIGURE 6 : COURBE D'ETALONNAGE DE LA CATECHINE (TANINS)2	9
Figure 7 : Teneur de l'extrait de feuille de the vert en polyphenols, flavonoïdes et anins condenses	
FIGURE 8 : COURBE DES POURCENTAGES D'INHIBITION DU DPPH EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE L'EXTRAIT DE FEUILLES DE THE	0
FIGURE 9 : COURBE DES POURCENTAGES D'INHIBITION DU DPPH EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ACIDE ASCORBIQUE	1
FIGURE 10 : VALEURS D'IC50 POUR <i>CAMELLIA SINENSIS</i> ET L'ACIDE ASCORBIQUE	1
FIGURE 11 : COLORATION AU BLEU DE METHYLENE ET ROUGE DE SOUDAN	3
FIGURE 12 : OBSERVATION DE L'EMULSION A L'ŒIL NU APRES CENTRIFUGATION3	3

# Liste des tableaux

TABLEAU I: LA COMPOSITION DES DIFFERENTES FORMULATIONS A BASE D'HUILE D'AMANDE	
DOUCE	.24
TABLEAU II · ASPECT ET L'HOMOGENEITE DES DIFFERENTES FORMULATIONS	32

# Table des Matières

REMERCIEMENTS	I
DEDICACES	II
LISTE DES ABREVIATIONS	V
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VII
TABLE DES MATIERES	VIII
INTRODUCTION	
REVUE DE LA BIBLIOGRAPHIE	2
CHAPITRE I : CAMELLIA SINENSIS	3
1. Generalites:	4
2. Classification:	4
3. DESCRIPTION BOTANIQUE:	4
4. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE :	5
5. Composition Chimique :	
6. Proprietes therapeutiques:	7
6.1. Activité antioxydante :	
6.2. Effet sur le stress :	
6.3. Activité antimutagène et anticancéreuse :	
6.4. Activité cardiovasculaire :	
6.5. Activité antibactérienne :	
6.6. Protection contre les radiations solaires :	
CHAPITRE II : LES PROPRIETES ANTI-UV DU CAMELLIA SINENSIS	
1. EFFET SUR LE METABOLISME DE LA PEAU :	
2. ACTIVITE ANTIOXYDANTE :	
3. ACTIVITE PHOTOPRECTRICE:	
PARTIE PRATIQUE	
MATERIELS ET METHODES	
1. Materiel vegetal	
2. REACTIFS ET APPAREILLAGE	
3. IDENTIFICATION DE LA DROGUE	
3.1. Observation macroscopique	
3.2 Observation microscopique	14

# **Table des Matières**

3.3.	Chromatographie sur couche mince :	14
4. PR	EPARATION DE L'EXTRAIT :	15
5. Do	SAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES :	15
5.1.	Dosage des polyphénols totaux	15
5.2.	Dosage des flavonoïdes	16
5.3.	Dosage des tanins condensés	18
6. Ac	TIVITE ANTIOXYDANTE	18
7. DE	TERMINATION DU SPF IN VITRO	19
8. Ет	UDE DE FORMULATION	20
8.1.	Choix de la forme galénique	20
8.2.	Choix de la concentration du principe actif	20
8.3.	Choix des excipients	20
8.4.	Méthodes	22
8.5.	Formulation des crèmes à base d'huile olive	22
8.6.	Formulation des crèmes à base d'huile amande douce	23
RESULT	ATS	25
9. OB	SERVATION MACROSCOPIQUE	26
10 OB	SERVATION MICROSCOPIQUE	26
11. Сн	ROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	28
12. TE	NEUR DE L'EXTRAIT EN POLYPHENOLS, FLAVONOÏDES ET TANINS	28
13. Ac	TIVITE ANTIOXYDANTE :	30
13.1.	Détermination de la concentration inhibitrice IC 50%	31
14. DE	TERMINATION DU SPF IN VITRO	32
15. La	FORMULATION	32
DISCUS	SION	34
CONCLU	JSION	39
REFERE	NCES BIBLIOGRAPHIQUES	41

Introduction

La peau est continuellement exposée à une variété de stress environnementaux, y compris le rayonnement ultraviolet (UV). Les UVB sont des composants inhérents de la lumière solaire qui traversent l'épiderme et atteignent le derme supérieur, entraînant une augmentation du stress oxydatif, l'activation de la réponse inflammatoire et l'accumulation de dommages à l'ADN. L'augmentation des rayonnements UVB sur terre due à la destruction de l'ozone stratosphérique constitue une menace environnementale majeure pour la peau, augmentant le risque de dommages avec des conséquences à long terme, telles que le photovieillissement et la photocarcinogenèse [1].

Les extraits de plantes et les composés naturels ont été historiquement utilisés en médecine traditionnelle pour les soins de la peau sous forme de crèmes et de pommades mais l'effet de la plupart de ces composés reste à vérifier. Face à l'inquiétude croissante de la population face aux problèmes liés à la qualité de vie et à l'apparence, le marché des cosmétiques pour les produits anti-âge et photoprotecteurs à base de composés naturels ne cesse de croître, et il existe un besoin croissant d'expansion de la recherche dans ce domaine [2].

Le thé est l'une des boissons les plus populaires au monde. Les effets thérapeutiques du thé ont une histoire qui remonte à près de 5000 ans. Les thés blancs, verts et noirs sont produits à partir des feuilles du théier ;*Camellia sinensis*, et diffèrent par la façon avec laquelle ils sont obtenus et traités et, par conséquent, diffère également par la disponibilité des composés bioactifs. Le thé vert est obtenu en faisant frire les feuilles à la poêle ou à la vapeur, un procédé qui inactive la polyphénol oxydase endogène [3].

Les composants chimiques du thé vert comprennent principalement des polyphénols, de la caféine et des acides aminés. Le thé contient également des flavonoïdes. La plupart de ces composants se sont avérés agir comme des antioxydants, des agents anti-inflammatoires et immunomodulateurs, qui offrent une protection supplémentaire contre les effets néfastes de l'exposition aux rayons UV [2].

C'est pourquoi nous nous somme intéressé à essayer de formuler un écran total à base d'extrait de feuille de *Camellia sinensis*.

L'objectif principal de cette étude était de formuler un écran total de type émulsion en y intégrant l'extrait de feuille de thé comme principe actif.

L'objectif secondaire était de contrôler la drogue utilisée et de vérifier la stabilité de l'émulsion.

Revue de la bibliographie

#### 1. Généralités :

Le thé vert (*Camellia sinensis*) est une plante très répandue et son extrait a été largement utilisé dans le système médicinal traditionnel chinois. Dans ce contexte, plusieurs études ont révélé ses avantages pour la santé et ses potentialités médicinales contre plusieurs affections. C'est une plante médicinale connue en tant qu'antioxydant avec nombreux vertus pour la santé, après l'eau, c'est la boisson la plus consommée dans le monde [4].

## 2. Classification:

La classification du thé vert a beaucoup varié à travers le temps, notamment concernant l'attribution du théier à un ordre.

La classification (angiosperm phylogency group IV) des angiospermes revue en 2016 est la plus utilisé aujourd'hui :

• Embranchement: Spermatophytes

• **Division**: Angiospermes

• Classe: Dicotylédons

• Ordre: Ericales

• Famille: Theaceae

• Genre: Camellia L

• **Espèce:** *Camellia sinensis* (L.) Kuntze.[5].

### 3. Description botanique:

Le théier est un petit arbre dont la longueur varie de 10 à 15 mètres. Les fleurs sont odorantes, solitaires, elles sont dialypétales et les pétales sont blancs, pentamères, actinomorphes et bisexuées. Les étamines portent des anthères jaunes, elles sont polyadelphes soudées en faisceau. Le gynécée est composé de trois carpelles uniloculés .L'ovaire est supère, les pièces florales sont insérées en dessous. Le fruit est un trigone renfermant généralement deux graines oléagineuses entourées d'un tégument. Les feuilles sont brillantes de couleur vert foncé, persistantes, lisses, ovales ou lancéolées. Le parenchyme est riche en sclérites .La longueur varie de 4 à 16 cm et la largeur de 1.5 à 5 cm [6,7].



Figure 1: aspect générale du Camellia sinensis (L.) Kuntze.[8]

# 4. Distribution géographique :

L'origine du thé vert se situe au nord de l'Inde en s'étendant jusqu'au sud de la Chine. Les jardins du thé sont souvent situés dans les régions humides et pluvieuses.

Aujourd'hui les principaux pays producteurs sont : la Chine, l'Inde, le Sri Lanka, le Kenya, le Viêtnam et la Turquie.

La chine reste le plus gros producteur de thé au monde avec plus d'un million de tonnes par an, elle occupe plus de 35% de la production mondiale.

L'Inde produit environ 900 000 tonnes par an, environ 25% de la production mondiale. Le Kenya est le 3éme pays producteur avec plus de 300 000 tonnes produites par an. Le Sri Lanka est le 4ème pays producteur avec plus de 290 000 tonnes.

Certains pays produisent le thé traditionnellement comme la Chine et l'Inde et d'autres l'ont développé récemment comme la majorité des pays européens [9,10,11].

# 5. Composition chimique:

Le thé vert est une source très riche en composants bioactifs, dont les polyphénols qui sont considérés comme le principal composant actif du thé vert et qui représente plus d'un tiers de ses métabolites actifs.

➤ Les polyphénols : Ils constituent la famille des substances phytochimiques la plus pertinente en terme d'effets bénéfiques sur la santé humaine, parmi eux les flavonoïdes qui constituent le groupe le plus étendu et important des polyphénols et qui confère au thé vert son activité antioxydante et plus précisément la sous classe des flavonols aussi appelés catéchines qui sont responsables de son gout et de son amertume.

Les sous classes des catéchines présentent plusieurs isomères et énantiomères : épicatéchine, gallocatéchine, épigallocatéchine, épigallocatéchine gallate, gallocatéchine gallate, épigallocatéchine gallate, ce dernier est le plus abondant dans le thé vert, il représente approximativement 60% des catéchines totales.

Concernant les acides phénoliques, l'acide gallique reste le plus abondant. La présence d'acide caféique, et d'acide cinnamique a également été soulignée.

- Les alcaloïdes : ils comprennent la caféine, la théophylline et la théobromine.
- Les glucides : représente environ 25% de la teneur globale.
- ➤ Les protéines : forment environ 15% de la matière sèche dont la majeure partie est constituée

d'enzymes (principalement la polyphénol oxydase et la peroxydase), d'acides aminés surtout la théanine très abondante dans le thé vert et très importante pour la saveur, elle se trouve rarement dans d'autres plantes.

Les pigments: les deux groupes retrouvés dans les feuilles sont les chlorophylles et les caroténoïdes.

Les minéraux : le thé contient de nombreux éléments tel que le fer, le zinc, le magnésium, le sodium, le potassium, le cuivre, le nickel ....

Les composés volatils : alcools mono terpènes, aldéhydes, linalol ....

les vitamines : A, C, K, E..... [9, 12, 13, 14]

## 6. Propriétés thérapeutiques :

Le thé vert a été largement utilisé en médecine chinoise. Avec l'augmentation constante des connaissances médicales, les scientifiques ont réorienté leurs intérêts de recherche vers l'exploration des ressources naturelles, c'est-à-dire les plantes médicinales et les composés dérivés des plantes. La consommation de thé vert a gagné une attention particulière et une popularité dans l'ère moderne du changement.

## 6.1. Activité antioxydante :

Le stress oxydatif est considéré comme un déséquilibre biochimique et favorise plusieurs complications et maladies telles que l'athérosclérose et divers types de cancer. Parmi les propriétés des polyphénols, essentiellement la catéchine, sa capacité antioxydante. Ça justifie leurs actions antidiabétiques, anticancéreuses et antiathérogènes. Les catéchines sont aussi impliqués dans l'inhibition des enzymes prooxydantes (comme lipoxygénase et cyclooxygénase) et l'induction des enzymes antioxydantes (comme glutathion s-transférase). [15,16, 17, 18].

#### **6.2.Effet sur le stress :**

Bien que le thé vert contienne de la caféine, sa consommation produit une relaxation notable grâce à la présence des catéchines et de la L-théanine. Des études ont montré que l'EGCG a des effets sédatifs et hypnotiques sur le cerveau en agissant au niveau des récepteurs GABA [19,20].

# 6.3. Activité antimutagène et anticancéreuse :

Les effets anticancéreux du thé vert ont été démontrés dans de nombreuses études, montrant une inhibition de la croissance et une apoptose par les catéchines. Ces dernières ont aussi une activité antimutagène, évitant la formation de mutagène ou empêchant l'expression de la mutagénicité. l'EGCG bloque l'urokinase une enzyme impliquée dans la prolifération et la diffusion des tumeurs sur des cultures cellulaires et chez des animaux de laboratoire, il a été démontré que l'EGCG protège contre les processus carcinogènes induits dans différents organes, tels que la peau, les poumons et l'estomac. L'EGCG semble avoir une action antiangiogénique en empêchant la croissance des vaisseaux dans les tumeurs [21, 22, 23].

#### 6.4. Activité cardiovasculaire :

La consommation de thé vert a été associée à la protection contre les accidents vasculaires cérébraux, l'hypertension et l'athérosclérose, notamment en raison de ses effets antithrombotiques. Il diminue le taux sanguin du cholestérol et de LDL. Il diminue la solubilité micellaire du cholestérol au niveau intestinal et par conséquence réduit son absorption. L'acide gallique peut interagir avec la fonction de la p-sélectine, une molécule impliquée dans les athérothromboses.

Les catéchines semblent inhiber l'action de l'enzyme qui transforme l'angiotensine I en angiotensine II. Dans une autre étude menée en Chine auprès de 1507 sujets, on a constaté que la consommation quotidienne d'environ 600 ml de thé vert pendant un an réduisait le risque d'hypertension par rapport au groupe témoin où les sujets avaient un indice de masse corporelle, un régime alimentaire et un mode de vie similaires [24, 25, 26].

#### 6.5. Activité antibactérienne :

L'armée britannique a recommandé que tous les soldats aient du thé dans leur cantine pour prévenir la fièvre typhoïde. Il inhibe la croissance de plusieurs bactéries dont certaines espèces de Salmonella et de Bacillus. En ce qui concerne les virus, l'EGCG semble inhiber la transcriptase inverse, l'EGCG a toujours fait l'objet d'une attention importante contre l'infection par le virus ZIKA [27].

#### 6.6. Protection contre les radiations solaires :

Les catéchines sont un puissant protecteur topique contre les rayons solaires prévenant le photovieillissement et d'autres pathologies et ce qui a fait l'objet de plusieurs études qui vont être détaillées dans le deuxième chapitre [28].

Chapitre II : les propriétés anti-UV de

Camellia sinensis

La popularité croissante des produits de soin de la peau d'origine végétal, a poussé la population vers les traitements naturels exempts des substances toxiques.

Le thé vert, en raison de sa composition riche en antioxydants joue un rôle important dans la cosmétologie et dans la prévention des maladies dermatologiques.

### 1. Effet sur le métabolisme de la peau :

Les polyphénols ont un effet sur l'aspect de la peau et atténuent les dommages cutanés et l'érythème causés par les UV.

Les effets du camellia et de ses composants diffèrent selon la couche de la peau :

au niveau de la couche cornée, les polyphénols présentent une action antioxydante, par contre dans les couches profondes, ils ont une activité photoprotectrice significative en inhibant certaines enzymes telle que la lipoxygénase, la métalloprotéinase, la hyaluronidase et la collagénase. Ces enzymes ont un effet destructeur sur le complexe cellulaire en dégradant l'acide hyaluronique, l'élastine, le collagène ....

Les composants du thé vert améliorent la microcirculation qui se traduit par une meilleure nutrition et oxygénation. Les polyphénols empêchent aussi l'oxydation de la vitamine C qui participe à la synthèse du collagène. Ils améliorent le flux sanguin par la prévention de l'agrégation des plaquettes soit en freinant l'action protéolytique de la thrombine ou en inhibant l'activité des tyrosines kinase SYK et LYN [29, 30, 31].

### 2. Activité antioxydante :

Les antioxydants sont indispensables dans la prévention du processus du stress oxydatif, les propriétés antioxydantes des polyphénols sont largement connues, les catéchines du thé sont considérées comme les plus importantes substances antioxydantes dans l'alimentation humaine.

L'effet de la catéchine sur les radicaux libres comprend plusieurs mécanismes comme :

- La désactivation directe des espèces réactives de l'oxygène ROS et de l'azote RNS.
- La chélation des oligo-éléments qui participent à la génération des radicaux libres.
- ➤ La Participation à la production des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et la gluthatione.
- L'inhibition des enzymes impliquées dans la formation des ROS comme la monooxygénase, la succinoxydase et la NADH oxydase.
- La régénération des composés antioxydants (vitamine C et E) [32, 33].

## 3. Activité photoprotectrice :

Les rayonnements UV peuvent engendrer la cancérogénèse cutanée par de multiples mécanismes. Les UV induisent également une immunosuppression cutanée qui va permettre aux cellules dysplasiques de se transformer en néoplasme sans être détruites, il y avait donc un besoin de trouver des agents photoprotecteurs spécialement d'origine naturel.

En plus de ses activités antioxydantes, les feuilles du thé peuvent absorber directement les rayons ultraviolets. L'EGCG peut prévenir les effets des rayons UV par l'inhibition des collagénases. Des études ont montrés que l'extrait du thé, quand il est associé avec l'oxyde de zinc peut protéger contre les UVA et les UVB, par contre quand il est seul, il est actif que sur les UVB. Plusieurs études ont affirmé que l'EGCG réduit d'une manière dose-dépendante les dommages sur les cellules causés par les UV sur des cultures cellulaires de fibroblastes et de kératinocytes. D'autres études ont révélé que l'application d'un extrait du thé vert sur la peau peut réduire significativement l'expression de p53 induite par les UVB dans les kératinocytes. L'application d'une lotion riche en thé vert a donné une efficacité satisfaisante contre la détérioration épithéliale provoquée par les UV [32].

# Partie pratique

# Matériels et Méthodes

## 1. Matériel végétal

La plante étudiée s'appelle *Camellia sinensis* notoirement connue sous le nom du thé vert. La plante a été achetée chez un herboriste à Adrar sous sa forme sèche.

## 2. Réactifs et appareillage

**Réactifs**: Eau distillée, éthanol, méthanol, acétate d'éthyle, acide acétique, acide formique, acide chlorhydrique, iodure de potassium, carbonate de sodium, réactif de Folin-Ciocalteu, trichlorure d'aluminium, nitrite de sodium, hydroxyde de sodium, la vanilline, acide gallique, la catéchine, DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle). Huile d'amande douce, huile de paraffine, glycérol 98%, propylène glycol, gomme xanthane, span80, tween80.

**Appareillage :** évaporateur rotatif, lampe UV, spectrophotomètre UV VIS, balance électrique, bain-marie, verreries, pH mètre, microscope optique, bain à ultrasons, conductimètre, centrifugeuse, plaque chauffante, agitateur à hélice.

# 3. Identification de la drogue

## 3.1. Observation macroscopique

L'Observation des caractères macroscopique a été réalisé à l'œil nu, un examen organoleptique a également été effectué.

#### 3.2. Observation microscopique

Les feuilles de thé vert ont été pulvérisées en poudre fine, la poudre a été placée entre lame et lamelle dans deux gouttes d'hydrate de chloral, l'observation a été faite par un microscope photonique à différents grossissements. Chaque élément a été ensuite identifié et photographié [34].

#### 3.3. Chromatographie sur couche mince :

Un volume de 5 ml d'éthanol à 60 % V/V R a été ajouté à 1 g de drogue pulvérisée, le mélange a été macéré à une température de 40 °C sous agitation continue pendant 15 min, puis filtré à l'aide d'un papier filtre.

La Solution témoin a été préparée en dissolvant 25 mg de caféine et 5 mg de théobromine dans 10 ml d'éthanol à 60 pour cent V/V R. Deux phases mobiles ont été utilisées :

- ➤ Phase1: Acétate d'éthyle 100 ml, acide formique 11 ml, acide acétique 11 ml, eau distillée 26 ml.
- ➤ Phase 2 : Acétate d'éthyle 100 ml, méthanol 13.5 ml, eau distillée 10 ml.

Le dépôt a été effectué en bandes à l'aide d'un capillaire. À la fin de la migration un séchage à l'air a été fait pour faciliter la détection.

La détection a été faite sur 2 étapes :

- Détection A : examen en lumière ultraviolette à 254 nm.
- Détection B: un mélange à volumes égaux d'acide chlorhydrique et d'éthanol à 96 % a été pulvérisé. Le mélange a été séché complètement. Ensuite une solution préparée extemporanément en dissolvant 1g d'iodure de potassium (KI) dans 100 ml d'éthanol à 96% a été pulvérisée. Le chromatogramme a été examiné à la lumière du jour et sou UV à une longueur d'onde de 254 nm et 356 nm [34].

### 4. Préparation de l'extrait :

200 g de matériel végétal séché et pulvérisé ont été soumis à une macération avec une solution eau-éthanol 56% (1000 ml). Après 72 heures, 170 ml ont été recueillis et conservés dans un récipient ambré à basse température (4°C). L'extrait restant a été concentré à basse température sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un volume de 30 ml, qui a été ajouté à la solution d'extraction de 170 ml produisant un total de 200mL d'extrait hydroalcoolique de la plante camellia sinensis. L'extrait final a été considéré comme 1 : 1 (poids/volume) [35].

### 5. Dosage des composés phénoliques :

Dans le but de déterminer qualitativement et quantitativement la teneur en composés phénoliques (totaux, flavonoïdes et tanins) des différentes infusions de *Camellia sinensis*, ces protocoles ont été suivis.

## 5.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

#### • Principe

Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Il est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène La coloration produite, possède un maximum d'absorption qui est compris entre 725 et 750 nm et elle est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux [36].

#### • Mode opératoire

Le dosage des polyphénols a été réalisé selon le protocole décrit par (Ojeil, El Darra et al. (2010), 400 microlitres de l'extrait méthanolique dilué au 1/100ème a été mélangé avec 1.6 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 7.5 %,(3.75 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dans 50 ml d'eau distillée ) 2 ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué aux 1/10ème(1.5 ml dans 15 ml d'eau distillée ) fraîchement préparé ont été ajoutés puis homogénéisés a l'aide d'un vortex , le tout a été laissé incubé pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité ,L'absorbance a été mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre OPTIZEN 3220. Une courbe d'étalonnage a été obtenue à l'aide de solutions d'acide gallique de différentes concentrations. Toutes les opérations ont été réalisées en triplicata [36]

La formule suivante a été utilisée pour le calcul de la teneur en polyphénols totaux exprimée en microgrammes d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).

$$T = \frac{C \times V \times D}{Ps}$$

#### 5.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits a été déterminée en utilisant le trichlorure d'aluminium.

### • Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur un test colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium AlCl<sub>3</sub> et le nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>).

Il a été démontré que ce réactif forme des complexes acides stables soit avec le carbonyle (C=O) en position C-4, soit avec le groupe hydroxyle en C-3 ou C-5 des flavones et des flavonols.

Par ailleurs, le trichlorure d'aluminium peut également former des complexes acides labiles avec les groupements orthodihydroxyles éventuellement présents sur le noyau A et/ou B des flavonoïdes.

Ces complexes formés de coloration jaunâtres absorbent à 510 nm et la teneur des flavonoïdes totaux est obtenue par comparaison des absorbances par rapport à une solution d'un flavonoïde de concentration connue pris comme référence [37].

#### Mode opératoire

2 ml de l'extrait méthanolique dilué a été mélangé avec 6ml d'eau distillée, suivis de 600 μl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO2) à 7 % % (3.5 g dans 50 ml d'éthanol 60 % ). Après cinq minutes d'incubation, 600 μl de chlorure d'aluminium (AlCl3) à 10 % (2.5 g dans 25 ml d'éthanol) ont été ajoutés au mélange, le tout a été laissé pendant six minutes. Ensuite, 2 ml d'hydroxyde de sodium (1M) a été ajouté aux tubes. Après 5 minutes, l'ensemble a été agité à l'aide d'un Vortex, la lecture a été faite à 510 nm contre un blanc de méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre OPTIZEN. Toutes les opérations ont été réalisées en triplicata [37].

#### • Expression des résultats

La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire  $(y = a \ x + b)$  réalisée par un standard étalon "la catéchine" à différentes concentrations (0.01-0.07 mg/ml) traitées dans les mêmes conditions que l'échantillon.

La formule suivante a été utilisée pour le calcul de la teneur en flavonoïdes exprimée en microgrammes d'équivalent de catéchine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).

$$T = \frac{C \times V \times D}{Ps}$$

• T : Teneur en flavonoïdes.

• C : Concentration de l'extrait obtenue à partir de l'équation de la courbe

• V : Volume d'extrait total.

• **D** : Facteur de dilution

• **Ps** : Poids de la matière sèche.

## 5.3. Dosage des tanins condensés

La teneur en tanins condensés a été estimée en utilisant la méthode à la vanilline en milieu acide.

#### **Principe**

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré en vert mesuré à 500 nm. La réactivité de la vanilline avec les tanins n'implique que la première unité du polymère [38].

#### • Mode opératoire

Un volume de 100 µl de l'extrait brut a été ajouté à 3ml de la solution vanilline/méthanol (4 %, m/v) puis mélangé à l'aide d'un vortex. Ensuite, 1.5 ml de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) ont été additionnés et l'ensemble est laissé à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance a été mesurée à 500 nm contre un blanc de méthanol.

La formule suivante a été utilisée pour le calcul de la teneur en tanins condensés exprimée en microgrammes d'équivalent de catéchine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg).en se référant à la courbe d'étalonnage de la catéchine [38].

$$T = \frac{C \times V \times D}{Ps}$$

- T : Teneur en tanins condensés.
- C : Concentration de l'extrait obtenue à partir de l'équation de la courbe.
- V: Volume d'extrait total.
- **D** : Facteur de dilution.
- **Ps** : Poids de la matière sèche.

### 6. Activité antioxydante

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode au DPPH.

Un volume de  $100~\mu l$  de différentes concentrations de chaque extrait exprimées en g/l est ajouté à 3.9~ml de la solution méthanolique du DPPH\* (0.025~g/l) fraîchement préparée.

Matériels et Méthodes

Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 100 µl de méthanol avec 3.9

ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc

de méthanol pour chaque concentration, à 515 nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à

température ambiante.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'antioxydant standard ; l'acide

ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et

pour chaque concentration le test est répété 3 fois [39].

Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres de DPPH a été calculé d'après la formule

suivante:

% d'inhibition = [(abs du control – abs de l'échantillon) / abs du contrôle] x 100.

Les valeurs de l'EC50 (concentration nécessaire pour inhiber 50% des radicaux libres)

ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire.

7. Détermination du SPF in vitro

100 mg de l'extrait mou a été pesé, et transféré dans une fiole de 100ml puis complété

avec l'éthanol 60 V/V.

Les données d'absorption ont été obtenues dans la gamme de 290 nm à 320 nm, tous les

5 mn et 3 déterminations ont été faites à chaque point en utilisant l'éthanol comme un blanc.

[40]

Le SPF in vitro a été calculé par l'équation de Mansur :

 $SPF_{spectrophotometric} = CF \times \sum_{200}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$ 

CF: le facteur de correction

**EE**: effet érythémateux de la radiation de longueur d'onde  $\lambda$ 

 $I(\lambda)$ : spectre d'intensité solaire

**Abs** ( $\lambda$ ): absorbance de la solution.

19

#### 8. Etude de formulation

### 8.1. Choix de la forme galénique

De nombreuses preuves démontrent les altérations de la peau causées par le rayonnement solaire qui peuvent être modérées comme l'érythème ou une légère pigmentation, ou être chroniques et sévères tels que le carcinome épidermoïde, les mélanomes et d'autres pathologies . De ce fait, la photoprotection y compris l'application d'écrans solaires est très recommandée dans le monde entier.

Un écran solaire peut réduire les effets de l'exposition aux UV comme il peut prévenir les complications qui s'ensuivent d'une action directe ou en inhibant les métabolites qui en résultent.

Les crèmes hydrophiles font parties des formes topiques les plus acceptées par les patients en raison de leur tolérance, leur pouvoir pénétrant, leur facilité d'utilisation et leur lavabilité à l'eau contrairement aux pommades.

### 8.2. Choix de la concentration du principe actif

En tenant compte des études de la littérature, nous avons fixé la concentration de 2 % p/p. Il est légèrement soluble dans l'eau.

Notre actif est sensible à des températures supérieures à 60°C, non sensible à la lumière, l'oxydation et le pH.

Une étude menée par Dal Belo (2011) a révélé qu'après application topique d'un extrait de thé riche en catéchines et ses dérivés, il était significativement retenu dans la peau principalement dans la couche cornée même avec une faible concentration, ceci confirme le choix approprié de cette plante pour une formulation topique à base de son extrait [32].

## 8.3. Choix des excipients

- **Phase huileuse :** La phase huileuse est composée d'huile végétale et/ou huile minérale.
  - Huile d'olive
  - **Huile d'amande douce :** elle est émolliente, nourrissante et convient à tous les types de peaux.sa richesse en vitamine E va booster l'activité antioxydante d'une crème protective.

Elle est riche en acides gras : acide oléique, acide linoléique, acide palmitique .Elle contient des vitamines (A et E), des minéraux (phosphore, calcium, potassium) et des oligoéléments (magnésium, cuivre..) [41].

Sa valeur HLB trouvée dans la littérature autour est autour de 7 [42].

- Huile de paraffine: c'est une huile minérale, qui possède un très faible taux de pénétration dans la peau. Dans une préparation dermique, elle exerce une action hydratante. Dépourvu de toxicité ou irritation pour la peau, il reste en surface et forme une barrière protégeant l'épiderme.

Sa valeur HLB est autour de 10,5 [43].

- **Phase aqueuse :** notre phase aqueuse est composée d'eau distillée.
- Les émulsifiants: Les émulsifiants Span® 80 (Monooléate de sorbitane) et Tween® 80 (Polysorbate 80) ont été utilisés à raison de 5% p/p. Cette valeur a été fixée en se basant sur les études ultérieures de formulation des émulsions aqueuses.
  - Le Span® 80 (Monooléate de sorbitane) est un émulsifiant non-ionique de la famille des estes de sorbitane se présente sous la forme d'un liquide visqueux. Son HLB est 4,3 [44].
  - Le Tween® 80 (Polysorbate 80) est un émulsifiant non-ionique hydrophile riche en acides gras de la famille des polysorbates. Il se présente sous la forme d'un liquide huileux et il capable de modifier la viscosité d'une préparation. Son HLB est 15 [44].

#### > Viscosifiant

La gomme xanthane a été utilisée afin d'obtenir une préparation crémeuse et d'améliorer aussi adaptée à l'utilisation. C'est une gomme naturelle hydrosoluble largement utilisée dans les formulations en cosmétiques en tant que stabilisant et d'épaississant. Selon le *Handbook of pharmaceutical excipient*, le pourcentage de la gomme xanthane peut atteindre 3% pour une crème hydrophile [45].

#### > Humectant

Le glycérol a été utilisé comme humectant. Il s'agit c'est un agent hydratant qui forme un film occlusif sur l'épiderme. Ces propriétés tensioactives qui le permettent de maintenir cette hydratation. Il permet d'améliorer l'onctuosité et l'homogénéisation des préparations et il les préserve de dessèchement [46]

#### > Solubilisant

Afin de mieux solubiliser notre PA dans la phase aqueuse, le propylène glycol a été utilisé.

#### 8.4. Méthodes

La quantité du principe actif a été déterminée à partir des études précédentes, elle était de l'ordre de 2%.

Plusieurs formules ont été préparées en faisant varier :

- L'huile utilisée.
- Les pourcentages des tensioactifs.
- Le pourcentage de la gomme xanthane.

Toutes les préparations ont été réalisées selon la méthode d'inversion de phases :

- La phase aqueuse a été préparée en mélangeant le PA, le tween 80, glycérol, le propylène glycol et l'eau distillée.
- La phase huileuse a été préparée en mélangeant l'huile, le span 80 et la gomme xanthane.
- Les béchers des deux phases ont été chauffée à une température proche de 60 °C.
- Ensuite, l'émulsification a été réalisée en versant par petite quantité la phase aqueuse dans la phase huileuse sous agitation vigoureuse à 60 °C. L'agitation a été maintenue pendant 10 minutes puis l'émulsion a été refroidie pendant 5 minutes dans un bain de glace.

# 8.5. Formulation des crèmes à base d'huile olive

- L'huile d'olive a été utilisée comme seule huile.
- Son pourcentage a été fixe à 20% p/p de la préparation.
- La gomme xanthane a été utilisée à un pourcentage de 0,3%.
- Les quantités des deux tensioactifs ont été variées d'une façon à obtenir des HLBm 6, 7, 8 et 8,5.

Matériels et Méthodes

La masse des tensioactifs a été calculée pour la gamme de HLB indiqué en utilisant la formule de Griffin :

HLBm = [xHLBs + (100-x) HLBt]/100

Avec : x : pourcentage du span80

HLBs: HLB du spa80

HLBt: HLB du tween80

HLBm: HLB mélange

8.6. Formulation des crèmes à base d'huile amande douce

On suivant le même protocole opératoire, l'huile d'olive a été remplacée par l'huile d'amande douce à 20%. Puis dans les autres formulations, nous avons rajouté l'huile de

paraffine à 5% à 15% d'huile d'amande douce.

L'huile d'amande douce a remplacé l'huile d'olive dans les formulations. Les pourcentages varient entre 5 et 10%. Une faible quantité d'huile de paraffine a été rajoutée aux

formulations.

- La gomme xanthane a été utilisée au départ à 0.1% puis a été augmentée à 0.3%.

- Le propylène glycol a été utilisé pour solubiliser le PA dans la phase aqueuse à

un pourcentage de 5%.

- Le glycérol a été utilisé à 8%.

- Les HLBm ont été varié en augmentant de 6.5, 7, 8 et 8.5 leurs formules.

23

Tableau I: la composition des différentes formulations à base d'huile d'amande douce

Formule	Huile d'amande douce	Huile de paraffine	Gomme xanthane	HLBm
F2		5%	0.3%	8.5
F3	5%		0.1%	6.5
F4	5%		0.3%	7
F5	15%	5%	0.3%	7
F6	15%	5%	0.3%	8
F7	15%	5%	0.3%	8.5

Toutes les préparations ont été contrôlées macroscopiquement : une observation à l'œil nu des principaux caractères : la texture, la couleur et l'homogénéité.

# Pour la formule la plus stable nous avons déterminée :

#### - Le sens de l'émulsion

Le sens de l'émulsion a été déterminé par la méthode des colorants.

Une goutte de bleu de méthylène (colorant hydrophile) est mélangée avec une quantité de la crème pus nous avons examiné sa diffusion.

### - pH de la crème

Le pH de l'émulsion a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné.

# Résultats

## 9. Observation macroscopique

Les feuilles sont vert-grise, roulée, souvent repliée, tordue sur elle-même, entière ou incisée.

# 10. Observation microscopique

Les feuilles pulvérisées présentent les caractéristiques suivantes :

- -Un épiderme supérieur non stomatifère, formé de cellules polyédriques, souvent accompagnées de parenchyme palissadique.
- -Un épiderme inferieur composé de cellules polyédriques de stomates anomocytiques entoure de 3 à 4 cellules annexes et de poils tecteurs, unicellulaires flexueux, à parois épaisses et à extrémité conique.
- -Sclérites de grande taille, pouvant atteindre 150 µm dans leur plus grande dimension, ramifiées, à paroi fortement canaliculée, libres ou incluses dans du parenchyme lacuneux dont certaines cellules contiennent des macles d'oxalate de calcium.

Tous ces éléments sont représentés dans la figure (2).

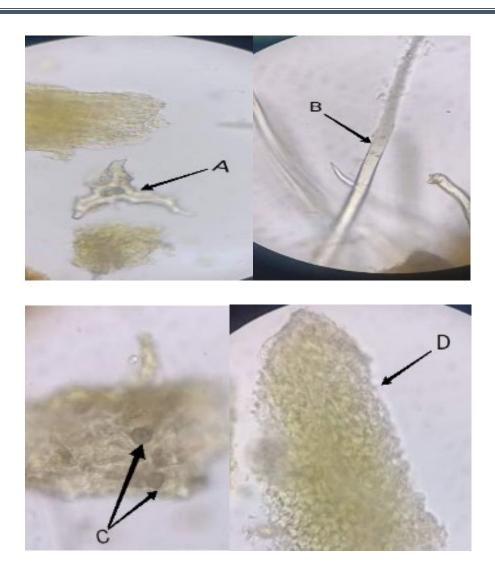


Figure 2 : Poudre de feuille thé vert observée au microscope optique (grossissement 10x40).

A : sclérite B : poil tecteur C : oxalate de Ca D : débris de parenchyme

E: stomate.

# 11. Chromatographie sur couche mince

La figure (3) représente le chromatogramme de l'extrait de feuille de thé observé sous UV à 365nm

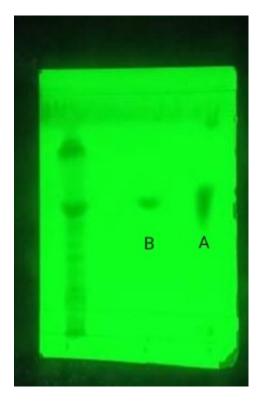


Figure 3: plaque CCM sous lampe UV.

Avec : B : la bande de caféine / A : la bande de théobromine

Le chromatogramme de l'extrait a révélé la présence d'une bande correspondante à celle de la caféine.

# 12. Teneur de l'extrait en polyphénols, flavonoïdes et tanins

Les courbes d'étalonnage obtenues avec l'acide gallique et la catéchine sont représentées dans les figures (4, 5, 6)

Les résultats des teneurs des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés sont résumés dans la **figure (7).** 

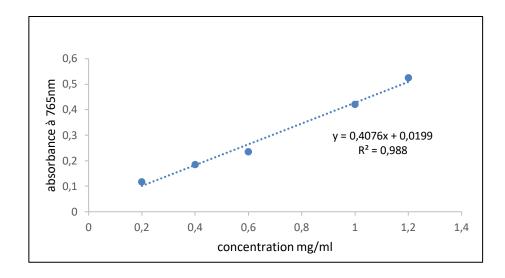


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

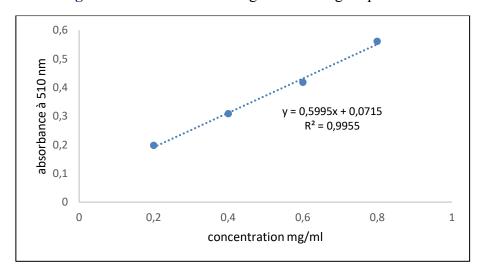


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de la catéchine (flavonoïdes)

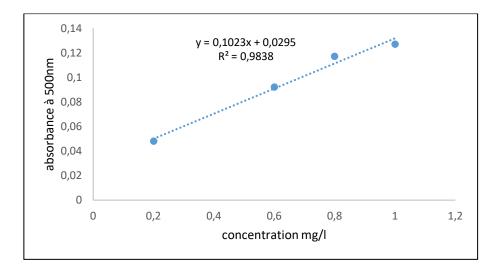
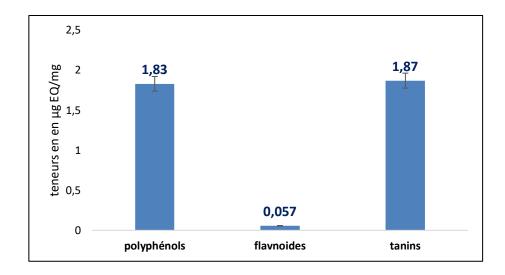


Figure 6 : Courbe d'étalonnage de la catéchine (tanins)

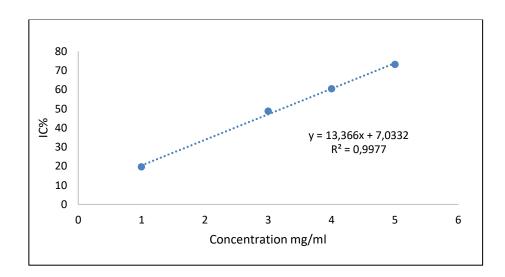


**Figure 7 :** Teneur de l'extrait de feuille de thé vert en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés

A partir de **la figure (7),** il est noté que la teneur en polyphénols totaux est de l'ordre de  $1.83 \mu g EQ/mg$ , celle des tanins est de l'ordre de  $1.87 \mu g EQ/mg$  et celle des flavonoïdes est de l'ordre de  $0.057 \mu g EQ/mg$ .

## 13. Activité antioxydante :

Les figures 8 et 9 représentent le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait de feuilles de thé et de l'acide ascorbique respectivement.



**Figure 8** : Courbe des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait de feuilles de thé

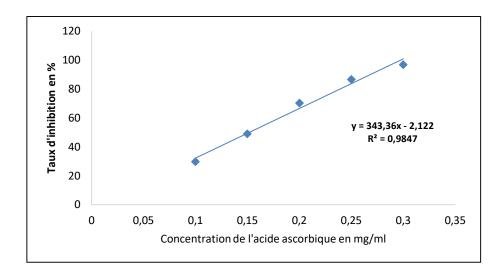


Figure 9 : Courbe des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration en acide ascorbique

#### 13.1. Détermination de la concentration inhibitrice IC 50%

Les valeurs de l'EC50 de l'extrait et de l'acide ascorbique ont été déterminées graphiquement à partir de l'équation de la courbe des **figures 8 et 9** 

Les résultats d'IC50 sont présentés dans la figure (10).

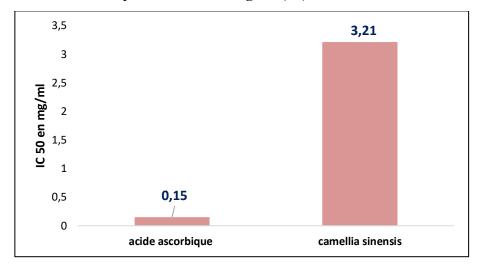


Figure 10 : valeurs d'IC50 pour Camellia sinensis et l'acide ascorbique

#### 14. Détermination du SPF in vitro

Le SPF in vitro a été calculé par l'équation de Mansur :

$$SPF_{spectrophotometric} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Le SPF obtenue avec l'extrait de feuilles de thé de concentration 1 mg/ml était de l'ordre de 30.

#### 15. La formulation

Le tableau II résume l'aspect et l'homogénéité des différentes formulations

Tableau II : aspect et l'homogénéité des différentes formulations

Formule	Aspect	Homogénéité
F1	Très fluide	Séparation immédiate des deux phases
F2	Fluide	Séparation significative et immédiate
F3	Crémeuse	Séparation significative et immédiate
F4	Crémeuse	Séparation après quelques heures
F5	Crémeuse	Séparation des deux phases après quelques heures
F6	Crémeuse	Séparation légère et tardive
F7	Crémeuse	Pas de séparation des phases

Toutes les préparations avaient une couleur teintée claire.

Tests de la formule F6 ont donné les résultats suivants :

- une propagation rapide du bleu de méthylène dans la crème contrairement au rouge du soudan ou y'a pas propagation comme le montre la figure (11).
- un pH de 5.34.
- aucune séparation des deux phases après centrifugation à 1000 et 2000 tr/mn par contre une très légère séparation après 4000 tr/mn comme le montre la figure (12).



Figure 11 : coloration au bleu de méthylène et rouge de soudan.



Figure 12 : observation de l'émulsion à l'œil nu après centrifugation.

# **Discussion**

## L'Analyse microscopique

L'observation microscopique des poudres végétales est une pratique indispensable dans le contrôle des drogues en pharmacognosie.

Les résultats de l'étude microscopique de la poudre de feuilles de thé s'accordent avec les normes de la pharmacopée française 11<sup>ème</sup> édition où elle mentionne la présence de poils tecteurs unicellulaires flexueux et des sclérites de grande taille La pharmacopée mentionne également des fragments de parenchyme renfermant des mâcles d'oxalate de calcium ce qui a été retrouvé dans nos résultats [34].

## L'Analyse chromatographique

Le résultat de la chromatographie sur couche mince de l'extrait de thé est identique à celui rapporté par la pharmacopée française 11<sup>ème</sup> édition, la bande de la caféine est très apparente comparé à celle de la théobromine en raison du taux élevé de la caféine dans le thé vert.

Ceci vient confirmer avec l'analyse microscopique la conformité de l'échantillon du thé utilisé dans cette étude avec les normes de la pharmacopée française 11<sup>ème</sup> édition [34].

## Teneur de l'extrait en polyphénols, flavonoïdes et tanins

Les études sur les effets antioxydants du thé vert s'avèrent très nombreuses, cette étude a été faite d'une part pour confirmer et consolider cette capacité antioxydante et d'autre part pour mettre à profit cette propriétés pour la formulation d'un écran total à base d'un extrait végétal dénué de toute toxicité.

Plusieurs études ont rapporté que les composés phénoliques sont les principaux paramètres de qualité du thé vert, principalement les polyphénols.

Kopjar et al (2015) ont mené une expérience comparative incluant plusieurs variétés de thé en utilisant la méthode décrite par l'organisation international de normalisation qui utilise le réactif de Folin-Ciocalteu, l'une des méthodes les plus anciennes permettant de déterminer la la teneur en polyphénols, ils ont rapporté que les feuilles du thé vert pulvérisée renfermaient environ 2  $\mu$ g/mg. Cette valeur est très proche de la valeur trouvée dans notre étude 1.83  $\mu$ g/mg.[47].

Unachukwu et al (2010) ont quantifié le contenu phénolique du thé vert, du thé noir et de la camomille en utilisant une méthode spectrophotométrique, le thé vert s'est avéré avoir le taux le plus élevé en polyphénols avec une valeur de 1.17 μg/mg [48].

L'étude d'Anesini et al (2008) en Argentine avait comme objectif la détermination du contenu phénolique au niveau des deux thés vert et noir, il ont confirmé que le thé vert est plus riche en polyphénols que le thé noir, en partant de ce résultat il ont pu constater que lors du processus de fabrication du thé noir précisément durant la fermentation, les polyphénols s'oxyde ce qui va conduire à un produit de moindre qualité [49].

Le test au chlorure d'aluminium décrit par **Jaiswal et al (2012)** a été toujours utilisé pour la quantification des flavonoïdes du thé. Jaiswal et al ont trouvé une quantité de  $0.36 \,\mu\text{g/mg}$  des flavonoïdes, une valeur nettement supérieure à celle retrouvée dans ce travail [50].

Le dosage des tanins a été réalisé par la méthode à la vanilline en milieu acide, la teneur a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage de la catéchine.

Nakamura et al (2003) en utilisant le même mode opératoire, ont obtenu une teneur de l'ordre de 0.69 μg/mg qui reste inférieure à celle retrouvée dans cette étude (1.87 μg/mg) [51]

Généralement, des concentrations plus élevées en catéchines ont été observées dans le thé vert contrairement au thé noir, ceci est expliqué essentiellement par le processus de fermentation [49].

Les valeurs retrouvées dans ce travail concordent avec certaines étude et diffèrent avec d'autres, il faut retenir que les teneurs en composés phénolique, en flavonoïdes et en tanins condensés varient en fonction de plusieurs facteurs, à savoir la distribution géographique, les méthodes de traitement, le mode de préparation, la structure des composés phénoliques, le mode d'extraction, la polarité du solvant, la température. [52]

#### Activité antioxydante

La capacité antioxydante de notre extrait a été déterminée en utilisant le test de capacité de piégeage des radicaux DPPH en prenant l'acide ascorbique comme un contrôle positif .notre extrait est doté d'un pouvoir antioxydant inférieur à celui de l'acide ascorbique, avec une valeur d'IC50 égale à 3.21 mg/l contre une IC50 =0.15mg/l pour l'acide ascorbique.

Ces résultats concordent avec les travaux de Chang et al (2020) qui ont obtenu un IC 50 de 3.6 mg/l partir de l'infusion de feuille du thé noir. [53]

Ramadan-Hassanien (2008) a fait une étude sur la capacité de piégeage des radicaux du DPPH de l'orange et de la pomme fraîchement pressées, la détermination des CI 50 par la méthode à la vanilline en milieu acide a permis de conclure que l'activité antioxydante du thé était largement supérieur à celle de l'orange et de la pomme. [54]

**Aganga et al (1999)** ont constaté que deux portions de 150 ml de thé noir avaient la même activité antioxydante que quatre pommes entières, de sept verres de jus d'orange, de vingt verres de jus de pomme ou d'un verre de vin rouge (150 ml). **[48].** 

Cette puissante activité antioxydante est due aux flavanols trouvés dans le thé noir qui sont des antioxydants plus puissants que ceux que l'on trouve dans les pommes et les oranges.

La capacité antioxydante de notre extrait vient donc appuyer ce qu'on a évoqué auparavant à propos du procédé et du résultat de dosage des polyphénols totaux, en se basant sur la corrélation entre les polyphénols et leurs effets antioxydants.

La teneur en polyphénols totaux et l'activité antioxydante sont deux paramètres indicateurs de qualité du thé en ce qui concerne ses propriétés biologiques, et les deux tests doivent être appliqués pour le contrôle de la qualité des thés fabriqués et importés.

Pastoriza et al (2011) a fait une analyse qui consiste à comparer l'activité antioxydante de *Camellia sinensis* par deux approches différentes : l'une avec le DPPH sur un extrait méthanolique , l'autre par application directe des radicaux libres sur des feuilles pulvérisées. Les résultats ont montré que l'activité antioxydante la plus grande est celle obtenue par application directe des radicaux libres, on peut donc considérer une éventuelle dégradation des composés phénoliques pendant l'extraction. [55]

#### Formulation de la crème

• Crèmes à base d'huile d'olive : malheureusement on n'a pas pu obtenir une émulsion stable avec l'huile d'olive.

Au début, l'utilisation de cette huile toute seule comme phase huileuse a entrainé une séparation immédiate visible à l'œil nu des deux phases malgré l'augmentation progressive de la gomme xanthane. L'huile d'olive est une huile végétale connue par ses difficultés d'émulsfication en émulsion.

• Crèmes à base de l'huile d'amande douce : les préparations à base de l'huile d'amande douce seule ont présenté une séparation des phases après quelques minutes de leur préparation ce qui nous a poussé à rajouter une huile minérale pour réussir notre émulsion. Nous avons fixé la quantité de l'huile de paraffine à 5%. Cette huile a été choisie suite à ces caractéristiques de viscosité qui favorise l'augmentation de la stabilité et en même temps augmentant la viscosité de la crème.

Pour les HLBm 6.5, 7 la séparation des phases persistent mais à des degrés différents. Or, pour l'émulsion HLBm 8 la séparation était tardive par rapport aux préparations HLB 6.5 et 7.

Pour la préparation HLBm 8.5 aucune séparation de phase n'a été produite. Cette crème a présenté une couleur teintée, une odeur, une viscosité adaptée à une application sur la peau.

Donc, on avait décidé de réaliser les tests de stabilité sur cette préparation.

- Le pH était de 5.34 et qui est conforme à une utilisation cutanée.
- Les tests aux colorants ont confirmé que notre crème est à base d'émulsion huile/eau.
- Les tests de stabilité à la centrifugation n'ont montré aucune séparation à vitesse de 1000 et 2000 tours par minute. Par contre, une séparation légère a été produite à 4000 tours par minute après 5 min.

Notre formule doit être encore optimisée avec les mêmes proportions en utilisant un agitateur à hélice plus puissant pour une meilleure division des particules.

# Conclusion

Il est très connu que le thé vert possède différents effets bénéfiques sur la santé, notre revue a réussi à étendre les connaissances actuelles en soulignant l'importance de l'exploitation de la plante.

La présente synthèse a permis de décrypter le potentiel antioxydant de la plante en évoquant l'action anti-radicalaire, et en soulignant sa teneur en composés bioactifs chargés de cette activité.

Les teneurs en métabolites actifs obtenues dans ce projet ont renforcé notre objectif de formuler une crème avec une action photo-protectrice, en s'appuyant également sur les études cliniques qui ont mis le point sur l'innocuité du thé sur le métabolisme de la peau, et en montrant qu'il présente aucun effet allergène ou irritant après usage topique. Tout cela a favorisé l'inclusion des substances contenues dans l'extrait du thé vert lors de la formulation d'un dermo-cosmétique.

La stabilité de l'émulsion au moment de la formulation a montré que l'extrait de feuilles de thé n'a pas compromis l'intégrité de cette dernière.

Tous ces résultats doivent pousser les chercheurs à se concentrer sur l'application cutanée du thé, chose qui reste encore limité et épisodique, et de fait à compléter ce travail et fournir à cette plante une place dans l'usage cosmétique.

Il est certain que cette plante encore insuffisamment étudiée du point de vue de ses applications cosmétiques attirera dans un avenir proche l'attention des chercheurs travaillant dans ce secteur.

Références Bibliographiques

- 1. Prasanth, M.I., et al., *A review of the role of green tea (Camellia sinensis) in antiphotoaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy.* 2019. **11**(2): p. 474.
- 2. Zink, Alexander, and Claudia Traidl-Hoffmann. "*Green tea in dermatology–myths and facts*." JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 13.8 (2015): 768-775.
- 3. Becker, L.C., et al., Safety Assessment of Camellia sinensis–Derived Ingredients As Used in Cosmetics. 2019. **38**(3 suppl): p. 48S-70S.
- 4. Pastoriza, S., et al., *Healthy properties of green and white teas: an update.* Food Funct, 2017. **8**(8): p. 2650-2662.
- 5. Site internet : https://www.telabotanica.org/eflore/?referentiel=bdtfx&module=fiche&action=fiche&num\_nom= 12386&onglet=synthese.Consulté le 15 février 2021.
- 6. Ross, I.A., *Medicinal plants of the world, volume 3: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses.* Vol. 3. 2007: Springer Science & Business Media.
- 7. Wichtl, M., et al., *Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* 1999: Tec & Doc; Ed. médicales internationales.
- 8. Boizeau, C.J.B., *Microstocks, bases d'images et sites de partage de photos sur Internet.* 2012(299): p. 1.
- 9. Kim, Y., et al., Changes in antioxidant phytochemicals and volatile composition of Camellia sinensis by oxidation during tea fermentation. 2011. **129**(4): p. 1331-1342.
- 10. Chu, D.J.C. and a.o.g. tea, *Green tea-its cultivation, processing of the leaves for drinking materials, and kinds of green tea.* 1997: p. 1-11.
- 11. McKenna, D.J., et al., *Botanical medicines: the desk reference for major herbal supplements*. 2012: Routledge.
- 12. Arct, J. and K.J.C.i.d. Pytkowska, *Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals*. 2008. **26**(4): p. 347-357.
- 13. da Silva Pinto, M.J.F.r.i., *Tea: A new perspective on health benefits.* 2013. **53**(2): p. 558-567.
- Yao, L., N.J.B. Caffin, JIANG, Y., SHI, J., SINGANUSONG, R., Liu, X., DATTA, N., KAKUDA, Y., and Y.S.v.o.p.c.i.A.-g.t. Xu, J. Agric. Food Chem, *D' Arcy*. 2005. 53: p. 6477-6483.
- 15. Chacko, S.M., et al., Beneficial effects of green tea: a literature review. 2010. **5**(1): p. 1-9.
- 16. Nanjo, F., et al., Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. 1996. **21**(6): p. 895-902.

- 17. Pecorari, M., et al., *Biomarkers of antioxidant status following ingestion of green teas at different polyphenol concentrations and antioxidant capacity in human volunteers*. 2010. **54**(S2): p. S278-S283.
- 18. Unachukwu, U.J., et al., *White and green teas (Camellia sinensis var. sinensis): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles.* 2010. **75**(6): p. C541-C548.
- 19. Jamieson, M. and H. McKinley, *Handbook of Green Tea and Health Research*. 2009: Nova Science Publishers.
- 20. Unno, K., et al., Anti-stress effects of drinking green tea with lowered caffeine and enriched theanine, epigallocatechin and arginine on psychosocial stress induced adrenal hypertrophy in mice. 2016. 23(12): p. 1365-1374.
- 21. Liu, S., et al., PI3K/AKT/mTOR signaling is involved in (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. 2013. **41**(03): p. 629-642.
- 22. Al-Hazzani, A.A., A.A.J.F. Alshatwi, and c. toxicology, *Catechin hydrate inhibits proliferation* and mediates apoptosis of SiHa human cervical cancer cells. 2011. **49**(12): p. 3281-3286.
- 23. Babich, H., H. Zuckerbraun, and S.J.T.l. Weinerman, *In vitro cytotoxicity of (–)-catechin gallate, a minor polyphenol in green tea.* 2007. **171**(3): p. 171-180.
- 24. Yarmolinsky, J., G. Gon, and P.J.N.r. Edwards, *Effect of tea on blood pressure for secondary prevention of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.* 2015. **73**(4): p. 236-246.
- 25. Kim, A., et al., *Green tea catechins decrease total and low-density lipoprotein cholesterol: a systematic review and meta-analysis.* 2011. **111**(11): p. 1720-1729.
- 26. Wolfram, S.J.J.o.t.A.C.o.N., *Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health.* 2007. **26**(4): p. 373S-388S.
- 27. Zakir, M., et al., *Antimicrobial activity of different tea varieties available in Pakistan*. Pak J Pharm Sci, 2015. **28**(6): p. 2091-4.
- 28. Harwansh, R.K., et al., *Enhancement of photoprotection potential of catechin loaded nanoemulsion gel against UVA induced oxidative stress.* 2016. **160**: p. 318-329.
- 29. Hong, Y.-H., et al., *Physiological effects of formulation containing tannase-converted green tea extract on skin care: physical stability, collagenase, elastase, and tyrosinase activities.* 2014. **3**(1): p. 25-33.
- 30. Saric, S., M. Notay, and R.K.J.A. Sivamani, *Green tea and other tea polyphenols: Effects on sebum production and acne vulgaris.* 2017. **6**(1): p. 2.

- 31. Byun, S.-Y., et al., *Efficacy of slimming cream containing 3.5% water-soluble caffeine and xanthenes for the treatment of cellulite: Clinical study and literature review.* 2015. **27**(3): p. 243-249.
- 32. Koch, W., et al., *Applications of Tea (Camellia sinensis) and its Active Constituents in Cosmetics.*Molecules, 2019. **24**(23).
- 33. Sun, J., et al., Characterization of destrins with different dextrose equivalents. 2010. **15**(8): p. 5162-5173.
- 34. pharmacopée française 11ème édition. 2010.
- 35. Oliveira-Júnior, R.G.d., et al., *Development and evaluation of photoprotective O/W emulsions containing hydroalcoholic extract of Neoglaziovia variegata (Bromeliaceae)*. 2017. **2017**.
- 36. Ojeil, A., et al., *Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin château KSARA*. 2010. **11**(2): p. 117-131.
- 37. GÜLER, A. and A.J.T.T.v.D.B.D. CANDEMİR, *Total phenolic and flavonoid contents, phenolic compositions and color properties of fresh grape leaves.* 2014. 1(Özel Sayı-1): p. 778-782.
- 38. Julkunen-Tiitto, R.J.J.o.a. and f. chemistry, *Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics.* 1985. **33**(2): p. 213-217.
- 39. Sánchez-Moreno, C.J.F.s. and t. international, *Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems*. 2002. **8**(3): p. 121-137.
- 40. Smaoui, S., et al., *Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters.* 2017. **10**: p. S1216-S1222.
- 41. Ahmad, Z.J.C.t.i.c.p., *The uses and properties of almond oil.* 2010. **16**(1): p. 10-12.
- 42. Hajhashemi, M., et al., *The effect of Aloe vera gel and sweet almond oil on striae gravidarum in nulliparous women.* 2018. **31**(13): p. 1703-1708.
- 43. Petry, T., et al., *Review of data on the dermal penetration of mineral oils and waxes used in cosmetic applications.* 2017. **280**: p. 70-78.
- 44. Juárez-Osornio, C. and J.J.J.o.l.r. Gracia-Fadrique, *Structures similar to lipid emulsions and liposomes. Dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80 in aqueous media.* 2017. **27**(2): p. 139-150.
- 45. Hara, S., et al., *Xanthan gum and locust bean gum substrate improves bovine embryo development.* 2020. **55**(9): p. 1124-1131.
- 46. Becker, L.C., et al., *Safety assessment of glycerin as used in cosmetics*. 2019. **38**(3\_suppl): p. 6S-22S.
- 47. Kopjar, M., et al., *Phenol content and antioxidant activity of green, yellow and black tea leaves.* 2015. **2**(1): p. 1-6.

- 48. Shannon, E., A.K. Jaiswal, and N.J.F.R. Abu-Ghannam, *Polyphenolic content and antioxidant capacity of white, green, black, and herbal teas: a kinetic study.* 2018. **2**(1): p. 1-11.
- 49. Anesini, C., et al., *Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (Camellia sinensis) in Argentina*. 2008. **56**(19): p. 9225-9229.
- 50. Jaiswal, A.K., S. Gupta, and N.J.F.C. Abu-Ghannam, *Kinetic evaluation of colour, texture, polyphenols and antioxidant capacity of Irish York cabbage after blanching treatment.* 2012. **131**(1): p. 63-72.
- 51. Nakamura, Y., S. Tsuji, and Y.J.J.o.h.s. Tonogai, *Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils.* 2003. **49**(1): p. 45-54.
- 52. Tadesse, A., et al., Quantification of total polyphenols, catechin, caffeine, L-theanine, determination of antioxidant activity and effect on antileishmanial drugs of ethiopian tea leaves extracts. 2015. 7(Suppl 1): p. S7.
- 53. Chang, M.-Y., et al., Effects of infusion and storage on antioxidant activity and total phenolic content of black tea. 2020. **10**(8): p. 2685.
- 54. Ramadan-Hassanien, M.F.J.G.y.a., *Total antioxidant potential of juices, beverages and hot drinks consumed in Egypt screened by DPPH in vitro assay.* 2008. **59**(3): p. 254-259.
- 55. Pastoriza, S., et al., *A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method.* 2011. **129**(4): p. 1926-1932.

#### Résumé

Les émulsions topiques sont largement utilisées en dermo-cosmétologie. Pour différents types d'affections dermatologiques, plusieurs formulations topiques comme la crème solaire et les crèmes antirides sont préparées à base d'extraits végétaux.

L'objectif principal de cette étude était de formuler un écran total de type émulsion en y intégrant l'extrait de feuille de thé comme principe actif.

Ces résultats démontrent le potentiel des extraits de cette plante à être utilisés comme composants actifs de nouveaux écrans solaires naturels par ses teneurs en polyphénols antioxydants.

L'émulsion préparée à base d'extrait de feuilles de thé s'est révélée être stable et a donné des résultats satisfaisants concernant les tests de stabilité réalisé à la préparation.

Mots clés: Camellia sinensis, crème solaire, polyphénol, tanin, flavonoïde.

#### **Abstract**

Topical emulsions are widely used in dermo-cosmetology. For different types of dermatological affections, several topical formulations such as sunscreen and anti-wrinkle creams are prepared based on plant extracts.

The main objective of this study was to formulate an emulsion-type sunscreen by incorporating tea leaves extract as an active ingredient.

The obtained results showed the potential tea leaves extract and the possibility to be used as active components in new natural sunscreens by its antioxidant polyphenol content.

The tea leaves extract based emulsion proved stable and gave satisfactory results regarding the stability tests carried out at the preparation.

**Key words:** Camellia sinensis, suncreen, polyphenol, tannin, flavonoid.

#### الملخص

تستخدم المستحلبات الموضعية على نطاق واسع في مستحضرات التجميل الجلدية. لعلاج أنواع مختلفة من الأمراض الجلدية. يتم تصنيع العديد من التركيبات الموضعية مثل الكريمات الواقية من الشمس والكريمات المضادة للتجاعيد من المستخلصات النباتية.

كان الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو صياغة كريمة واقية من الشمس من نوع المستحلب تتضمن مستخلص أوراق الشاي كعنصر نشط.

توضح النتائج إمكانية استخدام مستخلصات هذه النبتة كمكونات نشطة لصياغة كريمة واقية من الشمس من خلال احتوائها على مادة البوليفينول المضادة للأكسدة.

ثبت أن المستحلب المحضر على أساس مستخلص أوراق الشاي مستقر وأعطى نتائج مرضية في اختبارات الثبات التي أجريت أثناء التحضير

الكلمات المفتاحية: كاميليا سينينسيس ، واقى من الشمس ، بوليفينول ، تانين ، فلافونويد.