



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ IBN-KHALDOUN - TIARET-
ANNEXE SOUGUEUR

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Pour l'obtention du diplôme de Master

Filière : CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique

Par :

BEKKI Khaled & BENCHOHRA Mohamed

THÈME

**Étude de la libération d'un principe actif à travers une
microsphère du poly (-3-hydrox butyrate-co- 3-hydroxy
valérate)**

Soutenue publiquement le :

08/ 07 /2019 devant le Jury composé de:

Mme BENHAOUA. C.	M. C .B	Université de Tiaret	Présidente
Mme MAIZI.Y.	M. A. A	Université de Tiaret	Examinatrice
Mr OTMANI .A	M. A .B	Université de Tiaret	Examinateur
Mme BALEH.H.	M. A. A	Université de Tiaret	Encadreur

PROMOTION 2018 /2019

Remerciements

Nous remercions tout d'abord, « Allah » le tout puissant, qui nous a donné la force, le courage, la volonté et la patience afin de réaliser ce modeste travail.

*En second lieu, nous remercions chaleureusement notre promoteur **Mme BALEH Hinane** de nous avoir donné la possibilité de réaliser ce travail sous sa suivie et pour le temps qu'elle nous a consacré, sa patience, ses précieux conseils, son soutien tout au long de la réalisation de notre mémoire ainsi que pour sa gentillesse, sa bienveillance et ses qualités profondément humaines qui ont été remarquables.*

*Nos sincères remerciements vont à notre présidente de jury, **Mme BENHOUA** de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre soutenance.*

*Un grand merci aux examinateurs de ce mémoire **Mme Y.MAIZI** et **Mr ATHMANI**. A pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.*

*Nos vifs remerciements à l'ensemble du personnel de laboratoire de Chimie à l'université d'Ibn Khaldoun à Tiaret, plus particulièrement à **Melle Touati.M** au laboratoire de Tissemsilt et à **Mme Dalila** chef service à la polyclinique Hireche Mamer et à **Melle Makroussi .D** au département de science de matériaux*

Pour leur disponibilité et leur soutien durant toute la période de notre expérimentation.

Nous profitons de l'occasion pour remercier tous ceux qui nous ont aidés dans l'anonymat.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes chers parents qui m'ont encouragé,
soutenu et consolé tout au long de mon cursus.*

Mes chers frères et sœurs surtout l'adorable Sadou.

Mon binôme Khaled

*Ainsi qu'à tous les étudiants de la promotion
Master de chimie*

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Mes chers parents qui m'ont encouragé,
soutenu et consolé tout au long de mon cursus.*

Mes chers frères et sœurs.

Ma conjointe et mon fils.

Mon binôme Mohamed

*Ainsi qu'à tous les étudiants de la promotion
Master de chimie*

SOMMAIRE

INTRODUCTION	01
CHAPITRE I : HUILE ESSENTIELLE	
I.1. Définition d'une huile essentielle.....	03
I.2. Généralités sur les huiles essentielles.....	03
I.3. Utilisations des huiles essentielles.....	04
I.4 Les techniques d'extraction des huiles essentielles	04
I.5. Les principales méthodes d'extraction	05
I.5.1. Entraînement à la vapeur d'eau	06
I.5.2. Hydro distillation.....	06
I.5.2- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :	06
I.5.3- Hydrodiffusion.....	07
I.5.4.Expression à froid	07
I.5.5 L'extraction parsolvants.....	08
I.5.6. L'extraction assistée par chauffage micro-ondes.....	08
I.5.7. Rendement.....	09
I.6. Composition chimique des huiles essentielles.....	09
I.6.1 . Les composés terpéniques.....	09
I.6.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane	10
I.7. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles	10
I.8. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles	10
I.8.1.Chromatographie sur couche mince (CCM)	11
I.8.2.Chromatographie en phase gazeuse (CPG)	11
I.8.3.Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse(GPC/SM)....	11
I.8.4. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	12
I.8.5 .La Résonance Magnétique Nucléaire RMN.....	12

I.8.6 Indices physiques	13
-------------------------------	----

CHAPITRE II : PRINCIPE ACTIF

II.1.Introduction	14
II.2. Dénomination botanique	15
II.2.1 Description de l'arbre	16
II.2. 2.La culture du giroflier	16
II.3. Les étapes de production	16
II.3.1. Dégriffage	16
II.3.2. Le séchage	17
II.3.3. Le vannage	17
II.3.4. Conclusion	17
II.4. Les huiles essentielles du giroflier	18
II.5. Eugénol.....	19
II.5. 1. Propriétés physico-chimiques	20
II.5 2 Pharmacologie de l'eugénol	20
II.5 2.1 Activité antioxydant.....	20
II.5.2.2. Activité antimicrobienne	21
II.5.2.3. Activité anti inflammatoire	21
II..5.3. Toxicité	21

CHAPITRE III : GENERALITES SUR LA MICROENCAPSULATION

III.1. Généralité sur les micro encapsulation	23
III.1.1 Définition	23
III.2.Classification des microparticules.....	23
III.2.1 .la microcapsule, particule sphérique.....	23
III.2.2 la microsphère(matriciel)	23
III .3. Intérêts de la micro encapsulation	24
III .4 .les déférents procèdes des micro encapsulation.....	25
III .4.1. Procédés d'encapsulation chimique	25

III .4.2. Procèdes d'encapsulation physico-chimiques	25
III .4.3 . Procèdes d'encapsulation mécanique	25
III .5. Concepts généraux sur les émulsions.....	26
III .5.1. Emulsions simple (E/H Ou H/E)	27
III .5.2. Emulsion double (E/H/E)	27
III .6. Les polymères utilisés dans l'encapsulation	27
III .6.1..les catégories des polymères utilisés dans l'encapsulation.....	28
III .6.2 .le poly (3-hydrox butyrate-co-3-hydroxyvalérate) ou PHBV	28
III .6.2.1 . Les propriétés du PHBV.....	28
III .7. La libération pour des microsphères polymériques	29
III. 8. .application	30.
III .9. Conclusion	31

CHAPITRE IV: PARTIE EXPERIMENTALE

IV. 1. .Buts ET objectifs.....	33
IV.2. Matériel.....	33
IV .2.1 .Matériel végétal et huiles essentielles	33
IV .2.2 .Solvants et réactifs	33
IV .2.3. Verreries	35
IV .2.4 .Appareils	36
IV .2.5. Matériel bactérien	36
IV .3. Méthodes	37
IV .4. Obtention DE l'huile essentielle	38
IV .5. Extraction de l'eugénol	38
IV .6 . Extraction du PA	40
IV .7. Techniques physicochimiques de caractérisation des échantillons	40
IV .7. 1. Réfractométrie	40
IV .7. 1. 1. Méthode de mesure l'indice de réfraction.....	40
IV .7. 2. la densité	41
IV .7. 3. Chromatographie sur couche mince (CCM)	41
IV .7. 4 .Caractérisation par IRTF	42
IV .8. La micro encapsulation	43
IV .8.1. méthodes de caractérisation	45

IV .9.Activité antibactérienne.....	47
IV .9.1.Préparation de l'inoculum.....	48
IV .9.2.Ensemencement et application des disques.....	48
IV .9.3.Lecture des résultats	49

CHAPITRE V: RESULTATS Et DISCUSSION

V. Résultats Et Discussion.....	51
V .1. Extractions de l'HE.....	52
V .2. Extractions de l'eugénol.....	52
V.3 .Microencapsulation	55
V.4 . Activité antibiotique	57
Conclusion générale.....	59
Références.....	60
Annexe	

liste des figures

N° de la figure	Légende	Page
1.1	Montage d'extraction par Hydro distillation	06
1.2	Montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau	06
1.3	Montage d'extraction par Hydro diffusion	07
1.4	Schéma de différents méthodes d'expression à froid	07
1.5	Les différents types d'extraction par solvants volatils	08
1.6	L'extraction par solvant assistée par micro-ondes.	08
1.7	Chromatographie sur couche mince	11
2.1	Allure d'un giroflier de Madagascar	15
2.2	dégriffage des clous après la récolte	16
2.3	Séchage des clous sur des nattes à Madagascar.	17
2.4	CPV de fraction hydrocarbures obtenue à partir de l'échantillon de Madagascar.	18
2.5	des principaux constituants isoler a partir de HE de clou de girofle.	18
2.6	Formule semi-développée de l'eugénol	19
3.1	Représentation schématique des 2 types de microparticule	23
3.2	Différent type d'émulsion	27
3.3	Structure de PHBV	28
3.4	Les types de libération	29
4.1	Escherichia coli	36
4.2	Staphylococcus	36
4.3	Hydrodistillation simple d'HE	38
4.4	Décantation	38
4.5	Filtration de solution après le séchage	39

4.6	Elimination de dichlorométhane par évaporation	39
4.7	Réfractomètre	41
4.8	Agitateur magnétique avec chauffage	43
4.9	agitation mécanique du mélange	44
4.10	Filtration sous vide	44
4.11	les concentration préparer pour l'étalonnage	46
4.12	Courbe d'étalonnage de l'eugéno1 à pH=1,2 et T 37°C.	47
4.13	Principe de la méthode de diffusion par disque.	47
4.14	Référencer les disques sur les boites patries	48
4.15	L'incubation des boites dans un étuve de marque Memmert UE 202	49
5.1	L'évaluation de volume D'HE en fonction de temps	51
5.2	réaction de l'eugéno1 avec NaCl et HCl	52
5.3	Chromatographie sur couche mince	54
5.4	Spectre infra rouge d'eugéno1	54
5.6	Observation des microsphères par microscope optique	55
5.7	Spectre infra rouge d'eugéno1 capsulé	55
5.8	Diamètre d'inhibition obtenu pour l'Escherichia coli et staphylocoque	57

liste des tableaux

N° de tableau	Titre	Page
1.1	Paramètres mise en œuvre dans les opérations d'extraction	5
1.2	Rendements de la distillation de quelques drogues courantes	9
2.1	Classement des principaux pays producteurs en 2012 de girofles	14
2.2	Calendrier de récolte de clou de girofle en fonction de pays (7) .les zones vertes correspondent à la période de récolte	16
2.3	Pourcentages relatifs des principaux constituants volatils isolés à partir d'HE de clou de girofle de différentes provenances	18
2.4	Les caractères d'HE dans les parties de la plante	19
2.5	Pourcentages de l'eugénol dans l'huile essentielle de différentes plantes	20
3.1	Motivation spécifiques à encapsule principe actifs(PA)	24
3.2	Classification des techniques d'encapsulation	26
3.3	Propriété physique-chimique de PHBV	29
3.4	Divers exemples d'applications industrielles de l'encapsulation	30
5.1	L'évaluation de volume d'HE en fonction de temps	51
5.2	Bandes caractéristiques correspondant d'eugénol	54
5.3	Bandes caractéristiques correspondant d'eugénol capsulé	56
5.4	Diamètre (cm) d'inhibition obtenu pour l'escherichia coli staphylocoque après 24h	57
5.5	Diamètre (cm) d'inhibition obtenu pour L'Escherichia coli et staphylocoque après 48 h	57

INTRODUCTION :

Les huiles essentielles sont classées selon la nature chimique de leurs principes actifs majeurs. Elles ont fait la preuve de nombreuses propriétés thérapeutiques : anti-infectieuses, antispasmodiques, relaxantes, antalgiques, anti-inflammatoires, fluidifiantes, expectorantes, cicatrisantes... ses propriétés montrent leur importance mondiale.

De nos jours, les huiles essentielles ont leur place parmi les différentes composantes thérapeutiques à disposition, à côté de la phytothérapie.

Mais le faible rendement de production reste toujours un obstacle scientifique et économique. Certaines huiles essentielles sont coûteuses et leur marché reste très cher. C'est pourquoi les recherches scientifiques focalisent leurs efforts pour trouver de nouvelles techniques d'extraction et d'amélioration des effets thérapeutiques des huiles essentielles et leurs principes actifs.

L'encapsulation présente une meilleure voie pour envelopper une substance chimique et protéger ses fonctions réactives. Les fabricants favorisent les microsphères pour enrober les composés de faible concentration.

L'étude concernée par nos travaux consiste à réaliser une micro encapsulation d'un principe actif à travers des microsphères en PHBV pour étudier leurs propriétés thérapeutiques après la libération. Cette étude est comparative entre l'activité anti bactérienne du principe actif avec et sans encapsulation .

Dans cet objectif nous choisirons le clou de girofle comme une source végétale de notre principe actif qui porte le nom d'Eugénol. Après avoir vu les caractéristiques botaniques du girofle, sa culture et sa récolte, nous aborderons la composition chimique de l'huile essentielle et ses propriétés pharmacologiques. Ainsi les propriétés de son principe actif.

Dans la partie expérimentale nous réalisons une extraction basée sur le principe de l'hydro distillation, pour l'huile essentielle à partir des clous de la plante et une extraction liquide - liquide pour l'isolement de l'eugénol.

Ensuite, nous appliquons une émulsification H/E pour enrober l'eugénol dans des microsphères du PHBV à l'aide d'un agitateur mécanique.

Enfin, nous étudions les activités antimicrobiennes de l'eugénol encapsulé sur des souches bactériennes (*Escherichia coli* – *Staphylococcus aureus*) et nous comparons les résultats obtenus par les activités de l'eugénol non encapsulé et son huile essentielle sur les mêmes souches .



Chapitre I
Huile Essentielle

I.1. Définition d'une huile essentielle

Il n'existe pas de définition réglementaire à portée générale de l'huile essentielle. La pharmacopée européenne définit l'huile essentielle comme : « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage »[1].

Les huiles essentielles ont une composition complexe et contiennent des molécules actives. Ses composants majoritaires et minoritaires caractérisent la qualité de l'huile essentielle, et indirectement son action et sa sécurité d'utilisation. Ce sont des mélanges de produits organiques volatils entraînés par la vapeur d'eau appartenant aux diverses séries

- Aliphatiques
- Aromatiques
- Terpéniques

Une huile essentielle est chimiquement bien déterminée. Son utilisation en thérapeutique est très réglementée car c'est un mélange de composés purs très actifs et toxiques.

Nous allons d'abord nous intéresser à ce qu'est une huile essentielle? Comment l'obtient-on? Comment la caractériser? Puis, nous étudierons plus particulièrement la composition chimique de l'huile essentielle de clou de girofle et son activité antimicrobienne.

I.2. Généralités Sur Les Huiles Essentielles

Les huiles essentielles sont d'origine naturelle. Les molécules récupérées après extraction sont dites actives.

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe (structures organiques variées) et soumises à beaucoup de variétés. Ses composants permettent d'en vérifier la qualité, d'en connaître ses propriétés et de prévoir sa toxicité.[2]

Une huile essentielle ne contient pas de corps gras à la différence des huiles végétales.

Le rôle des huiles essentielles pour la plante est encore mal connu. Cependant, nous savons qu'elles attirent les animaux servant à la pollinisation et à la dispersion des graines. Les huiles essentielles ont aussi un effet répulsif contre les herbivores, un effet allélopathique (inhibition de la croissance d'autres organismes) et elles servent aussi de moyen de défense contre les organismes phytopathogènes provoquant des maladies aux plantes.

La teneur en huile essentielle d'un végétal est de l'ordre de 1% mais l'exception se fait par le clou de girofle: 15-20% et la badiane de Chine: 5%.[3]

I.3. Utilisations des huiles essentielles

Les huiles essentielles constituent une matière première destinée à divers secteurs d'activités. Leur popularité s'est accrue d'une façon considérable ces dernières années. En effet, la demande industrielle de ces composés à forte valeur ajoutée est bien réelle, et ce grâce à la multiplicité de leurs usages dans de nombreux secteurs industriels et l'engouement des consommateurs pour ces produits.[4]

- L'industrie des cosmétiques, savonneries et parfums représente 60 % de la demande totale en substances naturelles, selon le Corporation National de recherche et Développement (NRDC) [5].
- L'industrie alimentaire pour rehausser le goût des aliments, et la conservation grâce aux effets antimicrobiens et antioxydants de certains de leurs constituants.
- L'intérêt accru de la population pour les produits de santé naturels a contribué au développement de l'industrie des huiles essentielles. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 80 % de la population mondiale a recours aux médecines traditionnelles pour satisfaire des besoins en soins de santé primaire. Le marché mondial des médicaments traditionnels à base de plantes est estimé à 60 000 millions de dollars.[14]
- Les huiles essentielles représentent un outil thérapeutique très efficace qui permet d'élargir le champ des traitements médicaux conventionnels [15].
- Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires [16] .
- Les huiles essentielles présentent également, des propriétés cytotoxiques. Elles sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. [17-18]
- Les huiles essentielles sont considérées comme agents antimicrobiens au large spectre. L'usage excessif des médicaments de synthèse et la résistance des bactéries aux antibiotiques ont conduit à reconsidérer favorablement l'utilisation des huiles essentielles en pratiques médicinales.[19-20]

I.4. Les techniques d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des huiles essentielles, cette diversité est due à la variété des matières et à la sensibilité considérable de leurs certains constituants.

Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire et de l'usage de l'extrait. Les principaux paramètres à prendre en compte dans les opérations fondamentales d'extraction de matières premières naturelles aromatiques sont :

- La volatilité
 - La solubilité
 - L’adsorption.
- La taille et la forme des molécules constitutives

Le Tableau 1 résume les techniques les plus couramment utilisées et quelques types de produits fabriqués.

Tableau 1.1 : Paramètres mis en œuvre dans les opérations d’extraction.

Technique	Propriétés	Produit fabriqués
Evaporation Déshydratation – séchage Concentration de miscella (s/pres.atm.ou réduite) Concentration de jus fruits	Volatilité	Rétinoïdes, concrètes Oléorésines
Distillation Rectification (s/pres.atm.ou réduite) Distillation sèche		Isolante : déterpènes huile empyreumatique
Co-distillation Avec eau (s/pres.atm.ou réduite) Hydro distillation et à vapeur humide Vapeur sèche Avec un autre fluide (s/pres.atm.ou réduite) Alcool Polyols		Huile essentielle eaux aromatisées Alcoolats Distillats moléculaire
Extraction liquide/ solide Solvant conservé : corps gras Alcool Solvant éliminé : Fluide liquide Fluide liquéfié (ou supercritique)	Solubilité	Pommade Infusion – Teinture } Concrète – rétinolide
Extraction liquide/ liquide Discontinue Continue		Essences déterpénées
Cristallisation après concentration partielle et refroidissement		Menthol – Anéthol
Broyage – tamisage	Forme et taille des particules	Huiles essentielle D’agrumes
Expression - Filtration		
Glaçage – Filtration		
Séparation au moyen de membranes		
Séparation chromatographique Décoloration	Adsorption	Huiles essentielle Absolues

I.5. Les principales méthodes d'extraction

I.5.1- Extraction par Hydrodistillation :

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce faite-là plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'huile essentielle étant plus légère que l'eau (sauf quelques rares exceptions), elle surnage au-dessus de l'hydrolat. [8]

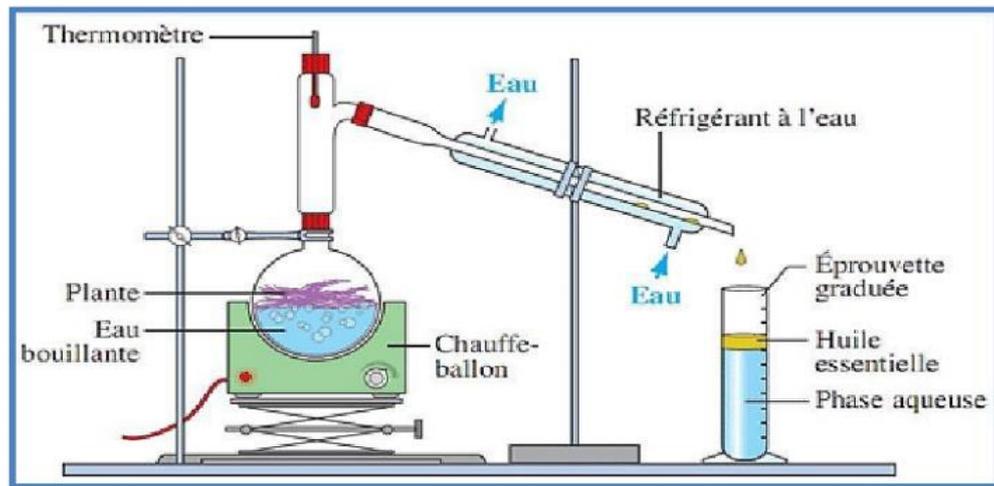


Figure 1.1: montage d'extraction par Hydrodistillation.

I.5.2- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Cette technique utilise la vapeur d'eau fournie par une chaudière qui traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Pour endommager la structure des cellules végétales et libérer ainsi les molécules volatiles pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique " l'huile essentielle". [9]

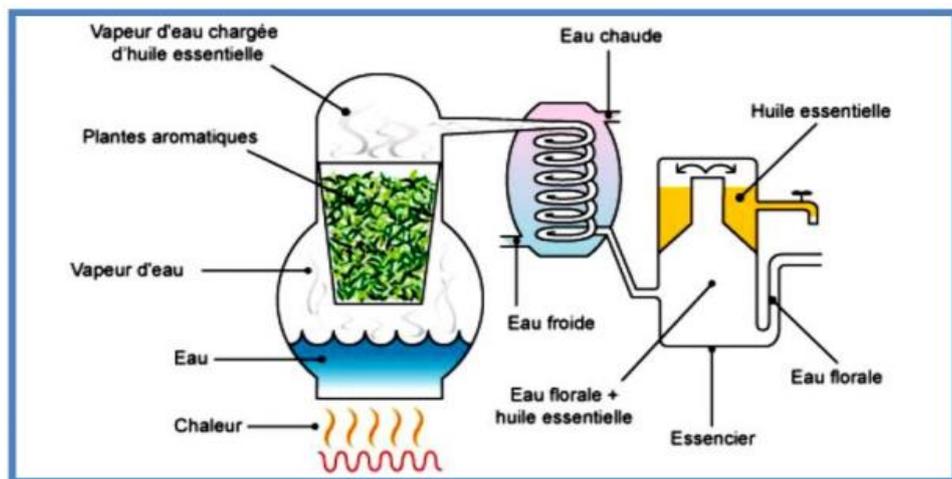


Figure 1.2: montage d'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

I.5.3- Hydrodiffusion :

Elle consiste à pulvériser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. [10]

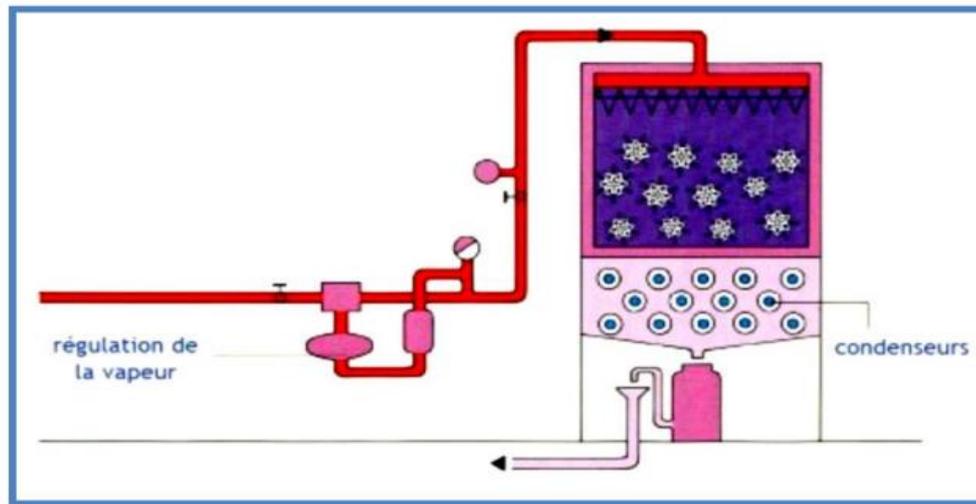


Figure 1.3: montage d'extraction par Hydrodiffusion

I.5.4-Expression à froid :

Cette technique sans chauffage est réservée à l'extraction des zestes des agrumes. Le principe est mécanique. Il est fondé sur la rupture des péricarpes, réservoirs d'essences olfactives, en faisant passer les agrumes sur des récipients dont les parois sont recouvertes de pics en métal. L'essence est libérée par un courant d'eau, puis décantée. [11]

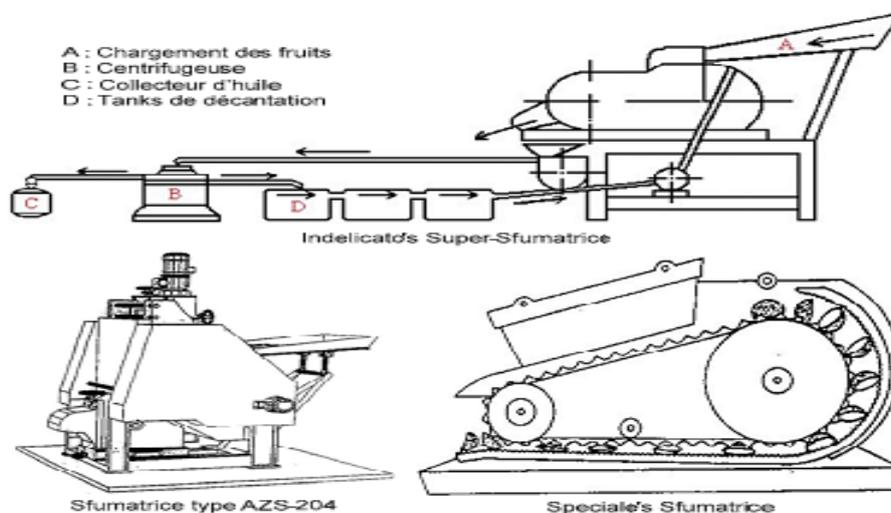


Figure 1.4 : Schéma de différentes méthodes d'expression à froid.

I.5.5 L'extraction par solvants :

La technique d'extraction par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. [12]

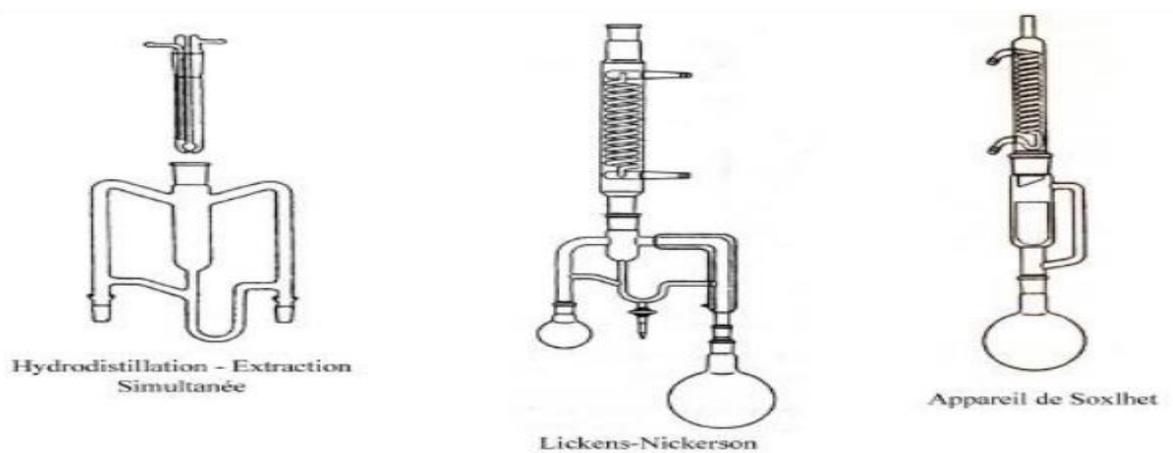


Figure 1.5 : Les différents types d'extraction par solvants volatils.

L'extraction par solvant organique volatil reste très pratiquée. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, cyclohexane, l'éthanol moins fréquemment le dichlorométhane et l'acétone.

I.5.6 L'extraction assistée par chauffage micro-ondes :

Cette technique utilise les micro-ondes comme une source de chauffage [07][13].

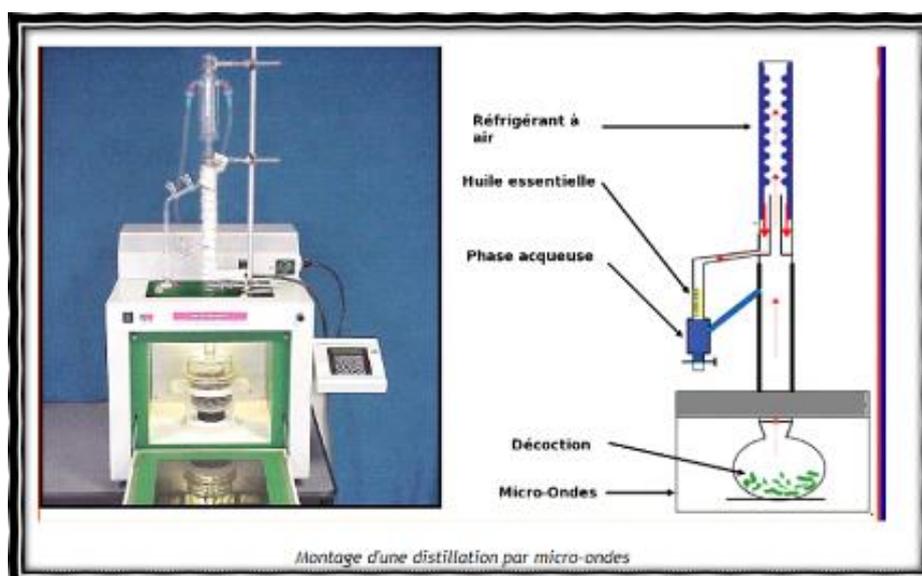


Figure 1.6 : L'extraction par solvant assistée par micro-ondes.

I.5.7 Rendement :

La teneur en HE reste en général très faible, inférieure à 1%. Le rendement de la distillation est donc limité : ce qui explique les coûts élevés de certaines HE.

Tableau 1.2: Rendements de la distillation de quelques drogues courantes [21]

Plante	Organe producteur Distillé	Poids de matérielle nécessaire à l'obtention d'1 Kg d'HE
Clou de girofle	Boutons floraux séchés	7Kg
Badinage de chine	fruits	20 Kg
Ylang- ylang	fleurs	50 Kg
Lavandin	Sommités fleuries	50 Kg
Lavande vraie	Sommités fleuries	150 Kg
Menthe poivrée	feuilles	1000 Kg
Thym vulgaire	parties aériennes	1200 Kg
Rose de damas	pétales	4000 Kg

I.6 composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de constituants appartenant, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes.

- Le groupe des terpénoïdes (les plus fréquents) ;
- Le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (moins fréquents).[22.23]

I.6.1 Les composés terpéniques :

Il s'agit d'une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Ils sont formés par la combinaison de 5 atomes de carbone. Ils sont classés selon:

- **Leurs fonctions** : alcools - esters - aldéhydes - cétones - éthers-oxydes.
- **Leurs structures** : linéaire ou cyclique : Il convient à souligner que seuls les terpènes de faible masse moléculaire (mono – et sesquiterpènes) sont rencontrés dans les huiles essentielles leur conférant un caractère volatil.

+ Monoterpènes :

Ils sont constitués par le couplage de deux unités isopréniques (C10) et forment 90% des huiles essentielles avec une grande diversité de structures. Ils comportent plusieurs fonctions.

✚ Sesquiterpènes :

Ils sont formés par l'assemblage de trois unités isopréniques (C15). Cependant leur structure ainsi que leur fonction restent similaires à celles des monoterpènes.

I.6.2. Composés aromatiques dérivés du phénylpropane :

Ils sont beaucoup moins fréquents dans les huiles essentielles que les composés terpéniques. Ils comprennent des aldéhydes,[24]: ex : huile essentielle de cannelle.

Alcool et Phénols: comme l'huile essentielle de girofle (eugénol)

I.7. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

- Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes.
- Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraînaibles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau.
- Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé.
- Elles sont pour la plupart colorées : ex : rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclarée et de romarin officinal. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation. Par conséquent, leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée.
- Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) [43].

I.8. Les méthodes d'analyse des huiles essentielles

Quel que soit le domaine d'utilisation des huiles essentielles (parfumerie, cosmétique, industrie pharmaceutique et agroalimentaire), une parfaite connaissance de leur composition chimique est nécessaire pour en contrôler la qualité et y déceler une éventuelle spécificité en vue de leur valorisation. Ainsi l'analyse des huiles essentielles, qui consiste des méthodes de séparation et d'identification des composants, reste une étape importante. Cependant, elle demeure une opération délicate nécessitant la mise en œuvre de diverses techniques[25] .

La chromatographie est le procédé fréquemment utilisé pour séparer les constituants des huiles essentielles. Elle se base sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La séparation des composants entraînés par la

phase mobile, résulte soit de leurs adsorptions et désorptions successives sur la phase fixe, soit de leurs solubilités différentes dans chaque phase [26]. Plusieurs méthodes existent :

I.8.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Il s'agit d'une technique de routine utilisée pour l'analyse rapide de fractions obtenues à la suite d'une séparation initiale. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide en plastique ou en aluminium, les substances migrent, entraînées par la phase mobile composée d'un ou de plusieurs solvants. Ensuite, le repérage des molécules s'effectue soit par ultra-violet (UV), soit par un colorant spécifique ou encore par exposition aux vapeurs d'iode.[27]

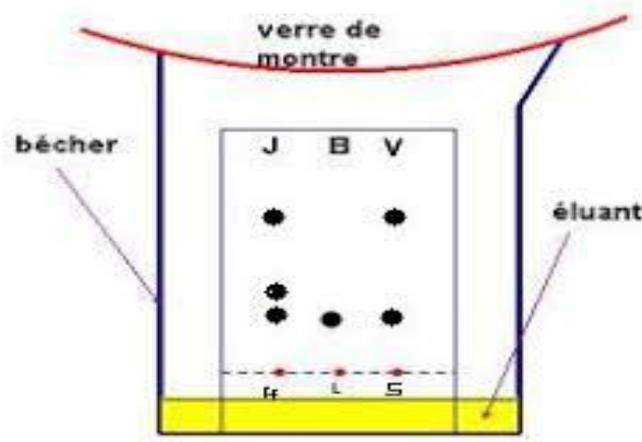


Figure 1.7 : Chromatographie sur couche mince

Cette technique, beaucoup moins performante que la chromatographie en phase gazeuse, peut être utilisée en routine pour le contrôle de qualité des huiles essentielles.[23]

I.8.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

C'est de loin la technique la plus utilisée pour les huiles essentielles. Elle permet l'individualisation des constituants, leur quantification et le calcul de leurs indices de rétention (Ir).

Le principe est basé sur la séparation des différents solutés gazeux par migration différentielle le long de la phase stationnaire. La phase mobile est un gaz (hélium, azote, argon ou hydrogène), appelé gaz vecteur.[28]

I.8.3 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GPC/SM) :

Le but de combiner entre la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse CPG-SM, après séparation chromatographique, est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique [29]. Le principe consiste à transférer les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse par la phase mobile (le gaz vecteur) dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera

en fonction de leur masse [23, 30]. L'identification est ensuite réalisée par comparaison des indices de rétention (Ir) et des données spectrales (spectres de masse) des constituants individualisés avec les caractéristiques de produits de référence contenus dans des bibliothèques de spectres [31].

I.8.4. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) :

Cette technique est indiquée pour étudier les constituants non volatils des concrètes et des absolues ou pour effectuer des préfractionnements. Elle peut être couplée également à un analyseur de masse. [23]

La chromatographie liquide à haute performance utilise une phase stationnaire très fine et une phase mobile liquide circulant sous l'effet d'une haute pression. Après la séparation des différents constituants de l'échantillon, un ordinateur assure l'acquisition et le traitement des données [32].

I.8.5. La Résonance Magnétique Nucléaire RMN :

Parmi toutes les techniques spectroscopiques, la RMN est la technique de choix pour la caractérisation des molécules organiques ; elle permet l'accès à des informations concernant le squelette et la fonctionnalisation des molécules[33]. .

L'originalité de la RMN par rapport aux autres techniques spectroscopiques réside dans le fait d'apporter une information précise et individuelle sur la très grande majorité des atomes constitutifs de la molécule, de permettre l'identification des connexions entre atomes de diverses entités tout en les situant dans l'espace les uns par rapport aux autres [34].

I.7.6 Indices physiques :

- La densité spécifique à 20 °C,
- L'indice de réfraction à 20 °C,
- Le pouvoir rotatoire,
- Le point de congélation

Ils sont déterminés par les méthodes conformes aux normes A.F.N.O.R. [35]



Chapitre II
Clou de girofle

II.1.INTRODUCTION :

Les recherches sur l'histoire de cette plante montrent que les clous de girofle avaient autrefois beaucoup plus de valeur, dès leur essor durant les grandes découvertes qui ont engendré le commerce des épices vers l'Europe. Cette épice a su motiver plusieurs nations à partir de sa conquête pendant plusieurs siècles.[40]

Le giroflier est une plante connue de tous, du moins son bouton floral, le clou de girofle. Mais peu de personnes connaissent ses véritables propriétés.

Cette plante était très bien connue des Chinois dans le XV^{ème} siècle. Elle apparut en Europe vers le IV^{ème} siècle, lorsque l'empereur Constantin, offrit au pape Sylvestre des richesses parmi lesquelles plus de 50kg de clous de girofle.

Malgré tous les efforts hollandais pour garder l'exclusivité du commerce du clou de girofle, les compatriotes réussissent au terme de plusieurs années à faire sortir clandestinement le giroflier des îles Moluques en 1769.[41]

Aujourd'hui, les clous de girofle sont disponibles dans toutes les grandes surfaces, à des prix accessibles (environ 100€/kg), après avoir bouleversé des civilisations entières et coûté la vie à de nombreux hommes.

Le premier pays producteur de girofle en tonnes (toutes parties de la plante confondue) est l'Indonésie, suivie de Madagascar, de la République-Unie de Tanzanie (notamment les îles productrices Pemba et Zanzibar), du Sri Lanka et des îles Comores qui arrivent loin derrière en termes de quantité produite.

Tableau 2.1: Classement des principaux pays producteurs en 2012 de girofles

Région	Production (1000\$ int)	Production (T)
Indonésie	161810	73000
Madagascar	52089	23500 Im
République-Unie de Tanzanie	15183	6850 Im
Sri Lanka	9420	4250
Comores	4876	2200 Im

II .2. Dénomination botanique

Comme beaucoup d'espèces, le giroflier a porté plusieurs noms scientifiques avant d'être nommé *Syzygium aromaticum* [44][45][46] :

Actuellement, les noms *Syzygium aromaticum* et *Eugenia caryophyllus* sont tous les deux employés selon la norme ISO 4720 (1997) se référant au giroflier.

II.2.1. Description de l'arbre :

Il s'agit d'un ligneux de 6 à 12 m de haut, qui peut vivre jusqu'à 150 ans. C'est un arbre sempervirent, de forme pyramidale ou conique, qui possède un tronc principal de forme oblique. De nos jours, il ressemble souvent à un arbuste car il est régulièrement taillé pour faciliter la cueillette.



Figure 2.1 : Allure d'un giroflier de Madagascar

Bien que le pivot puisse atteindre 2 à 3 mètres de profondeur, la majorité des racines est peu développée et reste superficielle (à 60 cm du sol). Le faible ancrage dans le sol explique la faible résistance de cet arbre aux cyclones de Madagascar. Bien qu'il soit cultivé sur place (Madagascar est un des plus gros producteurs mondiaux), il est originaire des îles Moluques, zone géographique ne présentant pas de risque cyclonique [47].

Les racines superficielles forment un chevelu utilisant facilement les matières minérales du sol [47]. A l'état adulte, les feuilles sont vert foncé luisant, mais lorsqu'elles se développent elles sont de couleur rose.

Les fleurs sont disposées en cyme, de 3 à 20 fleurs blanches, hautement aromatiques. Chaque loge contenant une vingtaine d'ovules. Ce qui est communément appelé « clou de girofle ».

II.2.2. La culture du giroflier :

Le giroflier, comme beaucoup d'autres plantes de la famille des Myrtacées, est habitué aux climats tropicaux. Cet arbre nécessite beaucoup d'ensoleillement, car sans soleil il ne donnera pas de clou. Il a également besoin d'humidité, de chaleur, et d'une altitude basse, ne dépassant pas 300 mètres. Les climats marins semblent favoriser son développement.

Dans l'idéal, le giroflier a besoin d'un sol volcanique (ou sédimentaire), au bord de mer (surtout pour l'altitude), avec une forte pluviométrie bien répartie sur l'année, et un ensoleillement plus marqué à l'apparition des inflorescences [48].

Un giroflier peut produire pendant 75 à 80 années, et ses vieux arbres peuvent donner 50kg de clous frais par an [49].

Le moment le plus favorable à la récolte est déterminé par la couleur rosé du clou de girofle .La période de récolte diffère selon les zones de production. Par exemple à Madagascar, les clous sont récoltés d'octobre à janvier, quand ils sont bien roses et qu'ils contiennent le maximum d'essence. (Tableau V) [49].

Tableau 2.2 : calendrier de récolte des clous de girofle en fonction de pays (7) .les zones vertes correspondent aux période récolte

	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Aout	Sept	Oct	Nov	Déc
Indonésie												
Madagascar/Comores												
Zanzibar												
Sri Lanka												

II.3. Les étapes de production

II.3.1. Dégriffage : Cette étape consiste à séparer les clous de son griffe.



Figure 2.2: Dégriffage des clous après la récolte

II.3.2. Le séchage :

Les griffes et les clous sont séchés séparément au soleil sur des nattes végétales pendant 2 ou 3 jours. Cela permet de favoriser l'inhibition de toute activité enzymatique après la récolte, et d'éviter la dégradation de certains constituants ainsi que la prolifération microbienne [49].

Les clous roses vont sécher pour permettre leur conservation: 35kg de clous frais donnent 10kg de clous secs. Ils seront alors prêts pour la distillation[48-49].



Figure 2.3 : Séchage des clous sur des nattes à Madagascar.

II.3.3. Le vannage :

Cette étape permet d'éliminer les dernières impuretés à l'aide d'un van .Ensuite le clou de girofle est stocké dans des meilleures conditions.

II.3.4. Conclusion

Les techniques de culture restent artisanales et demandent beaucoup de main d'œuvre. Il s'agit d'un travail minutieux qui se fait à la main. Cela permet d'obtenir des produits de qualité, sans pesticides et sans autres produits chimiques, idéaux pour la fabrication des huiles essentielles.

II.4. Les huiles essentielles du giroflier

Les chromatogrammes CPV obtenus à partir de la fraction neutre indiquent que les huiles sont riches en constituants volatils autres que l'eugénol et l'acétate d'eugénol.[51]

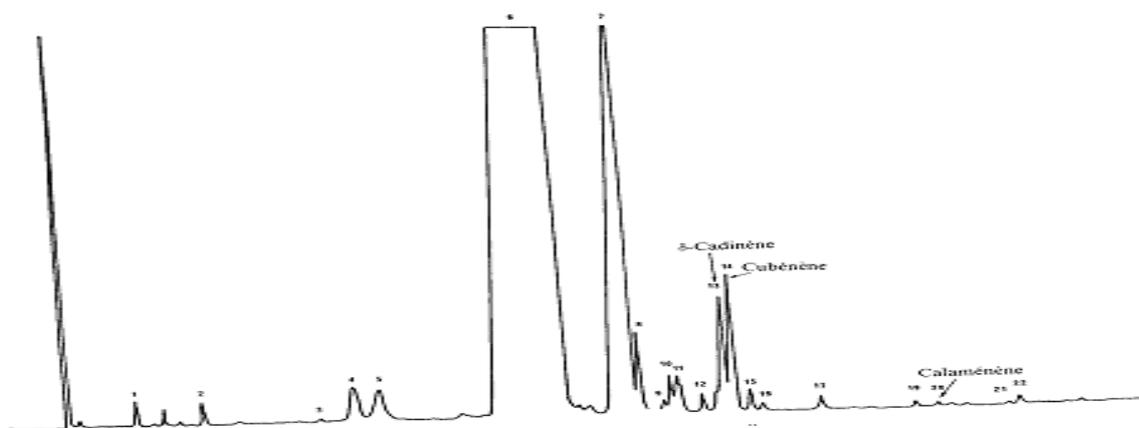


Figure 2.4 : CPV de fraction hydrocarbures obtenue à partir de l'échantillon de Madagascar.

Les résultats des différentes provenances prouvent que plus des composés déjà identifiés à partir du clou de girofle : eugénol, acétate d'eugénol, il ya d'autres composés qui montrent la présence Comme :

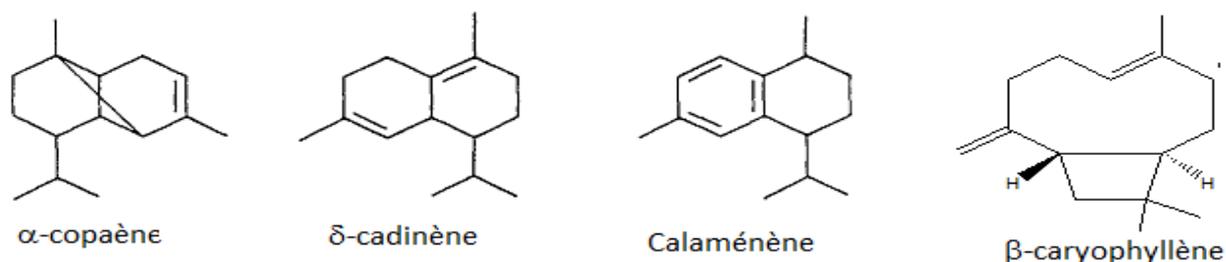


Figure 2.5 : des principaux constituants isoler a partir de HE de clou de girofle.

Cette présentation varie d'une région à l'autres, le tableau au-dessous montre cette variation.

Tableau 2.3 :Pourcentages relatifs des principaux constituants volatils isolés à partir de HE de clou de girofle de différentes provenances. [51]

Composés	Comores	Madagascar	Zanzibar	Indonésie
Heptanone-2	0.03	0.01	0.01	0.01
B-caryophyllène	3.20	3.20	3.20	2.20
δ -cadinène	0.18	0.19	0.33	5.20
Calaménène	0.14	0.30	0.20	0.17
Eugénol	63.80	73.81	70.02	36.50
Acétate d'eugényle	21.80	14.20	10.05	11.32

L'HE se trouve dans toutes les parties de la plante mais cette huile est plus facile à obtenir à partir des feuilles car les feuilles peuvent être récoltées toute l'année, ce qui assure une source de revenu plus stable pour les producteurs .mais les clous restent la première source pour la production de l'huile.

Tableau 2.4: Les caractères d'HE dans les parties de la plante [52]

	Clous	Tiges	Feuilles
Densité a 20°	1.040 – 1.069	1.038 -1.068	1.030 -1.051
Pouvoir rotatoire	jusqu'a 1°.40	jusqu'a 1°.30	jusqu'a 1°.30 – 2°
Indice de réfraction	1.528 -1.530	1.530 -1.538	1.532 -1.540
Rendement	12 – 15%	4.5 - 5%	2 -2.5%
Eugénol	78 – 98%	80 – 95%	90 – 97%

II.5. Eugénol

L'eugénol est un phénol de la famille des phénylpropènes, une sous-classe des phénylpropanoïdes appelé aussi 4-allyl-2-méthoxyphénol .est un liquide pratiquement incolore et très lipophile. Sa formule brute $C_{10}H_{12}O_2$ et sa formule développée est [53]:

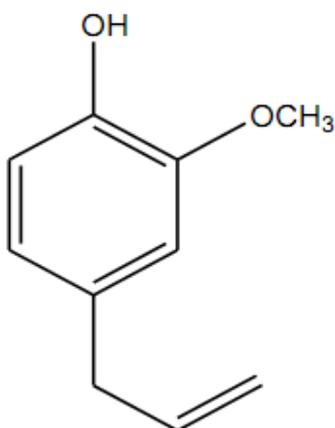


Figure 2.6: Formule semi-développée de l'eugénol.

À l'état naturel, l'eugénol est le majeure composé de HE du plusieurs plantes comme clou de girofle (70-90 %) et trèfle (80%), mais aussi de celle des piments, des feuilles de compartiment, basilic, camphre, cannelle et autres (Tableau 2.5) [54].

Tableau 2.5 : Pourcentages de l'eugénol dans l'huile essentielle de différentes plantes [54].

Plante	Concentration d' huile essentielle
Eugenia caryophyll lata	70 -90 %
Cinnamomum cassia	70 -90 %
Cinnamomum zeylanicum	70 -90 %
Dianthus caryophyllus L	30 %
Ocimum basilcum L	30 - 8 %0
Ocimum L gratissimum L	50 - 90 %
Sa nctum	70 %
Suave	80 %
Pimenta acris	40 - 60 %0
Pimenta officinales	65 - 90 %

II.5. 1. Propriétés physico-chimiques :

- Masse moléculaire 164.2 g mol^{-1}
- La densité 1,06 à 20 °C.
- Pharmacologiques. Ces Propriétés liées par rapport aux réactivités fonctionnelles de l'eugénol
- La température de fusion (à 1 bar) de -9 °C,
- La température d'ébullition de 253 °C
- Peu soluble dans l'eau et insoluble dans l'eau salée.
- Très soluble dans les solvants organiques (dichlorométhane -cyclohexane.....).

II.5 .2. Pharmacologie de l'eugénol :

De nombreuses recherches ont déterminé les effets thérapeutiques de l'eugénol qui soulignent son importance en tant que l'un des principaux composants bioactifs qui possède plusieurs propriétés grâce au groupement OH et au cycle aromatique.

Cette structure offre à l'eugénol une grande activité antioxydante, antimicrobienne et anti inflammatoire [54-55].

II.5. 2. 1. Activité antioxydant :

L'eugénol montre une action protectrice sur la cirrhose hépatique en inhibant la prolifération cellulaire et en diminuant le stress oxydatif [55]. Ce serait un excellent agent de prévention des métastases liées au stress oxydatif : il réduit les phénomènes d'inflammation en inhibant la tumeur necrosis factor (TNF) et la production de prostaglandine E2 (PGE2), et en modulant l'action de la

cyclo-oxygénase 2 (Cox-2); il capte les radicaux libres oxygénés et réduit les dégâts au niveau de l'acide désoxyribonucléique [56].

II.5. 2.2. Activité antimicrobienne :

L'eugénol et l'eugényle acétate ont démontré une puissante activité sur de nombreuses souches bactériennes, soit des bactéries à Gram + (Enterococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumonia, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Bacillus subtilis) ou bien des bactéries à Gram - (Pseudomonas aeruginosa E. coli, Proteus vulgaris, Salmonella choleraesuis, Salmonella typhi, Helicobacter pylori et Yersinia enterocolitica)

L'eugénol endommage la cellule membrane et paroi cellulaire, induisant la lyse cellulaire en Gram négatif et bactéries à Gram positif entraînant une fuite de virus intracellulaire Uide avec les teneurs en lipides et en protéines.

Ces propriétés antibactériennes pourront être utilisées par voie locale ou par voie orale, pour traiter une cystite [53].

L'eugénol a le potentiel de limiter l'infection virale et surtout les virus peuvent être transmis en pratique dentaire comme virus de HSV-1 et HSV-2. TNF [53].

II.5. 2.3. Activité anti inflammatoire :

L'eugénol a une large utilisation contre l'inflammation surtout chez les dentistes pour le traitement des inflammations mineures de la bouche et de la gorge (aphtes, gingivites), en bain de bouche chez les adultes [53].

II.5.3. Toxicité

L'eugénol n'est que très faiblement toxique. Toutefois, en cas de surdosage, l'eugénol peut causer des atteintes plus ou moins graves du foie (ex : cirrhose du foie). Il entre ainsi dans la catégorie des substances hépatotoxiques [57].



Chapitre III
Généralités sur
la microencapsulation

III.1. DEFINITION :

La micro encapsulation est une technique qui regroupe l'ensemble des procédures qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau **enrobant** (des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des polymères biodégradables) contenant une matière active (PA. essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore catalyseurs de réaction chimique...)

Les microparticules présentent une taille comprise entre **1 μm et 1 mm** et contiennent typiquement entre 5 et 90 % (en masse) de matière active [58].

La substance encapsulée peut se présenter sous la forme de fines particules de solide divisé, d'un liquide, ou encore d'un composé gazeux [59].

III.2. Classification des microparticules

Il existe deux Il existe deux types de microparticules qui diffèrent par leur structure (Figure 1)

III.2.1 .la microcapsule, particule sphérique (réservoir) de type « cœur -membrane » ; le cœur est constitué de la substance active et la membrane de l'agent encapsulant qui forme l'enveloppe solide.

III.2.2 la microsphère(matriciel), constituée d'un réseau polymère dans lequel la substance active est dispersée à l'état moléculaire ou particulaire

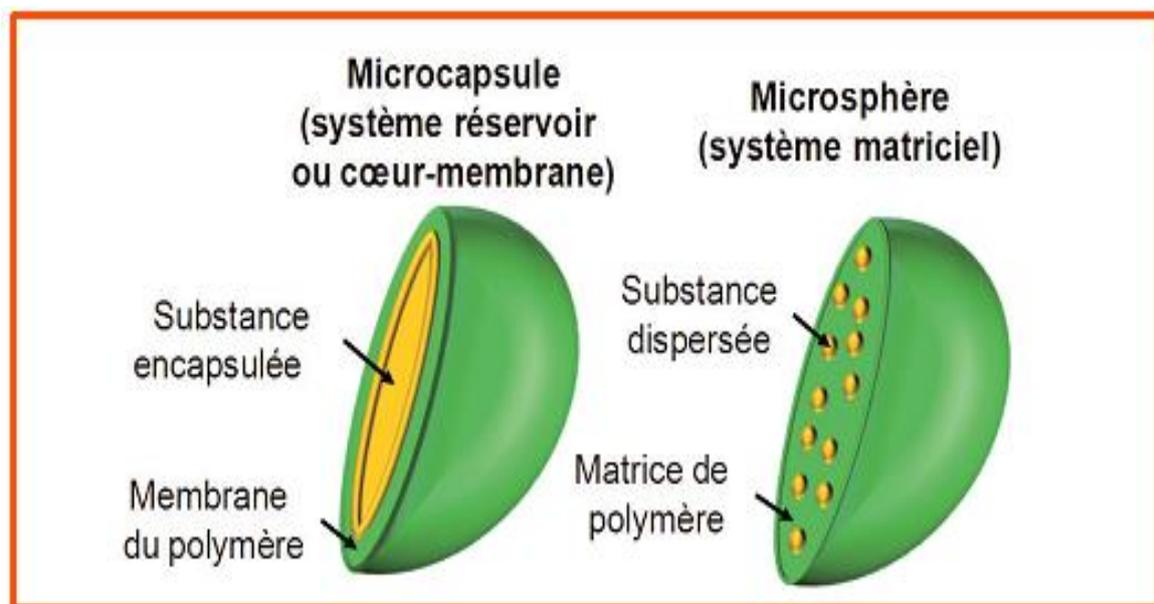


Figure 3.1 : Représentation schématique des 2 types de microparticule.

III .3. Intérêts de la micro encapsulation

Les buts de l'encapsulation peuvent être multiples[61] :

- Masquage d'une odeur ou d'un goût.
- Amélioration de la présentation du produit.
- Réalisation d'une mise en forme adaptée.
- Protection et stabilisation d'une substance.
- Permission de contrôle, de déclenchement et/ou de cible de la libération d'un PA.

Tableau 3.1 : Motivations spécifiques à encapsule principe actifs(PA)

Type d'encapsulation	Prince actif	Motivation spécifiques
Immobilisation	Cellules, enzymes substances volatiles	Procède continu ou accélération du procédé Allongement de leur durée de vie
Protection	Cellules, enzymes Vitamines , huile insaturées Aliments , enivrement	Protection contre le lessivage . le cisaillement Protection contre oxygène , la lumière , la chaleur Elimination du gout , des acides , des enzymes
Relargage	Matière active ou un de ses sous produits formes en présence d'un des matériaux encapsule	Libération au moyen de température, d'une force, Libération on cours du temps , libération dans certaines environnement (acide, basique, hydratés)
Fonctionnalisation	Liquides / gaz Solides / gaz / gaz Enzyme et un des matériaux encapsulants	Les formuler sous fourme solide Les disperser dans formulation liquides ou sèches Formation d''un bioréacteur

III .4 .Les différents procédés de micro encapsulation

Les techniques de préparation de particules encapsulantes sont nombreuses .Elle sont dépendantes de la nature du PA et La nature du milieu dispersant. Ces techniques peuvent être divisées en trois procédés principaux [58]:

- Procédés chimiques
- Procédés physico-chimiques
- Procédés mécaniques.

III .4.1. Procédés d'encapsulation chimique :

Les procédés chimiques sont basés sur la formation in-situ du matériau enrobant par polycondensation, polymérisation radicalaire, ou polymérisation (polyaddition) anionique d'unités monomères.

III .4.2. Procédés d'encapsulation physico-chimiques:

Les procédés physico-chimiques sont basés sur :

- De variations de solubilité et de conditions de précipitation des agents enrobant. Il s'agit, par exemple, de la précipitation contrôlée d'un polymère en solution, par ajout d'un non-solvant ou d'un polymère incompatible (coacervation simple), ou encore par variation de température et de pH de la solution (coacervation complexe) ;
- De changements d'état (fusion et solidification) des agents enrobant (gélification thermique d'émulsions). Les membranes obtenues peuvent être renforcées par adsorptions successives de poly électrolytes de charges opposées.

III .4.3 . Procédés d'encapsulation mécanique :

Ils sont basés sur le séchage ou la solidification de gouttelettes contenant tous les constituants de la future particule ce procédés met en œuvre des techniques de pulvérisation (spray-drying, spray-coating) pour la formation de gouttes ou gouttelettes (prilling) et d'extrusion (extrusion/sphéronisation) .

Tableau 3.2: classification des techniques d'encapsulation [58].

Type de procédés	Mode d'encapsulation	Gamme de tailles de microparticules obtenue	Type de produit obtenu
Procédés chimique	<i>Polycondensation inter faciale</i>	2 - 2000 μ m	• <i>Microparticules</i>
	Polymérisation inter faciale	2 - 2000 μ m	• Microparticules
	Polymérisation en milieu dispersé par voie radicalaire ou anionique		• Microparticules
Procédés physico-chimiques	Séparation de phase ou coacervation (simple ou complexe)	2 - 1200 μ m	• Microparticules
	Evaporisation - extraction de solvant	0.5 - 200 μ m	• Microparticules
	Gélification thermique d'émulsion (hot melt)		• Microparticules
Procédés mécaniques	Nébulisation / séchages (spray drying)	1 - 200 μ m	• Microparticules
	Gélification ou congélation de gouttes (priling)	200 - 800 μ m	• Microparticules
	Enrobages LIT fluidisées (spray –coating)	35 - 5000 μ m	• Microparticules
	Extraction / sophronisation	\geq 200 μ m	• Microparticules

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés uniquement à un des procédés physico-chimiques c'est l'encapsulation par émulsion .

III .5. Concepts généraux sur les émulsions

Une émulsion est le mélange de deux fluides non miscibles. L'une des phases est dite continue et l'autre phase est dispersée dans la première sous forme de gouttelettes. Généralement une phase aqueuse et une phase huileuse .On parle d'émulsion directe lorsque la phase dispersée est la phase huileuse (H/E ou O/W pour oil in water). Dans le cas contraire on parle d'émulsion inverse (E/H ou W/O pour water in oil). On peut également trouver des émulsions multiples (H/E/H ou E/H/E, O/W/O ou W/O/W) [62].

Pour l'encapsulation, on distingue deux méthodes :

III .5.1. Emulsion simple (E/H ou H/E) :

Cette méthode est la plus simple est toutes les autres en dérivent. Elle s'effectue en préparant la phase dispersée par dissolution du principe actif et le polymère dans un solvant organique, puis en réalisant l'émulsification qui consiste à introduire la phase hydrophile dans la phase lyophile. Cette étape est suivie par l'évaporation de solvant organique qui engendre la solidification des gouttelettes de phase dispersée.

Le recours à un tensioactif hydrosoluble permet de former préférentiellement une émulsion directe, alors qu'un tensioactif liposoluble favorise une émulsion inverse [63-64].

III .5.2. Emulsion double (E/H/E) :

Elle est définie comme des émulsions dans lesquelles les deux types d'émulsions eau dans l'huile (E/H) et huile dans l'eau (H/E) existent simultanément.

C'est une méthode qui est beaucoup utilisée car elle est plus adaptée pour l'encapsulation de macromolécules hydrophiles. De plus, les paramètres de ce procédé sont faciles à contrôler et les instruments utilisés sont peu onéreux [63-64].

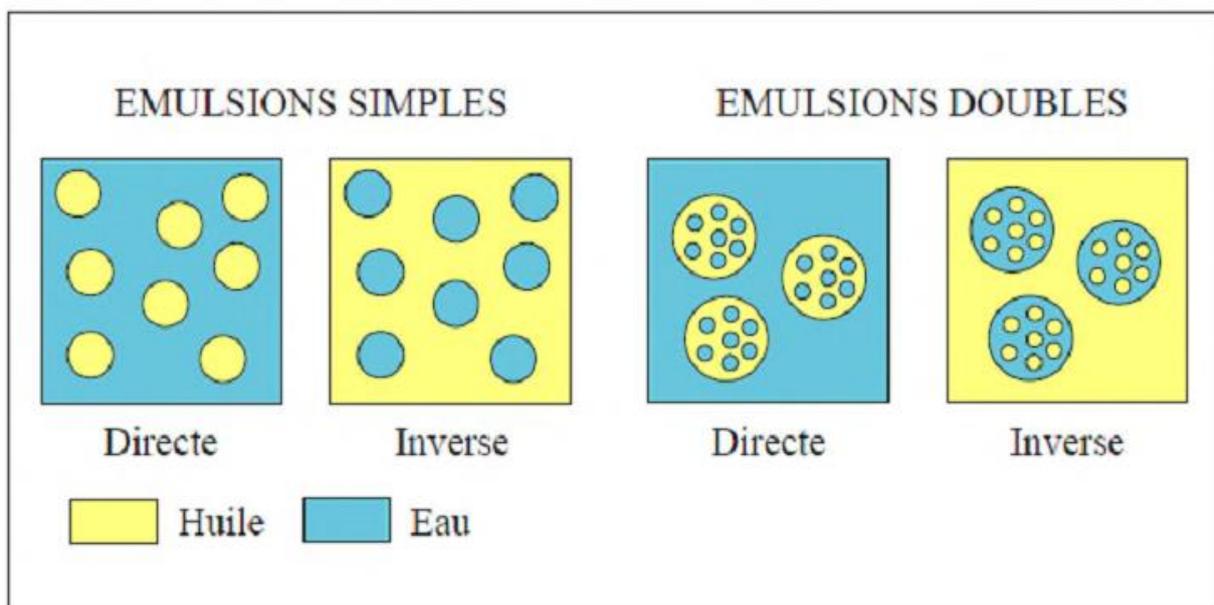


Figure 3. 2 : Différents types d'émulsion

III .6. Les polymères utilisés dans l'encapsulation

Il existe une grande variété de matériaux d'origine naturelle ou synthétique destinés à encapsulation de principes actifs. Mais quel que soit leur origine ces matériaux doivent être [64]:

- Biocompatibles.
- Non toxiques.
- Non onéreux
- Biodégradables.
- Non cancérigènes.

III .6.1. Les catégories des polymères utilisés dans l'encapsulation [64] :

- Les polymères issus de la biomasse, c'est-à-dire produits à partir d'agro-ressources :
Il s'agit d'une part des polysaccharides tels que l'amidon et ses dérivés, la cellulose, la chitine, le chitosane, la lignine et d'autre part des protéines, animales ou végétales
- Les polymères issus de la biotechnologie, c'est-à-dire produits par synthèse conventionnelle à partir de monomères issus de ressources renouvelables, comme le polylactide .
- Les polymères dont les monomères proviennent de ressources fossiles et qui sont obtenus par synthèse classique : il s'agit de polyesters tels que le poly (ϵ -caprolactone), les polyesteramides et les copolyesters aliphatiques (PBSA) ou aromatiques (PBAT).

Dans cette étude nous utilisons PHBV comme un enrobage de principe actif.

III .6.2 .Le poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalérate) ou PHBV :

Le PHBV est un polymère naturel produit par une grande variété de bactéries qui les stockent comme réserve énergétique intracellulaire. leur structure regroupe deux monomères (**l'acide 3-hydroxybutanoïque et l'acide 3-hydroxypentanoïque**) , sont reliés par des esters **P (3HB-co-3HV)**; l'épine dorsale du polymère est constituée d'atomes de carbone et d'oxygène [66].

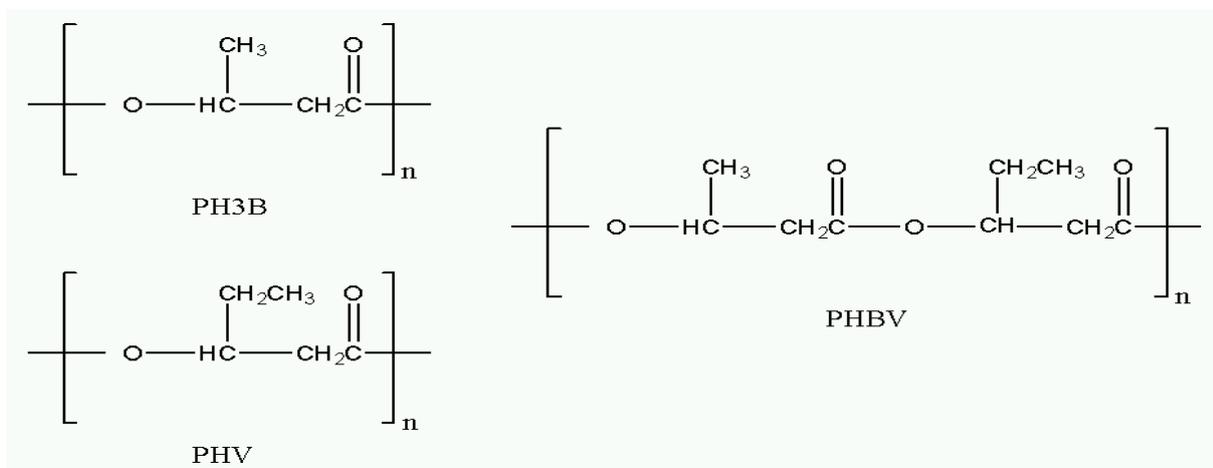


Figure 3.3 : structure de PHBV

III .6.2.1 . Les propriétés du PHBV :

Le caractère biodégradable et biocompatible du PHBV lui permet des applications dans de nombreux domaines dont le biomédical, les emballages,...etc.

L'augmentation du rapport entre l'acide 3-hydroxybutanoïque et de l'acide 3-hydroxypentanoïque engendre une augmentation : de la température de fusion, de la perméabilité à l'eau, de la température de transition vitreuse (T_g) et de la résistance à la traction.

Cependant la résistance au choc est réduite. Le P (3HB-CO-3HV) est considéré comme le meilleur candidat pour la production de matériau biodégradable plastique que P (3HB), car il est plus souple, plus fort et plus facile à traiter [68].

Tableau3.3 : propriété physique-chimique de PHBV [68].

Propriétés	P (3HB - 3HV)°
Densité	1.25
Température de dé fusion	153
Température de transition vitreuse(° c)	05
Cristallinité(%)	51
Module Young (Mpa)	900
Contrainte à la rupture (Mpa)	33
Biodégradation (minéralisation)	100
Resistance au choc (J/m)	45

III .7. La libération pour des microsphères polymériques :

Les facteurs qui affectent la libération du principe actif sont la structure de la matrice dans laquelle l'actif est contenu et les propriétés physico-chimiques associées au polymère et au principe actif. Il faut faire la distinction entre deux systèmes[68] :

- Les systèmes à libération déclenchée qui sont généralement des microcapsules formées par une membrane ayant une faible perméabilité qui vont libérer brutalement leur contenu par fracturation sous l'effet d'une pression (mécanique ou osmotique), d'un cisaillement ou par exemple par fusion due à une variation de la température [69].
- Les systèmes à libération prolongée dans lesquels le principe actif peut être libéré par diffusion passive à travers la membrane polymérique ou par dégradation/dissolution progressive du matériau enrobant [70] .

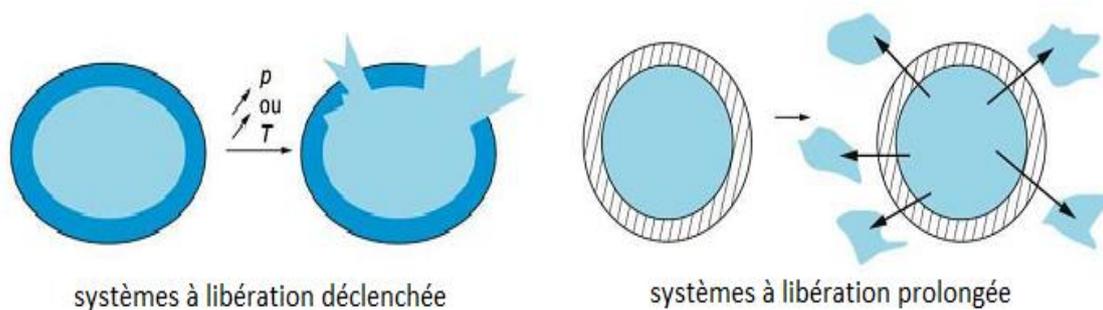


Figure3.4 : les types de libération

III. 8. .Application

La grande diversité de l'utilisation de l'encapsulation dans plusieurs domaines montre l'importance de cette technique .voici quelques exemples de ces applications.

Tableau3.4 : Divers exemples d'applications industrielles de l'encapsulation [71] .

Domaine	Application
Pharmacie	<ul style="list-style-type: none"> • Médicaments à effet retard • Ciblage d'un organe et libération spécifique de PA • Vaccine mono doses • Masquage de goût
Cosmétique	<ul style="list-style-type: none"> • Protection de PA • Effet de retard de processus de pénétration. • Augmentation de la biodisponibilité. • Amélioration de la présentation des produits (marketing)
Agro-alimentation	<ul style="list-style-type: none"> • Protection ou libération de PA (arômes. colorant ...) • Bioréacteurs (enzyme +composants de la particule)
Vétérinaire	<ul style="list-style-type: none"> • Complément alimentaire. • Traitement thérapeutique monodose. • Masquage de goût et de l'odeur.
Biotechnologie et environnement	<ul style="list-style-type: none"> • Traitements des eaux. • Implantations persistantes de microorganismes en milieu favorable
Chimie	<ul style="list-style-type: none"> • Peintures • Adhésifs. • Encres • Tissus

III .9. CONCLUSION

Nous venons de voir que la conception de microparticules peut être abordée par de nombreuses voies de synthèses. Quel que soit le procédé de fabrication, il demande une mise au point rigoureuse et une parfaite connaissance des critères suivants :

- Les propriétés physico-chimiques des réactifs.
- La nature et la structure de PA.
- L'objectif et la procédure de l'encapsulation.
- Le type et la durée de libération de PA.
- Les effets indésirables des composantes de la microparticule encapsulée.
- Les coûts de cette encapsulation.



Chapitre IV
Patrie expérimentale

IV. 1 BUTS ET OBJECTIFS :

Le but de notre travail est d'utiliser la technique de microencapsulation par émulsification d'un principe actif (Eugénol) extrait à partir d'une huile essentielle (Clou de girofle) pour étudier ses effets antibactériens après la libération de ce principe actif et faire une comparaison entre le PA encapsulé dans des microsphères avec son efficacité sans encapsulation. Pour cela nous avons scindé notre étude en trois étapes :

La première étape consiste à réaliser une extraction de principe actif à partir d'une simple Hydrodistillation de clou de girofle suivie par une extraction liquide-liquide de l'eugénol.

Dans la deuxième étape on a utilisé une émulsification simple E/H pour produire à des microsphères contenant le PA enrobé par le PHBV. Dans la dernière étape nous avons étudié l'efficacité de PA après sa libération sur des souches bactériennes et comparé ces résultats avec les effets antibactériens de PA non encapsulé sur les mêmes souches bactériennes.

IV .2.MATERIEL:

IV .2.1 .Matériel végétal et huiles essentielles

- Nous avons utilisé Plusieurs échantillons de clou de girofle de sources différentes l'une à l'autre (Madagascar - Indonésie) Tous les échantillons ont été débarrassés de tous éléments étrangers, placés dans des bouteilles et transportés au laboratoire.
- Huile essentielle de clou de girofle commerciale vendue dans les pharmacies pour la caractérisation des huiles après extraction.
- Eugénol commercial utilisé dans les cabinets dentaires.

IV .2.2 .Solvants et réactifs

Les solvants et les réactifs utilisés pour réaliser les différentes étapes d'extraction sont les suivants :

- **Acide chlorhydrique 37% :**

Propriétés physico chimique	
Formule:	HCl
Poids moléculaire:	36,46g/mol
Point d'ébullition	110 °C
Point de fusion	- 30 °C
Densité	1,18 g/cm ³ (20 °C)

❖ Hydroxyde de sodium

Propriétés physico chimique	
Formule:	NaOH
Poids moléculaire:	40 g/mol
Point d'ébullition	1390 °C
Point de fusion	- 323 °C
Densité	2,13 g/cm ³ (20 °C)

❖ Dichlorométhane :

Propriétés physico chimique	
Formule:	CH ₂ Cl ₂
Poids moléculaire:	84.99 g/mol
Point d'ébullition	39.75° °C
Point de fusion	- 95.7 °C
Densité	1.33 g/cm ³ (20 °C)

❖ Dichlorure de Calcium

Propriétés physico chimique	
Formule:	CaCl ₂
Poids moléculaire:	110,98 g/mol
Point d'ébullition	1 935 °C
Point de fusion	772 °C
Densité	2,174 g/cm ³ (20 °C)

❖ Tween 80 :

Propriétés physico chimique	
Formule:	$C_{64}H_{124}O_{26}$
Poids moléculaire:	1 310 g/mol
Point d'ébullition	> 100 °C
Point de fusion	-21 °C
Densité	1.06–1.09 g/mL Huile liquide

❖ Chloroforme :

Propriétés physico chimique	
Formule:	$CHCl_3$
Poids moléculaire:	119,37g/mol
Point d'ébullition	62 °C
Point de fusion	– 64 °C
Densité	1,18 g/cm ³ (20 °C)

IV .2.3. Verreries :

- Ballons (100ml .200ml).
- Réfrigérons.
- Fioles jaugées (10 ml, 20ml , 500 ml. 1L)
- Ampoule à décanter (100ml .200ml).
- Entonnoirs .
- Eprouvettes (50ml) ,
- Bêchers (100ml , 150ml, 200ml) .
- Pissettes.
- Papier filtre .
- Erlenmeyer (250 ml).
- Support .
- Boîtes pétries .

IV .2.3 .Appareils :

- Chauffe ballons .
- Thermomètres
- l'évaporateur rotatif de marque
- Agitateur mécanique de marque Heidolph RZR1
- Balance numérique.
- Agitateur magnétique avec chauffage de marque STURAT –SB62 .
- IRTF de marque .
- UV visible de marque UV-1650PC (SHIMADZU)..
- Système de filtration

IV .2.4. Matériel bactérien

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits du principe actif étudié a été réalisée en accord avec des méthodes officielles.

Les souches pathogènes cibles sont :

- ❖ **Escherichia coli.** Ces bactéries sont présentes naturellement dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. Ce sont des bacilles gram négatifs, aérobie-anaérobie facultatif (AAF) faisant parti de la famille des Enterobacteriaceae et plus précisément celle des Coliformes thermo tolérants. Si la plupart des souches de cette bactérie sont sans danger pour la santé¹.



Figure 4.1: Escherichia coli

- ❖ **Staphylococcus :** Le terme streptocoque désigne un genre composé d'un vaste ensemble de bactéries ubiquitaires et aux formes arrondies. Certaines d'entre elles sont pathogènes, tandis que d'autres sont commensales et composent les flores digestives de différents animaux, dont l'Homme.²

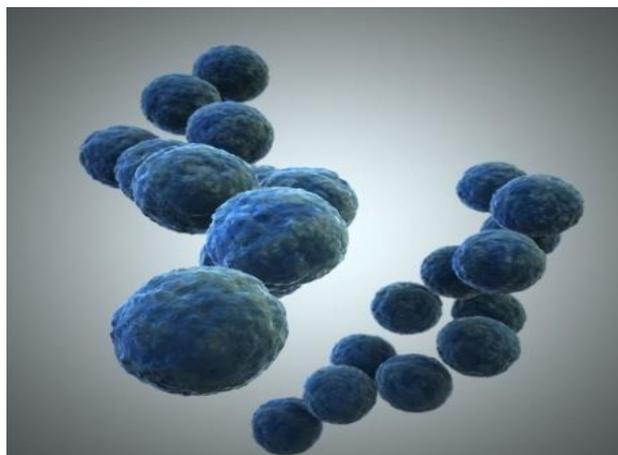


Figure 4.2 : Staphylococcu

¹ <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-colibacille-5138/>

² <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-streptocoque-13307/>

IV .3.Méthodes :

1.1. Préparation des solutions :

- **Solution de NaOH (2 N) dans une fiole de 100ml :**

$$m_{NaOH} = C.V.M \Rightarrow m_{NaOH} = 2 * 0.1l * 40 g.mol^{-1} = 8 g$$

la pureté est 98 % donc on a :

$$98 g \quad \rightarrow \quad 100g \text{ de solution concentrée}$$

$$8g \quad \rightarrow \quad m'_{NaOH}$$

$$m'_{NaOH} = \frac{8 * 100}{98} = 8.1633g$$

On dissout une prise de 8.1633 g de NaOH à 98% dans une fiole de 100 ml, puis on complète au trait de jauge avec l'eau distillée.

- **Solution acide chlorhydrique (6 N) dans un fiole de 100ml :**

$$m_{HCl} = C.V.M \Rightarrow m_{HCl} = 6 * 0.1l * 36.46 g.mol^{-1} = 21.876 g$$

la pureté de HCl est 37 % et la densité 1.18 donc on a :

$$37 g \quad \rightarrow \quad 100g \text{ de solution concentrée}$$

$$21.876 g \quad \rightarrow \quad m'_{HCl}$$

$$m'_{HCl} = 21.876 * 100/37 = 59.124 g$$

$$d = \rho_S / \rho_E \quad \text{avec } \rho_E = 1 \text{ donc } d = \rho_S = m_S / V$$

$$V = \frac{m_S}{d} = \frac{59.124}{1.18} = 50.105 ml$$

Donc, on introduit un volume de 50.10 ml de HCl à 37% dans une fiole 100ml puis on complète au trait de jauge avec l'eau distillée.

- **Solution de PH1.2 :**

Pour préparer cette solution nous avons suivi un protocole fourni par EUROPEAN PHARMACOTIQUE 5.0

- On a préparé 80 ml d' une solution de 1N de HCl (37%)
- Ajouté 2g de NaCl et jaugé avec l'eau distillée jusqu'a 1L .

IV .4. Obtention de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger³. Trois distillations ont été réalisées par ébullition de chaque échantillon de 20 g matériel végétal frais avec 200ml d'eau dans un ballon de 500 ml surmonté d'un coude relié à un réfrigérant. La durée d'extraction est de l'ordre de 50 minutes .On l'a recueillie dans un éprouvette de 100 ml

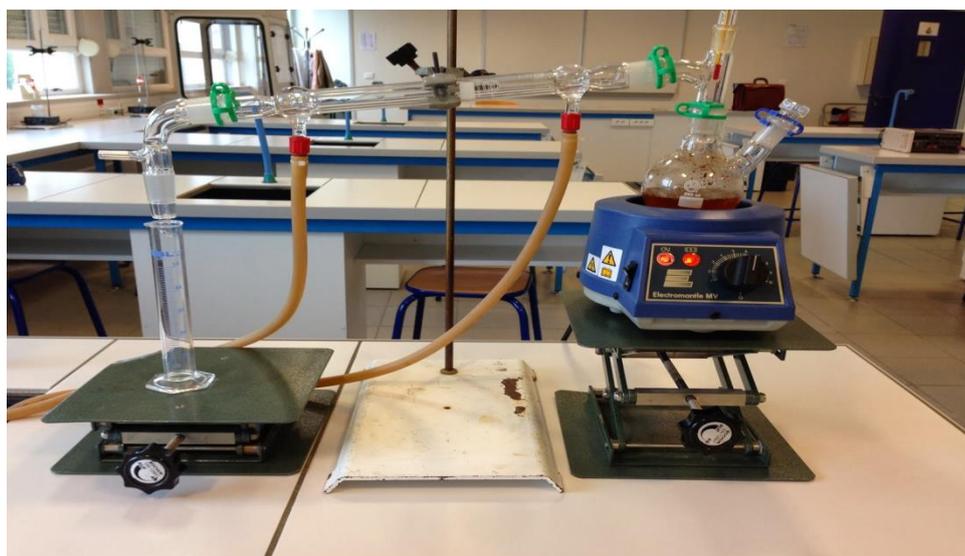


Figure 4.3 : Hydrodistillation simple de HE

IV .5. Extraction de l'huile essentielle de clou de girofle

Pour extraire l'huile essentielle , nous avons transvidé le distillat dans une ampoule à décanter de 250ml propre et sec et ajouté 25 ml de dichlorométhane .après une vigoureuse agitation pendant 1 à 2 min, entrecoupées de dégazages, cette opération permet de réaliser une extraction efficace.



Figure 4.4 : Décantation

Après la décantation, les deux couches sont séparées; la phase organique et la phase aqueuse sont localisées en comparant les masses volumiques des deux solvants.

³ Clevenger (J.F.) - Apparatus for the determination of volatile oil. - J.Am. Pharm. Assoc ., 1928, 17(4), 346-351.

Nous avons recueilli la phase organique dans un erlenmeyer de 250 mL propre et sec. La phase aqueuse peut être jetée après la réalisation de trois portions de lavage avec le dichlorométhane pour garantir un rendement abordable.

La phase organique a été filtrée sur filtre plissé après un séchage sur du CaCl_2 . Le filtrat a été recueilli dans le ballon d'un évaporateur rotatif. La masse de ballon a été déjà mesuré.

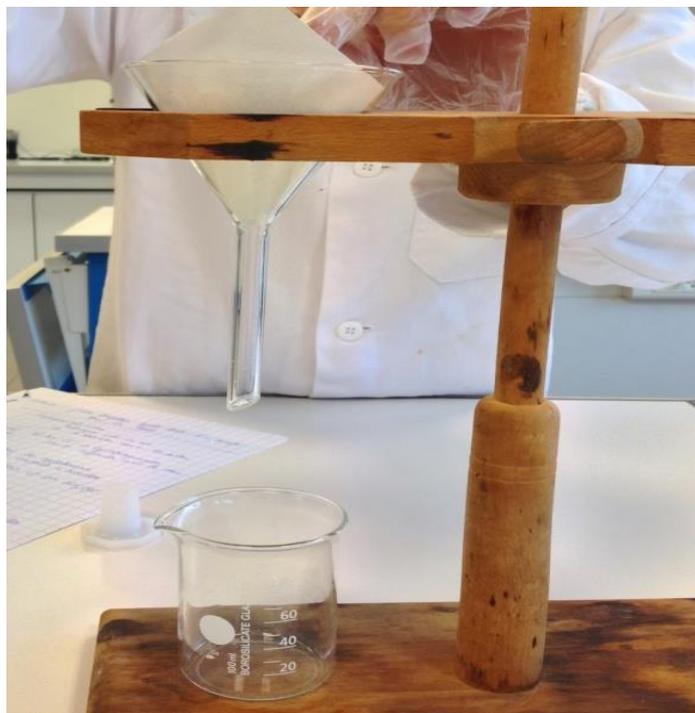


Figure 4.5. : **filtration de solution après le séchage**

Après l'élimination de dichlorométhane par distillation à l'évaporateur rotatif. on a pesé le ballon et noté la masse d'huile essentielle brute et gardé un échantillon de 2 à 3 gouttes dans une petite éprouvette pour les analyses de caractérisation. Trois expériences ont été réalisées.



Figure 4.6 : Elimination de dichlorométhane par vaporisation

IV .6. Extraction du PA :

pour extraire le PA (Eugénol) on a utilisé une extraction liquide –liquide . cette méthode consiste a séparer l'eugénol de l'acétyleugénol .Nous avons suivi les étapes déterminées au dessous . tout d'abord il a été introduit 20 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium à 2 mol. l^{-1} . suivie d'une bonne agitation. Puis la phase organique a été décanté dans un bécher de 250 ml (A) la phase aqueuse a été récupérée dans un erlenmeyer de 125 ml (B). La phase organique (A) a été remise dans l'ampoule à décanter et un deuxième lavage a été effectué par une autre portion de 20 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium pour récupérer la phase aqueuse dans le même erlenmeyer (B) . Le refroidissement de la phase aqueuse (B) se fait dans un bain de glace .Du HCl à 6M a été ajouté jusqu'à pH acide (2-3) (L'apparition d'un précipité blanc.)

La phase aqueuse acidifiée est remise dans l'ampoule à décanter propre et extraite avec 3 portions de 25 ml de dichlorométhane. Puis les phases organiques ont été recueillies dans un erlenmeyer propre et sec de 125 ml .Pour la récupération de l'eugénol la phase organique a été séchée avec du CaCl_2 et filtrée dans le ballon de l'évaporateur rotatif pour évaporer le dichlorométhane.

IV .7. Techniques physicochimiques de caractérisation des échantillons :

Pour caractériser l'huile essentielle , on a utilisé ses paramètres physicochimiques comme un témoin de comparaison et on a commencé par l'indice de réfractomètre .

IV .7. 1. Réfractométrie

Lorsqu'une radiation lumineuse rencontre l'interface de deux milieux transparents, elle subit un changement de vitesse à partir du point où elle quitte le premier milieu pour pénétrer le second.

Une des conséquences de cette variation de vitesse est que toute radiation, qui frappe obliquement la surface de séparation des deux milieux, subit une déviation appelée réfraction.

Expérimentalement, l'indice de réfraction ⁴est défini par le rapport entre les sinus de l'angle d'incidence, i , et de l'angle de réfraction, r :

$$n = \frac{\sin i}{\sin r}$$

L'indice de réfraction pour un milieu varie en fonction de deux variables. Premièrement la température. La masse volumique des milieux change selon la température et par le fait même la vitesse de la lumière aussi. Deuxièmement, la valeur de l'indice de réfraction est dépendant de la

⁴ Pavia D. L., Lampman G.R., Kriz G. S., Introduction to organic laboratory techniques, USA, Saunders College publishing, 676 p.

longueur d'onde. Des faisceaux de lumière de différentes longueurs d'ondes sont réfractés différemment par les mêmes milieux et auront donc des indices de réfractations différents pour un même milieu. On rapporte habituellement les indices de réfraction à 20°C et la source de lumière est une lampe au sodium ayant une longueur d'onde de 589 nm. On rapporte l'indice de réfraction à quatre décimales.

Chaque substance a un indice de réfraction caractéristique et sa mesure peut être utilisée pour l'identification des substances pures liquides. Celles-ci doivent cependant être d'une grande pureté.

IV .7. 1. 1. Méthode de mesure l'indice de réfraction :

L'appareil utilisé pour mesurer l'indice de réfraction est le réfractomètre. Le type d'appareil le plus courant est le réfractomètre d'Abbe,



Figure 4.7 : réfractomètre

Pour mesurer l'indice de réfraction de notre échantillon de HE, nous avons suivi les étapes suivantes : L'appareil doit être déposé dans une position idéale pour recueillir la lumière blanche .Le réfractomètre est réglé en mesurant les indices de réfraction des produits étalons (eau distillée, d'indice de réfraction 1,3330 à 20 °C) . L'échantillon a été placé pour essai dans le réfractomètre, jusqu'à ce que la température soit stable. En regardant dans l'oculaire et en tournant le bouton de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule (X) . Ensuite on fait la lecture de l'indice de réfraction.

IV .7. 2.la densité :

La densité relative de l'HE est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse égale du volume d'eau distillée à 20°C. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est **d**.

Pour attribuer la densité d par rapport à l'eau pure de notre extrait on a mesuré la masse m_{HE} et le volume V_{HE} de HE récupéré pour calculer sa masse volumique ρ .

On a calculé la densité relative à 20 °C d'une HE par division de masse volumique de HE à n'importe quelle température en (g/mL) sur la masse volumique d'eau distillée à 20 °C en (g/mL), en ajoutant le facteur de correction 0,00073 par degré.

La formule générale de calcul de la densité relative à 20° C est la suivante ⁵ :

$$d_{20} = \left(\frac{\rho}{\rho_E(20^\circ C)} \right) + (0.00073(t_{ex} - 20))$$

IV .7. 3.Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Les huiles essentielles récupérées et le PA extrait ont été analysées par chromatographie sur couche mince .On a utilisé comme éluant un mélange de 95% toluène et 5 % de l'éthanol .l'analyse a été réalisée sur une plaque de silice et on a suivi les étapes :

L'éluant a été versé sur une hauteur de 1cm dans la cuve et cette dernière a été couverte.

Un trait fin parallèle au bord inférieur de la plaque à une hauteur de 2 cm a été tracé au crayon. Trois positions ont été repérées sur cette ligne équidistantes notées A , B et C . A l'aide de micropipettes il a été déposé une goutte de chaque composé A ,B ,C .

- A une goutte de l'échantillon de PA extrait
- B une goutte d'eugénol commercial.
- C une goutte de HE récupéré après extraction.

La plaque a été séchée rapidement à l'aide d'un sèche-cheveux. Ensuite la plaque a été descendue dans la cuve de chromatographie. Lorsque l'éluant est à 1 cm environ du bord supérieur, la plaque a été sortie et à Séchée à l'aide d'un sèche-cheveux. Les vapeurs de l'iode ont été utilisés pour rendre visibles les molécules migrantes.

Pour chaque constituant, sa « vitesse de déplacement » ou « rapport frontal R_f » ont été déterminés d'après la relation suivante :

$$R_{fi} = a_i / d$$

a_i : distance parcourue par le constitution.

d : distance parcourue par l'eluant.

⁵ BOUKHATEM Mohamed Nadjib, HAMAIDI Mohand Said, SAIDI Fairouz et HAKIM Yahia, Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (Pelargonium graveolens L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Article de l'Unité de recherche en Biotechnologies Végétales, Département de Biologie, Université Saad Dahleb de Blida, Algérie. (03). 2010.p. 37-45.

IV .7. 4 .Caractérisation par IRTF

L'analyse en spectroscopie infrarouge (IRTF) a été réalisée en mode de transmission à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier SHIMADZU FTIR -8400- . Le domaine de nombre d'ondes balayés s'étend de 400 à 4000 cm^{-1} et la résolution spectrale est de 4 cm^{-1} En transmission, l'échantillon étudié à 0.2% en masse. Les résultats sont traités à l'aide d'un logiciel qui s'appelle Origin Pro 8 SRO v8.0725(B725) .

IV .8. La micro encapsulation :

Pour la préparation de microsphères à base de PHBV on a utilisé une émulsion H/E ; pour la phase organique on a dissous 1 g de PHBV avec 0.1g de principe actif (eugénol) dans 50 mL de chloroforme sous agitation avec chauffage à une température de 40 °C par un agitateur de marque STURAT – SB62 .



Figure 4.8 : Agitateur magnétique avec chauffage

La phase aqueuse est préparée par dissolution de 1.5 ml de tween 80 de 100 mL d'eau sous une forte agitation pendant quelques minutes.

La phase aqueuse est d'abord introduite dans un agitateur mécanique de marque (Heidolph RZR1) avec 4 turbines pales sous une vitesse de (950 -1200) Tr /min et température de 28°C .la phase dispersée est ensuite ajoutée goutte à goutte .après une durée de 3 heures 30 minutes le chloroforme est complètement évaporé (**figure 4.9**) .



Figure 4.9 : agitation mécanique du mélange .

Nous avons dominé une filtration sous vide pour récupérer les microsphères. Ensuite on a lavé les microsphères obtenues 3 fois par l'eau distillée .



Figure 4.10 : filtration sous vide

IV .8.1. Méthodes de caractérisation :

Détermination de la quantité eugénole encapsulée :

La quantité de l'agent actif encapsulé dans les microsphères fabriquées a été déterminée par la technique d'extraction dans un solvant bien choisi. Après un temps suffisant pour la solubilisation et le transfert du principe actif vers le solvant, la solution obtenue est analysée par spectrométrie UV-Vis afin de déterminer la concentration d'agent actif extrait des microsphères.

Le rendement (Rdt%) de la microencapsulation est défini par le rapport de la quantité de PA déterminé par extraction sur la quantité introduite initialement pour l'encapsulation.

$$Rdt\% = (m_{PA\text{ extrait}} / m_{PA\text{ initial}}) * 100$$

On a effectué l'extraction de PA des 3 formulations dans le pH=1,2. Ces microsphères de masse 0,1g sont broyées et plongées dans un volume de 100 mL dans un flacon bien bouché, agitées pendant 48 heures à une température ambiante. 1 mL de chaque solution a été prélevé, dilué dans le même milieu et analysé par UV-Vis, à une longueur d'onde fixée à 279 nm. La quantité d'eugénole déterminée par ce dosage représente alors la quantité réelle en principe actif encapsulé.

- **Observation par microscope optique :**

La forme des microsphères a été déterminée par microscope optique (OPTIKA 4083. B1) (Laboratoire de microbiologie –KARMAN- à l'Université Ibn Khaldoun-Tiaret)

- **Spectroscopie Infrarouge :**

Nous avons utilisé un spectrophotomètre infrarouge à transformé de Fourier type 8400-Schimadzu (Laboratoire de Génie Physique à l'Université Ibn Khaldoun-Tiaret), pour caractériser les microparticules préparées. L'analyse par spectroscopie FTIR a été effectuée sur des pastilles obtenues en ajoutant 0,002g de la substance à analyser dispersée dans du bromure de potassium KBr (0.3g) parfaitement sec. Le spectre FTIR de chaque échantillon est enregistré à la température ambiante dans la plage de 400-4000 cm^{-1} .

- **Courbe d'étalonnage et Calcul de ϵ_{\max} :**

Une courbe d'étalonnage de l'eugénol est réalisée afin de déterminer ϵ_{\max} du principe actif. Le spectrophotomètre utilisé est de marque UV-1650PC (SHIMADZU). Des solutions à des concentrations connues (0.01-0.02-0.025- 0.03 mol .l⁻¹) d'eugénol ont été analysées entre 279 nm et 400 nm.



Figure 4.11 : les concentration préparer pour l'étalonnage.

La Densité Optique (D.O) ou l'Absorbance (A) et la concentration (mole/litre) sont liées par la loi de Beer- Lambert :

$$(D.O)_{\max} = \log (I_{\max}/I_0) = \epsilon_{\max}.l.C$$

$$(D.O)_{\max} = \epsilon_{\max}.l.C, \text{ Où:}$$

- I_{\max}/I_0 : est la transmittance.
- ϵ_{\max} : le coefficient d'absorption spécifique (L.cm⁻¹.mole⁻¹).
- C : la concentration en mol/l de la solution.
- l : la longueur de la cellule en quartz (1cm).

A partir de 4 solutions de concentrations connues, il est possible de tracer la «Droite d'Etalonnage », permettant de déterminer la valeur de ϵ_{\max} d'eugénol. La valeur de ϵ_{\max} correspond à la valeur de la tangente de la droite (D.O) $\max=f(C)$.

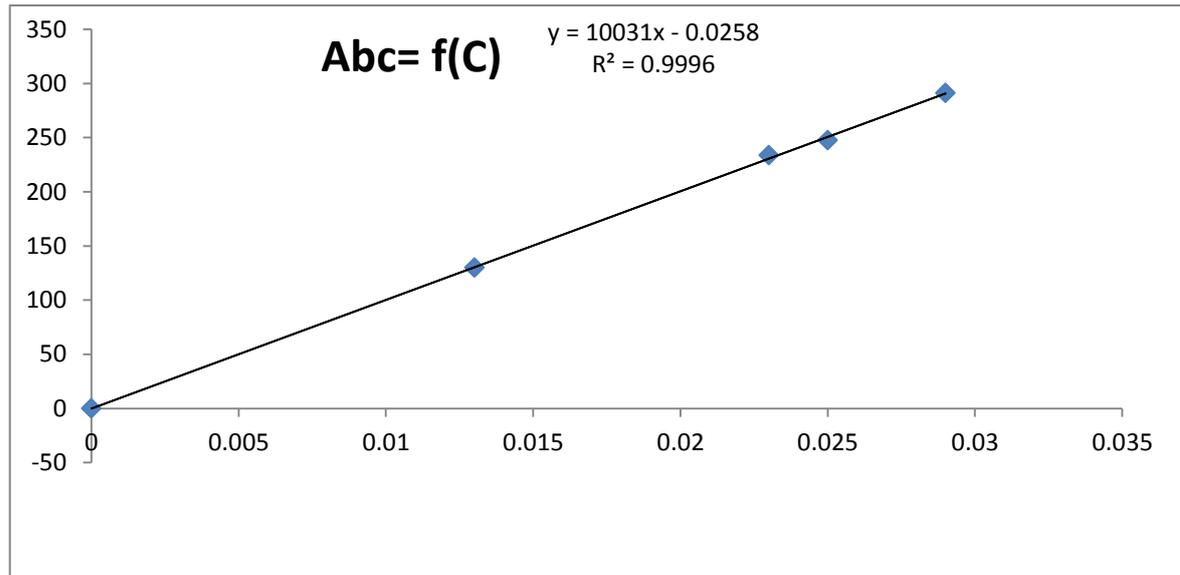


Figure 4.12 : Courbe d'étalonnage de l'eugénol à pH=1,2 et T 37°C.

IV .9. Activité antibactérienne

Pour tester l'effet de l'eugénol encapsulé sur les souches bactériennes, nous avons utilisé la méthode des disques, appelée aussi «Méthode Pasteur ». C'est une méthode très utilisée pour tester l'action antimicrobienne des huiles essentielles .Elle consiste à placer un disque imprégné d'huile essentielle sur une gélose nutritive inoculée par le microorganisme test (diffusion en disque). L'ensemencement est effectué par étalement, à partir de l'inoculum fraîchement préparé, pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Une zone d'inhibition est produite autour du disque quand l'huile essentielle est active contre le microorganisme test (figure 11).

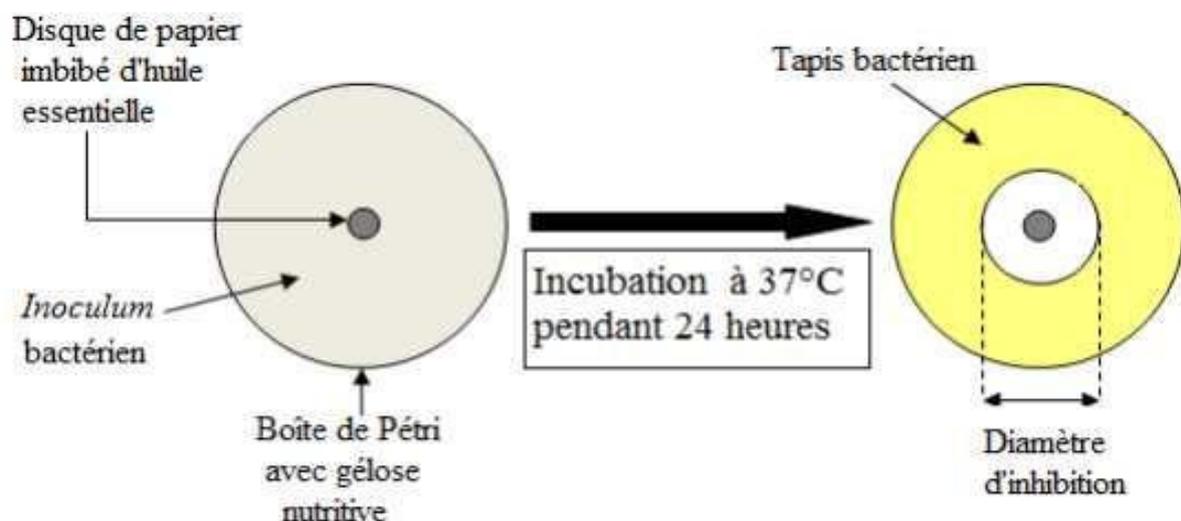


Figure 4.13 : Principe de la méthode de diffusion par disque.

IV .9.1.Préparation de l'inoculum:

A partir d'une culture jeune de 24 heures sur milieu gélose nutritive, une suspension bactérienne a été préparée par le prélèvement de 2 à 3 colonies bactériennes à l'aide d'une pipette pasteur. Ces colonies ont été mises dans un tube de solution physiologique stérile avec agitation de façon à obtenir une densité optique de 0,08 à 0.1-625 nm.

IV .9.2.Ensemencement et application des disques :

L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage et, en procédant comme suit : Le milieu MH (Muller Hinton⁶) a été coulé dans des boites de pétrie et laissé solidifier. Ensuite, un écouvillon stérile a été plongé dans la suspension bactérienne puis légèrement essoré. L'ensemencement a été fait à l'aide de cet écouvillon sur la surface de la gélose en tournant la boite 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum. Dans chaque boite de pétrie, nous avons déposé cinq disques de 6 mm imbibés de 15 µl de chaque solution à tester pour les deux échantillons de bactéries . (4 boites pour chaque type de bactéries). La cinquième boite on a laissé son disque comme un témoin sur la croissance de bactéries .

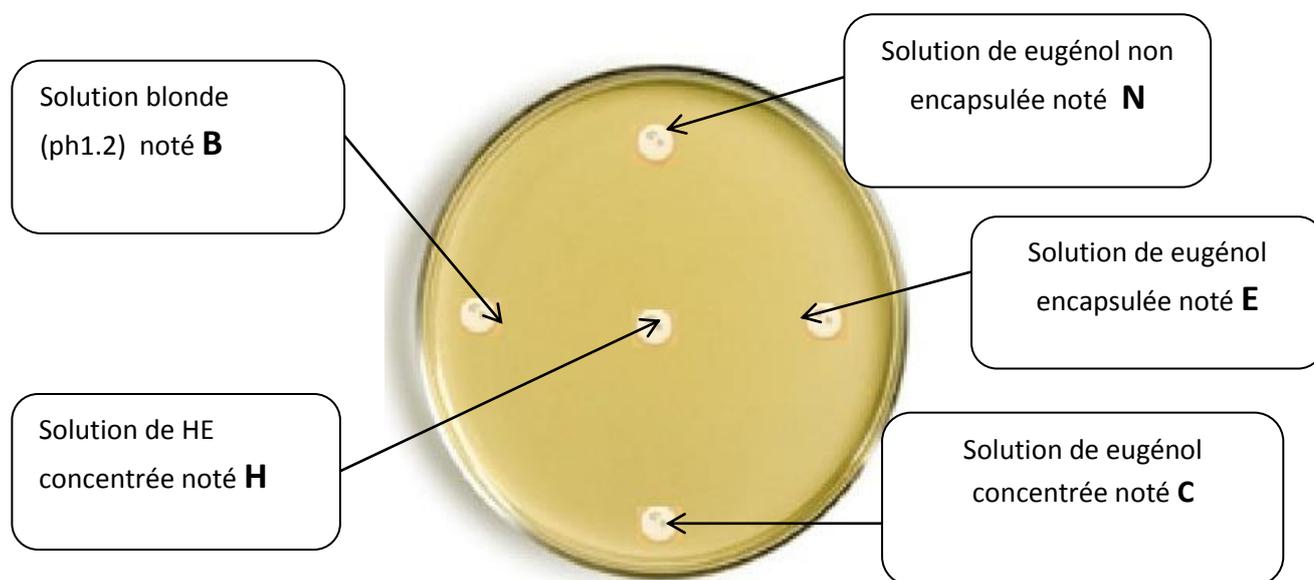


Figure 4.14 : référencer les disques sur les boites patries.

⁶ La gélose Mueller-Hinton est une [gélose](#) riche pour la réalisation de l'[antibiogramme](#) standard

- L'incubation des boites a été faite à l'étuve à 37°C durant 24 heures.



Figure 4.15 : L'incubation des boites dans un étuve de marque Memmert UE 202 .

IV .9.3.Lecture des résultats :

Le diamètre de la zone d'inhibition a été mesuré avec précision (à l'aide d'un pied à coulisse) pour chaque produit testé (diamètre du disque intégré dans la zone d'inhibition). Nous avons suivi l'échelle d'estimation⁷ de l'activité antimicrobienne qui classe la substance testée selon le diamètre de la zone d'inhibition (D) de la croissance microbienne en cinq classes :

- Très fortement inhibitrice: $D \geq 30$ mm
- Fortement inhibitrice: $21 \text{ mm} \leq D \leq 29$ mm
- Modérément inhibitrice: $16 \text{ mm} \leq D \leq 20$ mm
- Légèrement inhibitrice: $11 \text{ mm} \leq D \leq 16$ mm
- Non inhibitrice: $D < 10$ mm

⁷ Staphylococcus aureus golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity (archive) Journal of Experimental Medicine.



Chapitre V
Résultats et discussions

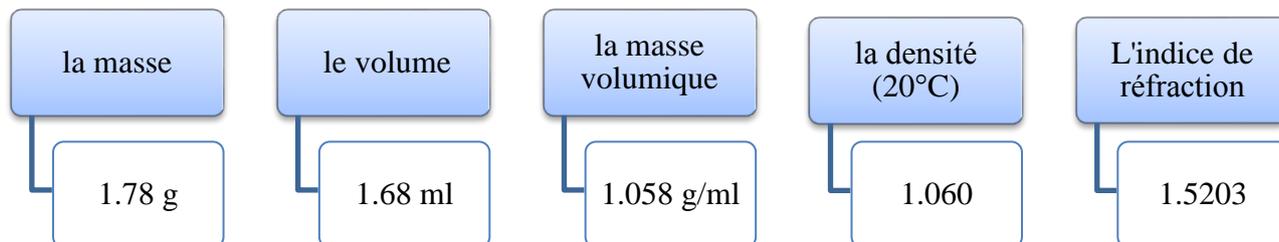
v. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

v .1.Extractions de l'HE:

➤ Résultats

➤ Rendement de l'extraction :

L'huile essentielle de clou de girofle extraite est d'une couleur jaune et d'odeur forte



- Le rendement en huile essentielle a été déterminé par rapport à la matière végétale distillée.

$$Rdt = \frac{m_{HE}}{m_{MV}} = \frac{1.68g}{60g} \times 100\% = 2.8\%$$

Rdt : le rendement

m_{HE} : masse de HE extraite

m_{MV}: masse de matière végétale introduite dans Hydrodistillation

Tableau 5.1 :L'évaluation de volume d'HE en fonction de temps:

Temps (min)	0	8	16	24	32	40	48	56
Volume (ml)	0	10	31	45	56	72	89	100
Température C°	65	97	97	97	97	97	97	97

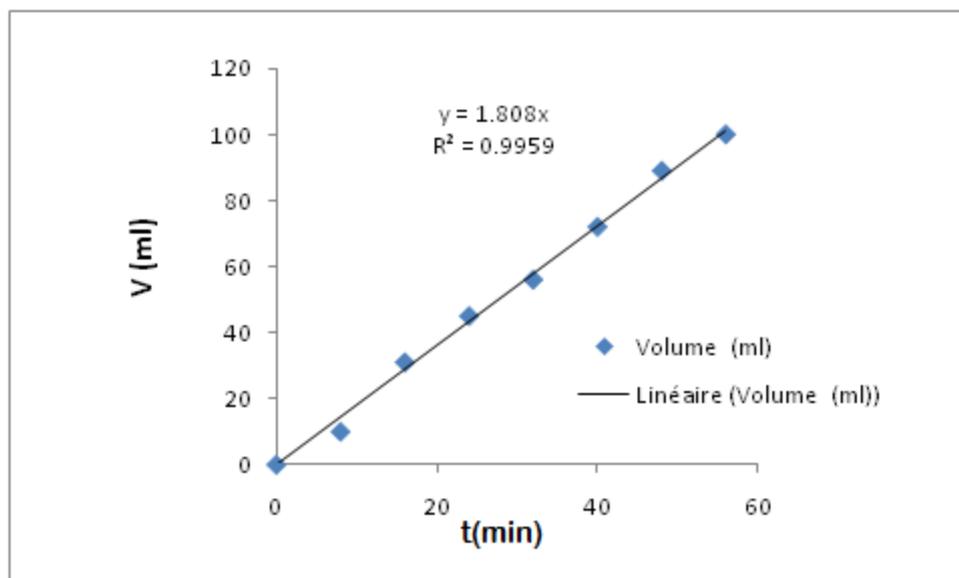


Figure 5.1 : L'évaluation de volume d'HE en fonction de temps:

➤ Discussion:

L'hydro distillation est une méthode très utilisée pour l'extraction des huiles essentielles. Cette méthode nous a permis d'extraire 1.78 d'HE pour une masse de 60g de la plante qui est un rendement légèrement faible par rapport à la valeur mondiale (12%-15%)⁸, c'est à cause des pertes dues à la volatilité des composants (température d'évaporation très faible) et aux conditions de travail. Cela peut aussi être dû à la composition de la plante. Variation de la composition à cause des conditions de récolte, de conservation...etc.

- **La densité $d_{20} = 1.058 + [0.00073 \times (23-20)] = 1.0602$**

Cette valeur est approximation proche de valeur idéale qui est entre 1.040 – 1.069 ce qui prouve que notre huile essentielle est pure.

- **L'indice de réfraction $n_d^{20} = 1.5203$**

La valeur théorique de l'indice de réfraction pour HE de clou de girofle à 20°C est 1.528-1.530.

➤ Discussion:

Les résultats indiquent que l'indice de réfraction de l'huile essentielle est de 1,5203.

Sa densité relative de 1.0602 et son pH de 6. Ces données sont conformes aux normes Selon AFNOR (2000). Ses résultats prouvent que la matière végétale a bien été conservée. L'huile essentielle qui a été extraite est bien celle du clou de girofle. Bien que le rendement a été très faible mais sa qualité reste intouchable malgré les conditions de travail.

V.2. Extraction de l'eugénol :

Dans le but de purifier et extraire l'eugénol et d'éliminer les impuretés ou autres composés parasites, l'huile du clou de girofle est traitée avec un excès d'hydroxyde de sodium afin de dissoudre l'eugénol. Le mélange résultant est ensuite extrait avec de dichlorométhane pour enlever les autres constituants de l'huile (acétate de l'eugénol). Le solvant aqueux utilisé est la soude qui rend non seulement le milieu plus basique mais qui rend l'eugénol ionique et lui permet d'être polaire donc soluble dans l'eau. Ce dernier a donc été extrait dans la phase aqueuse. Pour extraire le maximum d'eugénol dans la soude, l'opération est répétée trois fois. Cela réduit la perte de matière et améliore notre rendement.

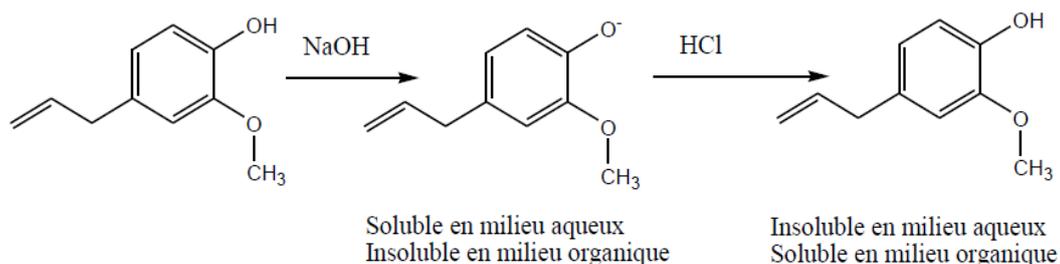
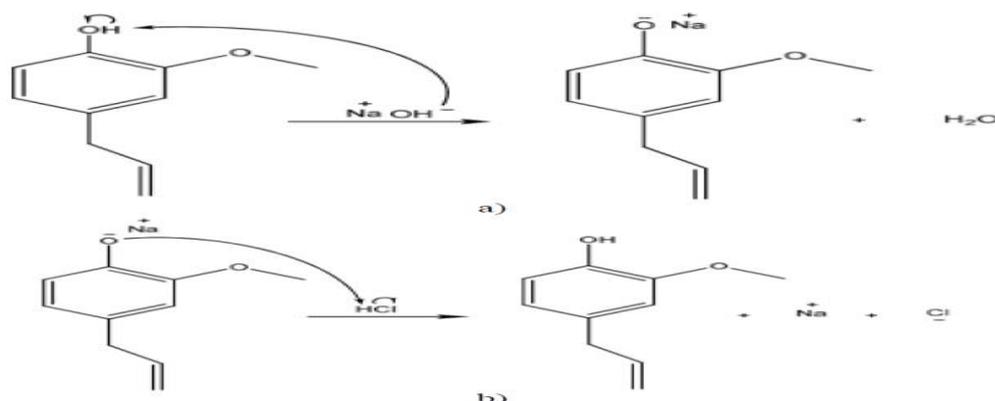


Figure5.2 : réaction de l'eugénol avec NaCl et HCl

⁸ Tableau les caractères de HE dans les parties de la plante (annexe 05)

L'eugénol se solubilise en milieu basique dans lequel il perd son proton. Une fois le milieu redevenu acide, l'eugénol récupère à nouveau son proton. Nous proposons les deux mécanismes suivants



Le rendement en eugénol :

- Le rendement de l'eugénol a été déterminé par rapport à la masse de huile essentielle extraite .

$$Rdt = \frac{m_{eug}}{m_{HE}} = \frac{1.23g}{1.68g} \times 100\% = 73\%$$

- m_{HE} : masse de HE extraite
- m_{eug} : masse de l'eugénol obtenue

Discussion:

Cette valeur appartient à la gamme 70 % à 90 % qu'est une valeur un peu faible par rapport aux autres résultats⁹ à cause des pertes approximatives dans l'Hydro distillation (volatilité des composés).

Chromatographie sur couche mince(CCM) :

$$R_{fa} = R_{fa} = a_i / d = 1.2 \text{ cm} / 4\text{cm} = 0.3$$

$$R_{fc} = a_i / d = 0.5 \text{ cm} / 4\text{cm} = 0.125$$

R_{fa} . R_{fa} . R_{fc} rapport frontal des substances A.B.C successives

L'analyse de la composition chimique par CCM a permis de déterminer deux constituants majoritaires (figure 5.3).

⁹ Lobstein, A., Couic-Marinier, F. et Barbelet, S. (2017). *Huile essentielle de Clou de Girofle. Actualités Pharmaceutiques*,

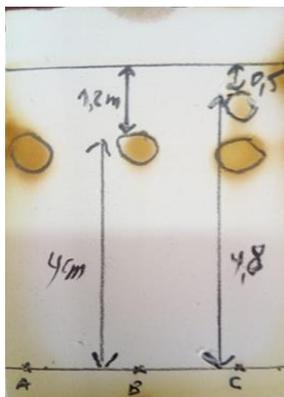


Figure 5.3 : Chromatographie sur couche mince

Discussion:

L'analyse par CCM donne deux rapports frontaux défiant la première est de 0.3 pour les trois composés analysés à la même hauteur de l'eugénol révérencielle (B) qui prouve que les composés A et C contiennent la même substance .

La deuxième tache (R_{fc}) correspondant à une deuxième substance chimique dans l'échantillon C .

• **Spectroscopie Infrarouge :**

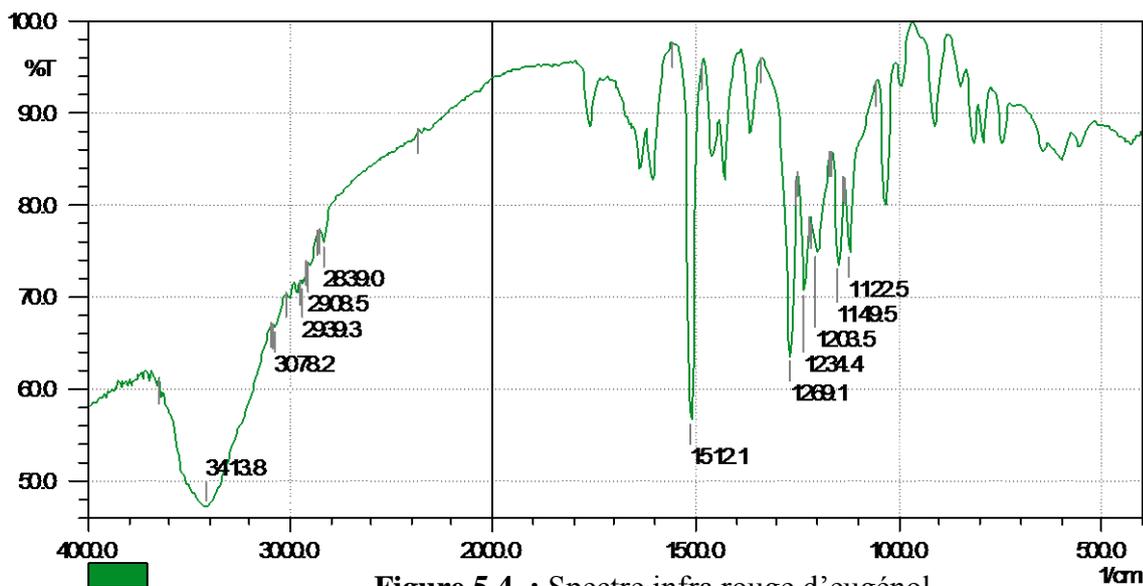


Figure 5.4 : Spectre infra rouge d'eugénol

Tableau 5.2 : Bandes caractéristiques correspondant d'eugénol

la fonction	• Longueur d'onde
O-H alcool	• 3750-3 250 large bande
C_{sp3} -H	• 3070 - 2840
C=C	• 1512.1
R-O-CH ₃	• 1270 -1120

- **Discussion:** Les bandes identifiées à l'aide de table IR caractérisés les fonctions majeurs dans la molécule examinée et elle est identique à celle des autres études¹⁰.

V.3. Microencapsulation

- **Observation par microscope optique :**

L'analyse par microscope optique montre la forme sphérique des microparticules préparées, il nous donne une information sur la variété de la taille des particules, et il nous montre aussi la présence des agrégats dans toutes formulations.



Figure 5.5 : Observation des microsphères par microscope optique.

- **Caractérisation par FTIR :**

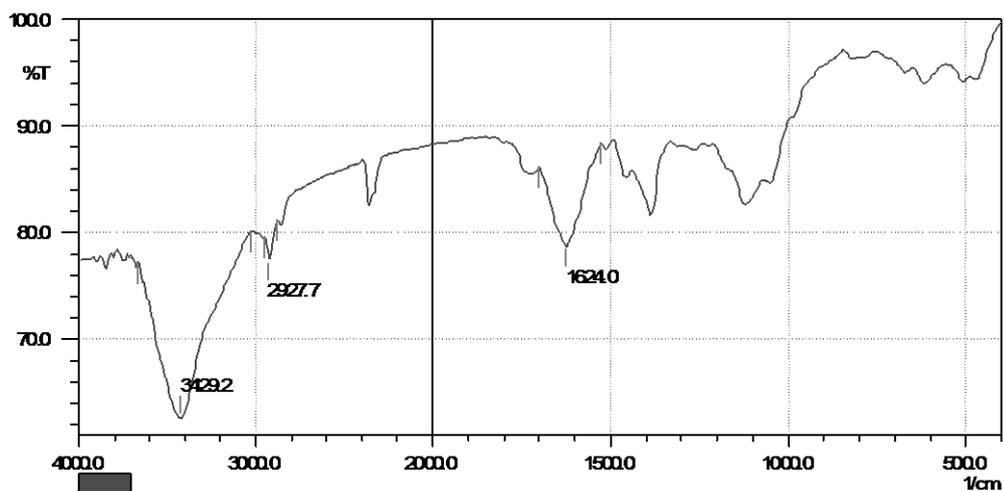


Figure 5.6: Spectre infra rouge d'eugénol capsulé

¹⁰ <http://www.exchem.fr/ireugenol.htm>

Tableau 5.3: Bandes caractéristiques correspondant d'eugénol capsulé

la fonction	• Longueur d'onde
O-H	• 3429.2
C _{sp3} -H	• 2927.7
C=O	• 1624
-CH ₃	• 1456
C-O	• 1170.2

➤ Discussion

Les spectres IR des microparticules établis ont été comparés aux spectres des polymères matrices utilisés et de l'agent actif (eugénol). Les résultats montrent que le spectre des microsphères n'est que la somme des spectres FTIR le principe actif et des polymères d'enrobage (PHBV).

• Détermination de concentration de principe actif libéré :

A partir d'une solution de concentration 0.001g/ml de eugénol encapsulé de PH=1.2

Et à l'aide de spectroscopie UV/visible on a déterminé la concentration de l'eugénol libéré.

$$C = 0.0081 \text{ g/l}$$

Le rendement de libération est :

$$Rdt = \frac{m_L}{m_E} = \frac{0.0081}{0.5} \times 100 = 1.6\%$$

m_L : la masse de l'eugénol libéré

m_E : la masse de encapsulé

➤ Discussion

La concentration du principe actif libéré est très faible cela peut être dû à une agrégation des chaînes de PHBV sur lui-même. Dégradation et réticulation du polymère pendant son stockage. LPHBV est un polymère biodégradable, très fragile et perd ses propriétés dans le temps Une méthode d'encapsulation pour ce polymère pourrait donner de meilleurs résultats. Où bien l'utilisation d'un autre polymère rendra les résultats meilleurs.

v .4. L'activité antibiotique

• Résultats

Les diamètres des zones d'inhibitions de chaque concentration ont été déterminés pour les 2 souches, les résultats sont montrés sur les figures suivantes.

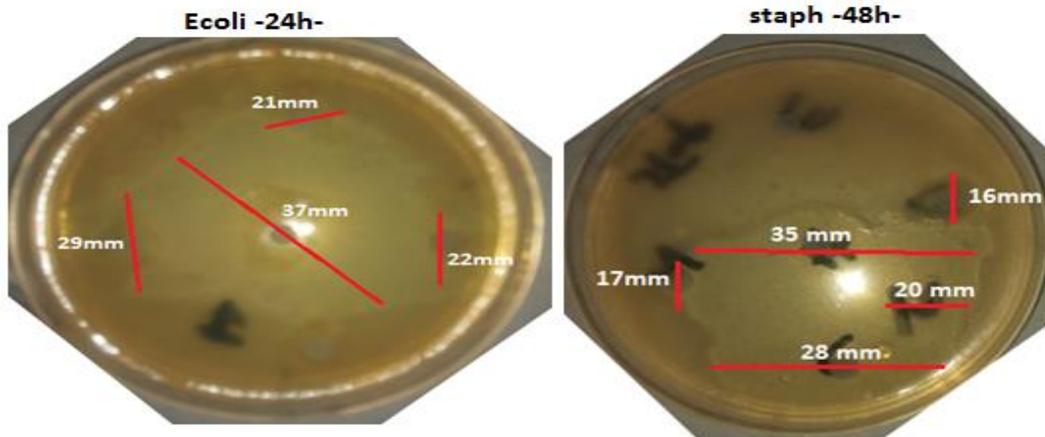


Figure 5.8: Diamètre d'inhibition obtenu pour l'Escherichia coli et staphylocoque.

Les résultats sont configurés dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 5.4: Diamètre (Cm) d'inhibition obtenu pour l'Escherichia coli et staphylocoque après 24H

	Escherichia coli					staphylocoque.				
	B	E	N	H	C	B	E	N	H	C
Ech 1	1.7	2,1	2,2	3.7	3.0	rien	rien	rien	3.5	rien

Tableau 5.5 : Diamètre (cm) d'inhibition obtenu pour l'Escherichia coli et staphylocoque après 48 H

	Escherichia coli					staphylocoque.				
	B	E	N	H	C	B	E	N	H	C
Ech 1	1,7	2,1	2,5	3.7	3	2	1,6	1,7	4,2	2,7

➤ Discussion

D'après le diamètre d'inhibition « D », on remarque que nos microparticules chargées d'eugénol représentent une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de E.coli avec le même diamètre d'inhibition de 2,1cm après 24 heures et 48 heures d'incubation. Le Blanc qui est la solution de libération (PH=1,2) a fait un diamètre de 1,7 cm après les deux périodes d'incubation. La solution d'eugénol non encapsulé a donné un diamètre de 2,2 cm pour 24 heures d'incubation et 2,5cm pour 48 heures incubation . La solution concentrée en eugénol a donné un diamètre de 3cm pour les deux périodes.

Pour le *Staphylocoques*, les diamètres d'inhibitions des échantillons après 24 heures d'incubations n'étaient pas visibles à part pour l'huile essentielle qui était de 3,5cm. Après 48 heures les diamètres d'inhibitions étaient de 1,6 ; 1,7 ; 2 ; 2,7 et 4,2 pour : la solution après libération, la solution non encapsulée, la solution pH, la solution concentrée en eugénol et l'huile essentielle du clou de girofle respectivement.

Ces résultats montrent que l'eugénol non encapsulé possède la même activité antibactérienne que celui encapsulé vis-à-vis des deux souches bactériennes en utilisant la même concentration.

Cependant l'huile essentielle du clou de girofle possède de meilleures activités bactéricides contre *E.coli* et *S.aureus* cela grâce à l'effet de synergie de tous les composants de l'huile essentielle (La somme de l'effet antibactérien de tous les constituants de l'huile essentielle et pas uniquement de l'eugénol)

Conclusion Générale

Conclusion Générale :

L'utilisation des plantes médicinales pour traiter et soigner les maladies infectieuses ne cesse de croître. L'isolement de principes actifs à partir de plantes a fait l'objet de plusieurs études.

La microencapsulation consiste en une insertion d'un principe actif dans une matrice polymérique .

Ce travail est une étude de la microencapsulation d'un principe actif extrait de l'huile essentielle du clou de girofle pour étudier l'activité biologique de celui-ci après sa libération de la matrice polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate. La microencapsulation par évaporation de solvant a été appliquée pour la protection de l'agent actif et l'amélioration des effets anti macrobiens après sa libération dans un milieu physiologique reconstitué à température contrôlée.

Pour cela, l'eugénol a été extrait à partir de l'huile essentielle de clou de girofle par une hydrodistillation classique suivie par une extraction liquide –liquide basée sur une propriété acido-basique.

Le rendement d'isolement de l'eugénol est varié selon plusieurs facteurs comme le procédé de l'extraction et la purification de matière végétale source.

La densité et l'indice de réfraction ont été déterminés pour identifier nos échantillons. La composition de l'huile essentielle a été étudiée par chromatographie sur couche mince La structure chimique de l'eugénol extrait a été identifiée par IRTF.

L'eugénol identifié a été encapsulé par évaporation par une émulsion (H/E). Les microparticules préparés ont été caractérisés par IRTF et microscopie optique .les microsphères réservées à nos principes actifs solides sont de type "matriciel" préparées selon la méthode de l'évaporation de solvant engageant comme matrice le PHBV qui est un polymère biocompatible et biodégradable et autres différents excipients utilisant en encapsulation (solvant ; tension active) .

Le relargage de principe actif encapsulé a été étudié à partir de microparticules préparées plongés dans un milieu d'étude agité au pH physiologique digestif (PH 1.2) et à une température de 37°C.

Les tests biologiques réalisés sur plusieurs souches bactériennes nous ont permis de vérifier le maintien de l'efficacité anti bactérienne de l'eugénol après l'encapsulation. Cependant les meilleurs diamètres d'inhibition ont été trouvés pour l'huile essentielle. Cela peut s'expliquer par l'effet de synergie de tous ses constituants.

Notre étude confirme qu'on peut utiliser la micro encapsulation d'un principe actif de source végétale pour une action ciblée antibactérienne mais avec des concentrations déterminées.

Étude prouve aussi que l'eugénol a une grande efficacité sur les souches bactériennes testées mais avec des concentrations considérables.

Nous recommandons d'approfondir l'étude de l'encapsulation et de la libération d'eugénol dans d'autres matrices polymériques et dans d'autres milieux physiologiques afin d'avoir de meilleurs effets antibactériens.

Références

1. Huiles essentielles Conseils pour les utiliser en toute sécurité ministère de l'économie française .
2. International Journal of PharmTech Research CODEN (USA): IJPRIF ISSN : 0974-4304 Vol.4, No.2, pp 637-642, April-June 2012
3. Les Huiles Essentielles Colloque GP3A - Tananarive 2-3 juillet 2009
4. M.F. Balandrin, J.A. Klocke, E.S. Wurtele and W.H. Bollinger, 'Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials', Science, Vol. 28, N°4704, pp. 1154 – 1159, 1985.
5. Revue des Energies Renouvelables Vol. 18 N°3 (2015) 513 – 528
6. Piochon, M., Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. 2008: ProQuest.
7. Lucchesi, M.-E., Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université de la Réunion.2005-10
8. Bassereau, M., A. Chaintreau, S. Duperrex, D. Joulain, H. Leijs, G. Loesing, N. Owen, A. Sherlock, C. Schippa, and P.-J. Thorel, GC-MS Quantification of suspected volatile
9. allergens in fragrances. 2. Data treatment strategies and method performances. Journal of agricultural and food chemistry, 2007. 55(1): p. 25-31
10. BENOUALI Djillali.. Extraction et identification des huiles essentielles.UNIVERSITE D'ORAN .2016 p. 8-9.
11. Lucchesi, M.E., F. Chemat, and J. Smadja, Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. Journal of Chromatography A, 2004. 1043(2): p. 323-327.
12. S. Burt, 'Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods– A Review', International Journal of Food Microbiology, Vol. 94, pp. 223 – 253, 2004
13. R.H. Olmedo, and V. Nepote and N.R. Grosso, 'Aguaribay and Cedron Essential Oils as Natural Antioxidants in Oil-Roasted and Salted Peanuts', Journal of the American Oil Chemists' Society, Vol. 89, N°12, pp. 2195 – 2205, 2012.
14. A. Lengani, L.F. Lompo, I.P. Guissou and J.B. Nikiema, 'Médecine Traditionnelle et Maladies des Reins au Burkina Faso', Néphrologie & Thérapeutique, Vol. 6, N°1, pp. 35 – 39, 2010.
15. P. Jenner, 'Oxidative Stress in Parkinson's Disease', Annals of Neurology, Vol. 53, N° Supplement 3, pp. S26 – S38, 2003.
16. P. Jenner, 'Oxidative Stress in Parkinson's Disease', Annals of Neurology, Vol. 53, N° Supplement 3, pp. S26 – S38, 2003.
17. S. Inouye et S. Abe, 'Nouvelle Approche de l'Aromathérapie Anti-Infectieuse', Phytothérapie, Vol. 5, pp. 2 - 4, 2007. (doi:10.1007/s10298-007-0200-3)
18. L. Ait M'barek, H. Ait Mouse, M. Tilaoui, A. Jaâfari, R. Abou Fatima, A. Chait and A. Ziyad, 'Anti-Tumor Properties of Blackseed (Nigella Sativa L.) Extracts', Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Vol. 40, N°11, pp. 839 – 847, 2007.
19. M.A. Randhawa and M.S. Alghamdi, 'Anticancer Activity of Nigella Sativa (Black Seed) - A Review', The American Journal of Chinese Medicine, Vol. 39, N°6, pp. 1075 – 1091, 2011.
20. A.C. Sousa, C.R. Gattass, D.S. Alviano, C.S. Alviano, A.F. Blank, and P.B. Alves, 'Melissa officinalis L. Essential Oil: Antitumoral and antioxidant Activities', Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 56, N°5, pp. 677 – 681, 2004.
21. These de doctoral - la qualite des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité – page 24 Présentée Le 4 Avril 2012 universite DE LORRAINE
22. Belaiche P. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. L'aromatogramme Tome I, Edition Maloine 1979.
23. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 1999, 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.

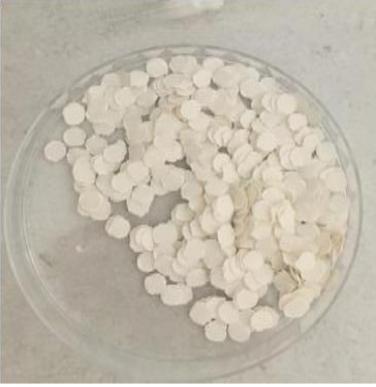
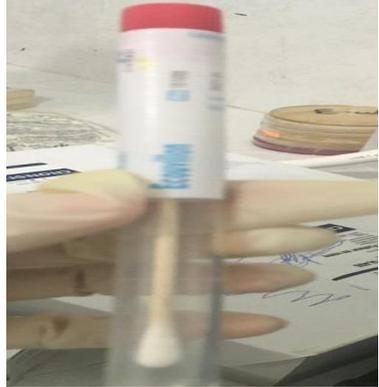
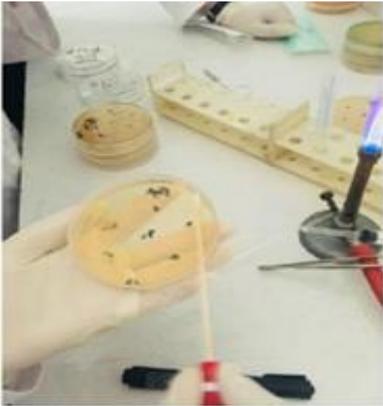
24. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils- A review. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 446-475.
25. Joulain D. Modern methodologies applied to the analysis of essential oil and other complex natural mixture: use and abuse, *Perfumer & Flavorist*, 1994; 19: 5-17.
26. Schwedt G. Méthodes d'analyse. 1993, Ed. Flammarion.
27. Caude M. et Jardy A. Méthodes chromatographiques. Base documentaire : Techniques d'analyse. 1996. Référence : P1445.
28. Audigie C.L., Dupon G. et Zongain F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, 1995, p. 44.
29. De Maack F. et Sablier M. Couplage chromatographiques avec la spectrométrie de masse. Bases documentaires, Techniques d'analyse. 1994. Référence: P2614.
30. Desjobert J. M., Bianchini A., Tommy P., Costa J. et Bernardini A. F. Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse.
31. 87. Paolini J. Caractérisation des huiles essentielles par cpg/ir, cpg/sm-(ie et ic) et rmn du carbone-13 de cistus albidus et de deux asteraceae endemiques de corse : eupatorium cannabinum subsp. corsicum et doricum corsicum. Thèse de doctorat. 2005
32. Audigie C.L., Dupon G. et Zongain F. Principes des méthodes d'analyse biochimique. T1, 2ème ED. Doin, Paris, 1995, p. 44.
33. Günther H., La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13 en chimie, Ed Masson, Paris, 1994.
34. Platzer N. Application de la RMN à la détermination des structures. Base Documentaire, Techniques d'analyse, Référence : P1092, 2002.
35. FRITZ R.,MARTIN F. Plantes venimeuses, vertus et dangers. Ed .Silva, Zurich. (1984)
36. Entretien téléphonique avec Mme Campana (pharmacienne chez le laboratoire Albert-vieille) et document non diffusable sur les normes qualité des huiles essentielles.
37. Norme ISO 47 20, 2002, Huiles essentielles-Nomenclatures.
38. ANSM (Agence Nationale de sécurité du médicament), Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles, 2008,
39. Bruneton J, Pharmacognosie, 4e édition, Edition Lavoisier, 2009.
40. Franchomme P, Jollois R, Pénoël D, L'aromathérapie exactement, Edition Roger Jollois, 2001
41. BOTNIEAU M. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs Paris : éd Tec&Doc ; 2010. p. 483-486.
42. SpiceAdvice. The History of spice [en ligne]. c1997-2015 [consulté le 19.09.14]. Disponible sur : <http://www.spiceadvice.com/history/index.html>
43. Couic-Marinier F., Lobstein A. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques* 2013; 52 (525) : 18-21.

44. PERRIER DE LA BÂTHIE H. Flore de Madagascar et des Comores, 152ème famille, Myrtacées. Paris : Firmin-Didot et Cie ; 1953. p. 1-2.
45. AMSHOFF GJH. Myrtacées. Paris : MNHN ; 1966. p. 3-4 ; 16.
46. DUPONT F, GUIGNARD JL. Botanique : les familles des plantes. 15e éd. Issy-les-Moulineaux : Elsevier Masson ; 2012. p. 16.
47. MINISTERE DE L'AGRICULTURE DE LA REPUBLIQUE DE MADAGASCAR. Giroflier [en ligne]. 2014 [consulté le 19.09.14]. Disponible sur : <http://www.agriculture.gov.mg/wp-content/uploads/2014/pdf/Giroflier.pdf>
48. Le giroflier de Madagascar : conditions de production et différentes utilisations. Thèse de chirurgie dentaire. Université de Nancy I ; 1985, 110 f.
49. AFSSAPS. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles : contribution pour l'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques contenant des huiles essentielles 2008 .
50. *Actualités Pharmaceutiques* Volume 56, numéro 569 , octobre 2017 , pages 59-61.
51. Composition de l'huile essentielle de clous de girofle de différentes provenances . Muchalal MUCHAMAD et Jean CROUZET Centre de Cénie et Technologie Alimentaire. Laboratoire de Biochimie Appliquée. U.S.T.L., place E.-Bataillon, 34060 Montpellier Cedex.

52. François Edmond. Giroflier et Girofle. In: *Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale*, 16^e année, bulletin n°180, août 1936. pp. 589-608.
53. Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives
Anees Ahmed Khalil, Ubaid ur Rahman, aMoazzam Rafiq Khan, Amna Sahar, Tariq Mehmoodacand Muneeb Khana P 02-03 © The Royal Society of Chemistry 2017.
54. C. Benchaar, S. Calsamiglia, A/V. Chaves, G.R. Fraser, D. Colombatto, T.A. McAllister. Plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. 2008, 14, 209–228.
55. Ali S, Prasad R, Mahmood A et al. Eugenol-rich Fraction of *Syzygium aromaticum* (clove) reverses biochemical and histopathological changes in liver cirrhosis and inhibits hepatic cell proliferation. *J Cancer Prev*. 2014;19(4):288-300.
56. Sung B, Prasad S, Yadav VR et al. Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals.
Nutr Cancer. 2012;64(2):173-97.
57. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology*. 2008, 46, 446–475.
58. Richard J., Benoît J.-P., *Microencapsulation, Techniques de l'Ingénieur, Traité génie des procédés*, J 2 210, 2000.
59. Boh, B., Sumiga, B., (2008) : *Microencapsulation Technology and its applications inilding construction materials*, *RMZ Materials and Geoenvironment*, Vol. 55, N°3,329-344.
60. Giraud S., *Microencapsulation d'un diisocyanate et d'un phosphated'ammonium - Application : élaboration d'un système polyuréthanemonocomposant à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile*, Thèse, Université Lille 1, 2002, p. 233.
61. Poncelet D ; pourquoi s'intéresser a la micro-et nanoencapsulation ; *Actes du séminaire Euro forum micro-et nanoencapsulation 22 et 23 mars 2000*.
62. Bouchemal K., Briancon S., Chaumont P., Fessi H., and Zydowicz N., (2003) : *Microencapsulation of dehydroepiandrosterone (DHEA) with poly(ortho ester) polymers by interfacial polycondensation* *Journal of Microencapsulation*, 20(5): p.637-651.
63. S.Sivapriya, P.A Daisy, G.boby Jhons, R.Praveen Raj, N.Thomas and B.carla, *Multiple emulsions a copregensive review*, 2016
64. Kadam N. R. and Suvarna V.: *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 5(47), 2015, 13-19.
65. *Les polymères issus du végétal : matériaux à propriété spécifiques pour des applications ciblées en industrie - Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006 10 (3), 185 – 196.
66. J.P.Mofokeng, A.S. Luyt, *Morphology and thermal degradation studies of melt-mixed poly(hydroxybutyrate-co-valerate) (PHBV)/poly(ε-caprolactone)(PCL) biodegradable polymer blend nanocomposites with TiO2 as filler*, *J. Mater. Sci.* 50 (2015) 3812–3824. z.
67. *Etude de la morphologie de nanobiocomposites de Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate)* Submitted on 6 Jun 2018 p 17 -38
68. Cf *Etude bibliographique – Partie 1 – section 1.2 Objectifs de l'encapsulation et domaines d'applications – Immobiliser ou isoler ; Matsuura et al., 2011*.
69. Bartkowiak A., Hunkeler D. *Alginate-oligochitosan microcapsules: a mechanistic study relating membrane and capsule properties to reaction conditions*, *Chem. Mater.*, 11, 2486–2492. 1999
70. Smith K.L., Herbig S.M.,. *Controlled release. Membrane Handbook*, 915–935. Springer US1992.
71. *Encapsulation et applications industrielles – actualité chimique*–page 27 - juin 2000
72. G. A. Ayoola*, F. M. Lawore1 *Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of Syzygium aromaticum (clove)* *African Journal of Microbiology Research*. Vol.(2) pp. 162-166, July, 2008.

ANNEXE I

- Matériels et produits utilisés pour le teste biologique :

		
Boites pétri	Disques en Papier buvable	écouvillon
		
Bec bunsen	Préparation de l'inoculum	Boites pétri coulée
		
Préparation écouvillon	Dépôt des disques en milieu de culture(MH)	Incubation à 37°C

ANNEXE II

Table 01 : Classification botanique de *Syzygium Aromaticum* [52]

Classification	
Famille	Myrtacées
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.)
Nom commun	Giroflier
Nom Anglais	Clouve buds
Nom Arabe	Kourounfol القرنفل
Synonymes	<i>Eugenia</i> <i>caryophyllus</i> E. <i>Cryophylla</i> Thumb.

ANNEXE III

Table 2 Eugenol occurrence and concentration in various plants^a [53]

Source	Specified parts	Concentration (mg g ⁻¹)
Clove	Flowers and buds	180
Clover pepper	Fruit	36
Betel pepper	Leaves	17.85
Cinnamon	Bark	3.52
Tulsi	Leaves	4.2–4.97
Bay	Leaves	1.34
Turmeric	Leaves and essential oil	2.1
Nutmeg	Seeds	0.32
Thyme	Shoots	0.021

ANNEXE IV

Rendement de HE de clous de girofle dans chaque source[51]

Echantillon	Origine	Rendement	Masse volumique
1	Comores	13,4 ‰	1,0584
2	Indonésie	4,1 ‰	1,0517
3	Madagascar	14,3 ‰	1,0728
4	Zanzibar	13,4 ‰	1,0559

ANNEXE V

Table 2. Zones of inhibition (mm) showing the antimicrobial activity of clove oil extract at various concentrations.

Test Organisms	COE	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	MIC mg/ml	Cip	Met
Gram +ve Bacteria														
concentrations.	890	445	222.5	111.3	55.61	27.81	13.91	6.95	3.48	1.74	0.87		0.005%	98%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	20	23	23	22	21	19	17	15	14	14	12	0.38	32	10
Gram -ve Bacteria														
<i>Enterobacter cloacae</i>	18	22	20	19	19	18	17	11	11	10	10	1.6	10	10
<i>Escherichia coli</i> isolate	18	23	23	20	20	17	15	13	12	10	10	1.63	10	10
<i>Escherichia coli</i> ATCC35218	18	21	20	20	20	18	16	14	14	13	13	0.23	33	12
<i>Citrobacter</i> spp.	18	24	19	18	17	17	14	14	14	12	11	0.73	22	12
<i>Salmonella paratyphi</i>	18	21	21	21	17	17	17	14	14	14	12	0.27	22	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	21	19	19	18	18	17	16	16	15	14	0.02	22	13

Résumé :

Le travail faisant l'objet de ce mémoire concerne l'extraction de l'eugénol et l'étude de sa libération à partir de microparticules préparées et caractérisées. L'eugénol a été encapsulé par évaporation de solvant engageant comme matrice le polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalérate (PHBV).

L'huile essentielle de clou de girofle extraite a été caractérisée par calcul de la densité à 20°C et la détermination de son indice de réfraction.

La détermination de ses composants a été étudiée par chromatographie sur couche mince (CCM).

L'eugénol a été extrait pour une simple extraction liquide-liquide de l'huile essentielle en utilisant le dichlorométhane.

Les microparticules préparées par évaporation de solvant ont été caractérisées par IRTF et par microscopie optique. D'après les résultats de ces techniques, les microsphères sont de morphologie sphérique, de taille différent et de taux d'encapsulation variable.

Le relargage de l'eugénol est réalisé à partir des microsphères de type "matriciel", qui sont plongées dans une solution de pH reconstitué de pH1,2 à T=37°C.

Une partie de notre travail, se concentre sur l'étude de l'activité antibiotique par la méthode de diffusion en milieu solide en utilisant des disques en cellulose, en utilisant deux souche bactériennes ; *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*. Cette étude confirme que la microencapsulation de l'eugénol peut être une méthode efficace pour l'inhibition des bactéries c'est la le rendement de encapsulation est agréable.

المخلص :

يتعلق عمل هذه الأطروحة باستخراج اوجينول ودراسة تحريره عن طريق جسيمات دقيقة معدة عن طريق التغليف باستعمال تقنية التغليف بالتبخير المذيب حيث استعمل البوليمر PHBV كغلاف للعنصر الفعال اوجينول .

الأوجينول المستخرج تمت تحديد خصائصه عن طريق حساب الكثافة في درجة الحرارة 20⁰م و تحديد قرينة إنكساره كذلك استعمال الكرماتوغرافي الطبقات الرقيقة و استعمال IRTF.

الجسيمات الدقيقة تمت معاينة خصائصها بواسطة IRTF و المكروسكوب الضوئي . حيث أظهر الجسيمات الدقيقة بشكل مرفولوجي كروي ذات اقطار مختلفة ومعدل تغليف متغير .

تم تحرير اوجينول المغلف من الكريات المجهرية "المصفوفة" بغمرها في قيم الأس الهيدروجيني (PH) المعد تكوينه عند درجة الحموضة 1.2 في درجة حرارة 37⁰م.

جزء من عملنا يركز على دراسة نشاط الأوجينول باستعمال طريقة نشر الأقراص مع نوعين من البكتيريا وهي *Staphylocoque*, *EscherichiaColi*. هذه الدراسة اثبتت ان تغليف الأوجينول يمكن ان يكون طريقة فعالة في تثبيط البكتيريا اذا كان مردود التغليف مقبول .

Abstract :

The work that is the subject of this thesis concerns the extraction of eugenol and the study of its release from microparticles prepared and characterized. The eugenol was encapsulated by evaporation of the solvent that binds the polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) as a matrix.

The clove essential oil extracted was characterized by calculating the density at 20 ° C and determining its refractive index.

The determination of its components has been studied by thin layer chromatography (TLC).

Eugenol was extracted for simple liquid-liquid extraction of the essential oil using dichloromethane.

The microparticles prepared by solvent evaporation were characterized by TFIR and optical microscopy. From the results of these techniques, the microspheres are of spherical morphology, of different size and variable encapsulation rate.

The eugenol is released from the "matrix" type microspheres, which are immersed in the reconstituted pH solution of pH1.2 at T = 37 ° C.

Part of our work, focuses on the study of antibiotic activity by solid-state diffusion method using cellulose disks, using two bacterial strain; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. This study confirms that the microencapsulation of eugenol can be an effective method for the inhibition of bacteria that is the encapsulation yield is pleasant