



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1

Faculté de technologie

Département de génie des procédés
Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de master

Option PHARMACIE INDUSTRIELLE

Thème

**Etude de la libération de l'huile essentielle
antiseptique chémotypée
thymol/carvacrol supportée sur un
matériau polymérique composite**

Présenté par :

Melle .KAÏBI Ahlem

Melle. BOUMEGOUAS Aya

Encadré par :

Mr. BOUTOUMI.Hocine

Melle .ABIR Chahrazed

Promotion 2024/2025

REMERCIEMENTS

Gloire soit rendu au Allah tout puissant créateur de toutes choses, le très miséricordieux pour tous ses bienfaits dont il m'a comblée et de m'avoir facilitée le chemin, et donner la persévérance pour réaliser ce modeste travail.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à notre chère promoteur, Monsieur BOUTOUMI Hocine, Professeur à la faculté de Technologie, pour son encadrement, sa confiance, sa patience, son soutien et disponibilité, et ses précieux, judicieux conseils, qui nous permis à bien mener ce travail. Nous sommes grandement reconnaissantes d'avoir pu bénéficier de votre expertise et votre savoir. Merci Monsieur pour votre confiance et vos encouragements, qu'Allah vous bénisse.

Mademoiselle la doctorante ABIR Chahrazed, Notre Co-promotrice doctorante au génie pharmaceutique malgré vos occupations diverses, vous avez été toujours disponible pour partager avec nous votre expérience, vos conseils, vos encouragements. Que grandissent la volonté et le pouvoir d'aider avec rigueur dans l'honnêteté dont vous faites preuve. Merci pour votre patience et pour votre contribution à ce travail.

Nous adressent un remerciement gracieux et chaleureux à notre enseignante et chef d'option madame professeur Hady Ziane Amel pour tous les efforts fournis afin de préserver la qualité de l'encadrement des étudiants de la spécialité pharmacie industrielle

Nous remercier s'adresse spécialement à madame professeur Zermane Faiza, Professeur Hady Sadouk Abdelkader, Professeur El Hattab Mohamed et le professeur Chanane Kamel pour la réalisation des analyses dans leur laboratoire respective.

J'adresse mes remerciements à Mr METTAI docteur en Botanique à la faculté des sciences naturelles pour son aide à l'identification botanique de la plante.

Mes remerciements vont à l'ensemble du personnel CRAPC ou l'analyse CG/SM a été effectuée,

Mes vifs remerciements à M^{elle} MEDJDOUB Ouafaa Doctorante au génie pharmaceutique pour son aide précieuse au niveau de laboratoire.

Aussi, Je voudrais bien adresser mes reconnaissances les plus sincères au corps professoral et administratif de l'université de Blida, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

DÉDICACES

À nos mères, qui ont œuvré pour notre réussite, par leur amour, leur soutien, tous les sacrifices consentis et leurs précieux conseils. Pour toute leur assistance et leur présence constante dans nos vies, recevez à travers ce travail, aussi modeste soit-il, l'expression de nos sentiments et de notre éternelle gratitude.

À nos pères, qui nous ont tout appris, pour les peines et les sacrifices qu'ils ont consentis afin de nous voir réussir. Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent que vous nous avez transmis.

À nos chers frères **Housseem, Hamza, Bilel , Amine et Rayan** et sœurs **Khouloud, Khaoula, Mirel, Ranim, Ikram et Khadidja** pour leur compréhension, leur encouragement, leur confiance et leur précieuse aide qui nous ont permis d'avancer. Ce travail est le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

À nos ami(e)s **Mellissa, Rekaya, Ikram, Ikram, Chaima, soumia ,manel** pour le soutien et la présence bienveillante dont ils ont fait preuve tout au long de ce parcours.

Enfin, nous adressons nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la concrétisation de ce mémoire.

تتناول هذه الدراسة تطوير خزانات مركبة قادرة على تخزين الزيوت الأساسية، لا سيما الزيوت المستخرجة من الأوريغانو بهدف إطلاق طويل الأمد. في هذا السياق، سمحت عملية التقطير المائي للأوريغانو بالحصول على زيت أساسي بعائد متوسط قدره 2.56%. وقد ساعدت عملية تحديد هذا الزيت باستخدام التحليل الغازي/الكتلي في التعرف على 29 مركبًا، منها المكونات الرئيسية بالترتيب الكارفاكرول (66.45%) يليه البي-سيمين (9.61%) ومن ثم جاما-تيربينين (8.16%). بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء دراسة حول تخزين هذا الزيت الأساسي على الكيتوسان المستخرج من قشرة الجمبري، والذي سيتم استخدامه لإنتاج الأغشية. وتمت عملية التوصيف بواسطة التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء، (DLS)، وانتشار الضوء الديناميكي (XRD). وتحليل حيود الأشعة السينية

تمتلك الزيوت الأساسية خصائص وظيفية فريدة، لكن حساسية هذه الزيوت للبيئة وقلة ذوبانها في الماء يحدّ من تطبيقاتها. واستخدمنا الجلوتارالدهيد وحمض (CS) في بوليمر الكيتوزان (HEO) ولذلك، قمنا بتغليف زيت الأوريغانو الأساسي HEO وقد تم تأكيد نجاح تغليف (HEO-CS) الماليك كعوامل تداخل لإنتاج كيتوزان قائم على زيت الأوريغانو الأساسي وأظهر ملف الإفراج في المختبر عند (FT-IR). من خلال التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء بتقنية تحويل فورييه OEO. إطلاقًا أوليًا سريعًا متبوعًا بإفراج ممتد لـ pH= 7.4

تم قياس النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية قبل وبعد الاحتواء باستخدام طريقة الانتشار في أقراص الأجار والآبار، وتم اختبار تأثيرات تثبيط النمو على الكائن الحي الدقيق إيجابي الجرام العنقودية الذهبية، والكائنات الدقيقة سلبية الجرام الإشريكية القولونية، وعلى الفطريات المعزولة مثل المبيضات البيضاء وأسبرغيلوس فلافوس. في الختام، يمتلك زيت الأوريغانو إمكانات جيدة ليتم تضمينه في الكيتوزان لصنع أفلام مضادة للبكتيريا في التطبيقات المستقبلية مثل ضمادات L، الجروح بسبب نشاطه البيولوجي العالي وثباته الممتاز عند احتوائه. الكلمات الرئيسية كيتوزان، أوريغانوم فولغار الاحتواء، النشاط المضاد للميكروبات، الإفراج المطول

الكلمات المفتاحية

. كيميائي، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، اختبار في المختبر، إطلاق مستدام

شيتوزان عطري، زيت فولغاراي. ل، وريغانوم أ

Abstract

This work focuses on the development of composite reservoirs suitable for storing essential oils, particularly essential oils extracted from oregano for prolonged release. In this context, the hydrodistillation of oregano yielded an essential oil with an average yield of 2.56%. The identification of this oil by GC/MS allowed for the identification of 29 compounds, the main constituents being: carvacrol (66.45%) followed by p-Cymene (9.61%) and then γ -Terpinene (8.16%). Furthermore, a study on the storage of this essential oil on chitosan, which is extracted from shrimp shells, will be used to produce membranes. Characterization was performed using infrared spectroscopy, X-ray diffraction (XRD), and dynamic light scattering (DLS). Essential oils have unique functional properties, but their sensitivity to the environment and low solubility in water limit their applications. We therefore encapsulated oregano essential oil (OEO) in chitosan polymer (CS) and used glutaraldehyde and maleic acid as crosslinking agents to produce chitosan based on oregano essential oil (OEO-CS). The success of the encapsulation of OEO was confirmed by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). The in vitro release profile at pH = 7.4 showed an initial rapid release followed by a prolonged release of OEO,

The antibacterial activity of the essential oil (EO) before and after encapsulation was measured using the agar disk diffusion and well methods. The growth inhibition effects were tested on the Gram-positive microorganism *Staphylococcus aureus*, on the Gram-negative microorganisms *Escherichia coli*, and against isolated fungi such as *Candida albicans* and *Aspergillus flavus*. In conclusion, the OEO has good potential to be incorporated into chitosan to manufacture antibacterial films for future applications such as wound dressings due to its strong biological activity and excellent stability when encapsulated.

Keywords: *Oreganum Vulgare*. L, Essential oil, chemotyped, chitosan, antioxidant activity, antimicrobial activity, in vitro test, sustained release.

RESUME

Le présent travail porte sur l'élaboration des réservoirs composites aptes à stocker les huiles essentielles, notamment les HEs extraites à partir d'origan en vue d'une libération prolongée.

Dans ce contexte l'hydrodistillation de l'origan a permis l'obtention d'une huile essentielle avec un rendement moyen de 2.56%. L'identification de cette huile par CG/SM a permis d'identifier 29 composés, dont les constituants majoritaires respectivement sont le carvacrol (66.45%) suivi par p-Cymène (9.61 %) puis γ -Terpinene (8.16%).

En outre, une étude sur le stockage de cette HE sur le chitosane qui extrait à partir de la carapace de crevette qui sera utilisé pour produire des membranes, la caractérisation a été effectuée par analyse spectroscopie infrarouge, la diffraction par rayons X (DRX), la diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Les huiles essentielles possèdent des propriétés fonctionnelles uniques, mais leur sensibilité à l'environnement et leur faible solubilité dans l'eau limitent leurs applications. Nous avons donc encapsulé l'huile essentielle d'origan dans le polymère du chitosane et utilisé du glutaraldéhyde et de l'acide maléique comme des agents de réticulation pour produire un chitosane à base d'huile essentielle d'origan. Le succès de l'encapsulation de l'HEO a été confirmé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Le profil de libération in vitro à pH = 7,4 a montré une libération initiale rapide suivie d'une libération prolongée de l'OEO. L'activité antibactérienne de l'HEO avant et après encapsulation a été mesurée à l'aide de la méthode de diffusion sur disque d'agar et de puits, les effets d'inhibition de la croissance ont été testés sur le micro-organisme Gram-positif *Staphylococcus aureus*, les micro-organismes Gram-négatifs *Escherichia coli*, et contre des champignons isolés tels que *Candida albicans* . et *Aspergillus flavus* En conclusion, l'OEO a un bon potentiel pour être incorporés dans le chitosane afin de fabriquer des films antibactérien dans les futures applications comme pensement de plaies en raison de sa forte activité biologique et de son excellente stabilité lorsqu'il est encapsulé.

Mots clés : *Origanum Vulgarae*. L, huile essentielle, chémotypée, chitosane, activité antioxydante, activité antimicrobienne, test in vitro, libération prolongée.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : <i>Origanum vulgare</i> . L.....	5
1.1 Description des plantes aromatiques et médicinales.....	4
1.1.1 Les plantes médicinales	4
1.1.2 Les plantes aromatiques	4
1.2 Définition des huiles essentielles.....	5
1.2.1Composition chimique des huiles essentielles	5
1.2.2Propriétés physicochimiques des huiles essentielles	5
1.2.3Méthodes d'extraction des huiles essentielles	7
1.2.4 Techniques d'analyse des huiles essentielles	10
1.2.5 Les constituants majeurs des HE d'Origan	10
1.2.6 Activité biologiques des huiles essentielles	12
1.3.1Description de la famille Lamiaceae	13
1.3.2Caractéristiques botaniques	14
1.3.3Habitats et culture	15
1.3.4Taxonomie du genre <i>Origanum</i>	15
Chapitre II : les polymères	4
II.1 - Généralités sur les polymères	17
II.2 Définition des polymères	17
II.3 Les biopolymères	18
II.4 Propriétés des biopolymères	18
II.5 Les polymères synthétiques.....	21
II.6 La chitine et le chitosane	21
II.6.1 La recherche s'intéresse de plus en plus à la chitine et ses dérivés	21
II.6.2 Les enjeux de l'étude	22
II.6.3 Les ressources pour la production de chitine.....	23
II.6.4 Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés	23
II.6.5 La chitine	24
II.6.6 Les caractéristiques biochimiques et physicochimiques de la chitine et ses dérivés.	24
II.7 Définition de chitosane	25
II.7.1 Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane.....	26
II.8 Les activités biologiques du chitosane.....	28
II.8.1 Activité antimicrobienne	28

II.8.2 L'activité cicatrisante	28
II.8.3 L'activité de chitooligosaccharides	28
Chapitre III : ENCAPSULATION DES HUILES ESSENTIELLES	18
Introduction	29
III.1 Définition des procédés d'encapsulation et stockage	29
III.2 Techniques d'encapsulation des huiles essentielles (HE)	30
III.2.1 Procédures chimiques	30
III.2.2 Procédures physico-chimiques	30
III.2.3 Procédures mécaniques	30
III.3.2 Séchage par pulvérisation	31
III.3.3 Expansion rapide des solutions supercritiques (RESS)	31
III.3.4 Encapsulation dans des liposomes	31
III.3.5 Nanoprécipitation	32
3.4 Le principe de la libération de principe actif	32
III.5 L'encapsulation et ses avantages	33
III.6 Encapsulation dans des particules polymères	33
III.7 Domaine d'application	34
III.8 L'anatomie et la physiologie de la peau	34
III.9 PATCH TRANSDERMIQUE	35
III.10 Mécanisme d'absorption d'un patch	35
III.11 Composition d'un patch	37
CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES	30
IV.1 Extraction de l'huile essentielle d'origan	39
IV.1.1 Matériel végétale	39
IV.2 Matière première d'extraction du chitosane	39
IV.3.3 Souches bactériennes	43
IV.4.1 Procédés d'extraction	44
IV.4.2 Rendement de l'extraction	44
IV.4.3 Etude de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle	45
IV.5 Caractérisation de l'huile essentielle d' <i>O. Vulgarae</i> .L	45
IV.5.1 Caractéristiques organoleptiques	45
IV.6 Analyses chromatographique et méthodes spectroscopiques	48
IV.6.1 Analyse chromatographique CG-SM d'huile essentielle d'origan	48
IV.6.2 Analyse par UV-Visible	50

IV.6.3 Analyse par FTR-IRFT	50
IV.7 Extraction du chitosane à partir de des carapaces	51
IV.7.1 Prétraitement de la carapace	51
IV.7.2 La déminéralisation.....	51
IV.7.4 Blanchiment.....	52
IV.7.5 Désacétylation la chitine en chitosane	52
IV.8 Cratérisation du chitosane	54
IV.8.1 Observation au microscope optique du chitosane :	54
IV.8.2 Analyse par spectroscopie Infra- rouge FTR du chitosan	54
IV.8.3 Solubilité	54
IV.8.4 Poids moléculaire du chitosan	54
IV.8.5 La Diffraction par rayons X (DRX).....	55
IV.8.6 La diffusion dynamique de la lumière (DLS)	56
IV.9 Activités biologiques.....	57
IV.9.2 Activité antibactérienne	58
IV.9.3 Évaluation de l'activité antifongique in vitro	62
IV.10 Protocole des membranes	63
IV.10.1 L'activité antimicrobienne de membranes synthétisées	63
IV.10.2 Activité antifongique des membranes	64
IV.10.3 Infra- rouge ATR	64
IV.10.4 Etude de la libération prolongée d'huile.....	64
CHAPITRE V : Résultats et discussions.....	40
V.1 Extraction et rendement en huile essentielle.....	67
V.2 Caractérisation de l'huile essentielle.....	68
V.2.1 Caractéristiques organoleptiques	68
V.2.2 Caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle	68
V.3 Analyses chromatographiques et spectroscopiques d'HE d'origan	69
V.3.1 Caractérisation par CG/SM	69
V.3.2 Caractérisation par UV-visible.....	71
V.3.3 Caractérisation par ATR-IRFT	71
V.4 Activité biologique	72
V.4.1 L'activité antioxydant	72
V.5 Caractérisation du chitosane.....	78
V.5.1 Etude de la solubilité du chitosane	78

V.5.2 Spectroscopie FTIR de défirant chitosane.....	79
V.5.3 Poids moléculaire	81
V.5.4 Analyse par la diffusion dynamique de la lumière DLS.....	82
V.5.6 Diffraction des rayons x Analyse par DRX.	83
V.6 Caractérisation des membranes synthétisées.....	85
V.6.2 activité biologique	88
V.6.2.1 Activité antibactérienne des membranes synthétisées.....	88
V.6.2.2 activité antifongique des membranes synthétisées.	89
V.6.3 Cinétique de la libération	90
CONCLUSION GENERALE.....	93
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	68

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	7
Figure 2 : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau.....	8
Figure 3 Quelques structures de substances majeures rencontrées dans les HE d'Origan.[25]	11
Figure 4 : Quelques structures de monoterpènes acycliques rencontrées dans les HE d'Origan	11
Figure 5 : Rameau de l'Origanum vulgare L.....	15
Figure 6 : Modèle schématisé de la synthèse d'un polymère.	18
Figure 7 : Evaluation du nombre de publication par année traitant de « chitine » ou « chitosane ».....	22
Figure 8 : Structure de chitine en 3D	24
Figure 9 : Représentation idéale de la chitine et son dérivé obtenu par désacétylation, le chitosane. ..	25
Figure 10 : Mécanisme de réparation par propagation de fracture mécanique.	32
Figure 11 : Principe de libération prolongée par diffusion (gauche) et par érosion (droite)	33
Figure 12 : Structure de la peau.....	35
Figure 13 : Mécanisme d'absorption d'un patch par la peau.....	37
Figure 14 : Structure des systèmes thérapeutiques transdermiques actuels.	38
Figure 15 : Observation microscopique d'Escherichia coli.....	41
Figure 16 : Observation microscopique de Staphylococcus aureus.....	41
Figure 17 : Observation microscopique de Klebsiella spp.	42
Figure 18 : Montage légendé d'extraction de type Clevenger.	44
Figure 19 : Figure 19 (a) Pycnomètre vide (b) pycnomètre rempli d'eau distillé (c) pycnomètre rempli d'HE.....	46
Figure 20 : Réfractomètre CARL ZEISS JENA.....	47
Figure 21 : Spectromètre de masse CG-SM.	49
Figure 22 : Spectrophotomètre type SHIMADZU.....	50
Figure 23 : Spectrophotomètre de marque FTIR- 8900 shimadzu.....	51
Figure 24 : Transformation de la chitine en chitosane.	52
Figure 25 : Procédé d'extraction de la chitine et du chitosane.	53
Figure 26 : Rhéomètre de type Anton Paar (MCR 302).....	55
Figure 27 : Diffraction par rayons X.....	55
Figure 28 : La diffusion dynamique de la lumière de marque HORIBA.	57
Figure 29 : Représentation schématisée de l'activité antioxydante de l'HE avec le DPPH.	58
Figure 30 : Schéma représentant les différentes étapes de réalisation de l'aromatogramme.	60
Figure 31 : Illustration de la lecture du résultat de l'aromatogramme. A Méthode de puits, B Méthode de disques.....	61
Figure 32 : Spectrophotomètre ATR-IRFT.	64
Figure 33 : La cellule de diffusion de FRANZ utilisée dans ce travail.....	65
Figure 34 : Variation de rendement d'extraction en fonction de temps.	67
Figure 35 : chromatogramme CG-MS de l'huile essentielle Origanum Vulgarae .L	69
Figure 36 : Constituants de l'huile essentielle d'Origanum vulgare. L.	71
Figure 37 : Spectre UV-Visible de l'huile essentielle de l'O Vulgarae. L	71
Figure 38 : Spectre infrarouge de l'huile essentielle d'origan vulgare. L	72
Figure 39 : Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'HE.....	73

Figure 40 : Courbe représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de concentration de BHT.	73
Figure 41 : Histogramme de l'activité antioxydante de BHT et de HEO.	74
Figure 42 : Activité de l'HE contre pseudomonase aureues.	75
Figure 43 : Activité de l'HE contre Enterococcus faecalis.	75
Figure 44 : Activité de l'HE contre Escherichia coli.	75
Figure 45 : Activité de l'HE contre condidas albicans.	77
Figure 46 : Activité de l'HE contre condidas glabrata.	77
Figure 47 : Micrographe de chitosane :a) microscope polarisant b) microscope stéréoscope.	78
Figure 48 : Solubilité de chitosane.	79
Figure 49 : Spectre IRTF du chitosane Fisher scientifique.	79
Figure 50 : Spectre IR du chitosane crevette.	80
Figure 51 : Courbe de viscosité en fonction du poids moléculaire.	81
Figure 52 : Distribution de potentiel zêta du chitosane fisher scientifique.	82
Figure 53 : Distribution de potentiel zêta du chitosane crevette.	82
Figure 54 : Distribution de potentiel zêta du chitosane granulé.	83
Figure 55 : Diffractogramme du chitosane crevette.	83
Figure 56 : Diffractogramme du chitosane Fisher scientifique.	84
Figure 57 : Membranes du chitosane :a) réticulé avec acide maléique,b) réticulé avec glutaraldhéyde...	85
Figure 58 : Membrane du chitosane crevette.	85
Figure 59 : Spectre ATR membrane de chitosane :a) plastifiée,b) placebo	86
Figure 60 : Membrane avec huile essentielle organ vulgarae .Lsans agent réticulant.	86
Figure 62 : Membranes du chitosane et huile essentielle avec l'acide maléique.	87
Figure 63 : Activité des membranes contre certaine bactéries.	88
Figure 64 : Activité antifongique des membranes synthétisées.	89
Figure 65 : La cellule de diffusion de FRANZ	90
Figure 66 : Profils de libération de membrane réticulée avec l'acide maléique.	90
Figure 67 : Libération prolonge in vitro de membrane réticulée avec le l'acide maléique en fonction de temps.	91
Figure 68 : Différents profils de libération de membranes réticulée avec glutaraldehyde.	91
Figure 69 : La libération prolonge in vitro de membrane réticulée avec le glutaraldehyde en fonction de temps.	91
Figure 70 : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration de HEO	92

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau détaillant les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles et leurs techniques de détermination.	6
Tableau 2 : Tableau démontrant les avantages et désavantages des différentes méthodes	9
Tableau 3 : Nomenclature des composés volatils selon IUPAC.	12
Tableau 4 : Dénominations collectifs donnés à l'espèce <i>Origanum vulgare</i> L. dans différentes langues officielles nationales et régionales d'après.....	15
Tableau 5 : Section d' <i>Origanum vulgare</i> L.....	16
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des nanoparticules polymériques formulées à partir de différents polymères pour une administration ciblée de médicaments.	20
Tableau 7 : Domaine d'application des différentes méthodes d'encapsulation dans l'industrie alimentaire.	34
Tableau 8 : Souche bactériennes utilisées.	43
Tableau 9 : Classification les zones d'inhibitions	60
Tableau 10 : Représentation de dilution d'huile essentielle.	62
Tableau 11 : Les caractéristiques organoleptiques de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> L.	68
Tableau 12 : Caractérisation physico-chimique d'HEO	68
Tableau 13 : Compositions chimiques de l'HE d' <i>Origanum Vulgare</i> L.	69
Tableau 14 : L'activité antioxydante du radical DPPH par l'HE d' <i>O.vulgare</i> L et le BHT.	73
Tableau 15 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antibactérienne CMI.	76
Tableau 16 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antifongique d'HE.	77
Tableau 17 : Caractéristiques physico-chimiques des deux chitosanes.	80
Tableau 18 : Comparaison entre chitosane crevette et fisher scientifique par DRX.....	84
Tableau 19 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antibactérienne des membranes.	88
Tableau 20 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antifongique des membranes.	89

LISTE DES ABREVIATIONS

- ATCC** : American Type Collection Culture
- AFNOR** : Association Française de Normalisation
- ATR** : Attenuated total reflectance (Réflectance totale atténuée).
- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- ADEME** : Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie.
- ARN** : Acide ribonucléique.
- BHT** : L'hydroxytoluène butylé ou 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol
- CG.MS** : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- CLHP** : chromatographie liquide à haute performance
- DPPH** : 1,1- Diphényl-2-picryl-hydrazyle
- DMSO** : Diméthyl sulfoxyde
- DD**: degré de désacétylation
- DRX** : la diffraction par rayons X
- DLS** : la diffusion dynamique de la lumière
- FTIR** : La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
- GLT** : glutarhaldehyde
- GN** : gélose nutritive
- HE** : Huile essentielle.
- HEO** : Huile essentielle d'origan vulgare.
- I_A**: Indice d'acide.
- Is**: Indice de saponification
- IR** : Spectroscopie infra rouge.
- MA** : Acide maléique
- ME** : chitosane/HE
- O. *vulgare*** : Origan vulgare.
- PHA** : Polyhydroxyalcanoates.
- Rdt** : Rendement.

INTRODUCTION GENERALE

Les huiles essentielles constituent un arsenal thérapeutique très important mais leur utilisation est souvent soumise à des contraintes limitant ainsi leurs utilisations à grande échelle comme médicament.

La peau est le plus grand organe du corps humain et sa fonction principale est de protéger contre les agents extérieurs tels que les bactéries, les produits chimiques et les différentes températures. C'est pourquoi la peau est très sensible aux agressions extérieures. Malgré ses remarquables propriétés régénératrices, le processus de cicatrisation de la peau est parfois entravé, ce qui peut même conduire à des plaies chroniques, dues au diabète ou à des escarres, par exemple [1]. Bien qu'il s'agisse d'un problème permanent, il existe très peu de traitements capables d'améliorer le processus de cicatrisation des plaies tels que les formes posologiques orales conventionnelles exigent que de nombreuses doses soient administrées à certains intervalles et dans des quantités spécifiques pour que le traitement soit efficace[2]. L'administration de plusieurs médicaments présente plusieurs inconvénients, tels qu'une administration inconfortable, le risque de surdosage si le médicament est administré avant l'intervalle de temps, une mauvaise observance du patient, des patients qui sautent des doses et des changements dans les niveaux plasmatiques du médicament [2]. Il est donc nécessaire de trouver des solutions alternatives pour accélérer la cicatrisation des plaies, combinées à des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires [1].

Les systèmes d'administration transdermique de médicaments sont créés pour éviter ces problèmes [2].

Depuis le début du XXIème siècle, dans un contexte de retour à la naturalité, l'utilisation des huiles essentielles HE dans le domaine de la santé est devenue de plus en plus populaire au fil des ans. Les HE se sont fait une place dans la thérapeutique moderne grâce à leur forte concentration en molécules actives leur conférant de nombreuses propriétés thérapeutiques permettant de prendre en charge une grande variété de pathologies courantes [3].

C'est dans ce cadre que l'utilisation des HE peut représenter une alternative naturelle et efficace pour prendre en charge certaines pathologies dermatologiques bénignes [3].

Les huiles essentielles (HE) sont des liquides huileux aromatiques et volatils obtenus à partir de plantes [4]. Elles sont extraites d'herbes ou d'épices et sont des sources de composés biologiques actifs, tels que les terpénoïdes et les acides phénoliques [5]. De nombreux types

d'huiles essentielles sont connus pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques sont connues pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, antioxydantes et de modulation biologique [4].

Parmi la grande variété d'huiles essentielles, l'huile essentielle d'origan (OEO) d'*Origanum vulgare*. L est bien connue pour ses activités antioxydantes et antimicrobiennes. Ces activités sont probablement dues à la présence de carvacrol et de thym [4].

Il est difficile d'utiliser les huiles essentielles en milieu aqueux car elles sont généralement très volatiles à température ambiante, facilement oxydables lorsqu'elles sont exposées à l'oxygène et à la lumière, et surtout très lipophiles [6].

la formulation de médicaments et la préparation de films antimicrobiens, en raison de l'exposition directe à la chaleur, à la pression, à la lumière ou à l'oxygène [4]. Afin de surmonter la susceptibilité et d'améliorer la stabilité des OEO pendant la transformation et le stockage, de nombreuses méthodes ont déjà été développées par différentes méthodes d'encapsulation [4].

Le processus d'encapsulation offre plusieurs avantages aux huiles essentielles, tels que la protection et la stabilité des volatiles libérés et le stockage, qui peuvent être appliqués aux produits textiles, aux pesticides, aux produits pharmaceutiques, aux cosmétiques et aux aliments [5].

Une attention particulière a été accordée à la recherche d'un support inerte dans lequel le médicament est dispersé ou incorporé. Récemment, la préparation, la caractérisation et l'application de systèmes de libération contrôlée de médicaments préparés à partir de composés biopolymères sont devenues populaires en raison de leurs propriétés distinctives, telles qu'une grande efficacité d'encapsulation, la biodégradabilité, la non-toxicité et les caractéristiques de libération contrôlée [6].

Les biopolymères sont largement utilisés en raison de leur faible impact en termes de pollution sont obtenus à partir de ressources naturelles ou de sous-produits. Ces matériaux sont biodégradables, biocompatibles, respectueux de l'environnement et largement disponibles ; ils sont associés à de faibles coûts de production et possèdent un potentiel antimicrobien inhérent [1].

Parmi les biopolymères, les polysaccharides sont les plus importants dans les applications liées à la santé en raison de leur large activité biologique. Ils sont présents dans différentes configurations fibres, membranes, hydrogels, capsules, nanostructures, micelles, etc. [1]

Le chitosane CHT, un polysaccharide cationique naturel composé de (1,4) -2-amino-2-désoxy- β -dglucan, est la forme partiellement ou totalement désacétylée de la chitine. En outre, le CHT continue de jouer un rôle important dans la recherche biomédicale en raison de ses propriétés biologiques, telles que la biocompatibilité ou la biodégradabilité, ainsi que de sa capacité antimicrobienne, de son potentiel antioxydant, de sa faible toxicité et de sa capacité à accélérer la régénération dermique. En raison de ces caractéristiques, ce polymère est l'un des plus utilisés pour la synthèse d'hydrogels et de membranes et dans d'autres applications pour la libération contrôlée de médicaments ou l'ingénierie tissulaire [1].

Ce travail est divisé en deux parties principales, une partie bibliographique qui se compose de trois chapitres, le premier chapitre concerne la plante *d'Origanum Vulgarae*.L, le deuxième chapitre sur les polymères, et le troisième chapitre sur l'encapsulation des huiles essentielles.

une partie expérimentale qui contient deux chapitre le quatrième chapitre traite les matériels utilisés et les méthodes adoptées dans les différentes études ; et le dernier chapitre est consacré à l'analyse des résultats expérimentaux ainsi leurs discussions.

PARTIE BIBLIOGRAPHYQUE

CHAPITRE I : *Origanum vulgare*. L

Introduction

Dans ce chapitre, cette étude est consacrée à la présentation d'origan afin de mettre en évidence ses caractéristiques botaniques, la composition chimique de son huile essentielle et aussi les différentes activités biologiques de cette dernière.

Une grande variété de plantes aromatique est connue et appréciées pour leur teneur en huiles essentielles HEs qui sont des mélanges complexes de composés volatils. Les espèces d'origan sont parmi les plus répandues. L'origan est le nom utilisé pour désigner une grande variété de plantes qui possèdent une saveur et une odeur particulière [7]. Au minimum, 61 espèces et 17 genres appartenant à six familles botaniques différentes sont connus sous le nom d'origan. Au sein de la famille des Lamiacées se trouvent les plantes appartenant aux genres *Origanum* [8]. En outre, Il existe des données indiquant que les huiles essentielles d'origan (HEO) pourraient exercer des effets positifs sur la santé humaine.

1.1 Description des plantes aromatiques et médicinales.

1.1.1 Les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des plantes utilisées pour leurs bienfaits sur la santé humaine. Ces plantes, connues depuis le Moyen Âge sous le nom de « médecine médiévale », sont aujourd'hui intégrées dans la phytothérapie traditionnelle ou moderne. Elles peuvent également être utilisées à des fins alimentaires ou condimentaires ou pour la préparation de boissons hygiéniques.

L'usage des plantes médicinales repose, entre autres, sur la théorie des signatures, systématisée au XIV^e siècle, qui permettait de relier certaines plantes à des guérisons spécifiques par analogie. Cette théorie a été remise en question au XVII^e siècle et abandonnée au XVIII^e siècle [9].

Les plantes médicinales sont définies comme des drogues végétales dans la pharmacopée européenne, et leurs différentes parties peuvent avoir des usages médicaux distincts. Bien que la pharmacologie moderne ait progressé, l'usage thérapeutique des plantes médicinales reste courant, notamment dans les pays en développement [10].

1.1.2 Les plantes aromatiques

Une plante aromatique est une plante qui contient un ou plusieurs de ses organes végétaux, des huiles aromatique volatile sous sa forme libre ou sous une forme transformé ou dégradé en huile aromatique à odeur raisonnable, elles sont extraites par des méthodes conventionnelles [10].

1.2 Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes qui sont généralement formés de nombreux constituants, généralement liquides, mais parfois solides, ses substances peuvent être trouvées dans les plantes et sont très volatiles, ce qui signifie qu'elles peuvent être facilement isolées par distillation à la vapeur. Ils ont une faible densité, à l'exception de certaines huiles telles que les huiles de cannelle, de clou de girofle et de saffron, qui sont plus denses que l'eau. Ces huiles ont une faible solubilité dans l'eau mais sont solubles dans la plupart des solvants organiques courants, y compris l'éthanol et l'éther diéthylique, et se mélangent bien avec les huiles végétales, les graisses et les cires [12].

1.2.1 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés organiques qui sont produits par diverses structures dans les plantes, les structures et caractéristiques spécifiques variant considérablement. Ces huiles se trouvent généralement dans les poils sécrétoires, les cellules épidermiques, les cellules sécrétoires internes et les poches sécrétoires de la plante. Les huiles sont constituées de composés volatils à faible poids moléculaire et à haute pression de vapeur à température ambiante. Les huiles essentielles contiennent une grande variété de classes chimiques, telles que les alcools, les éthers ou les oxydes, les aldéhydes, les cétones, les esters, les amines, les amides, les phénols, les hétérocycles et principalement les terpènes. Les terpènes sont le plus grand groupe de composés trouvés dans les huiles essentielles et sont responsables de bon nombre des arômes et saveurs caractéristiques de ces huiles [13].

1.2.2 Propriétés physicochimiques des huiles essentielles

L'analyse physico-chimique des huiles essentielles implique la mesure de diverses propriétés physiques et chimiques. Ces propriétés fournissent des informations précieuses sur la pureté, la qualité et la stabilité des huiles essentielles, ainsi que sur leurs applications potentielles dans diverses industries, ça implique notamment [14].

- **La densité :** La densité d'une huile essentielle peut fournir des informations sur sa pureté et sa concentration, ainsi que sur son adéquation à différentes applications [14].
- **L'indice de réfraction :** c'est une propriété physique importante utilisée pour déterminer la qualité et la pureté des huiles essentielles. Cette propriété est liée à la concentration de l'huile essentielle et à sa capacité à dévier la lumière [14].

- **La rotation optique** : une propriété physique clé qui est liée à la façon dont la lumière est tournée lorsqu'elle traverse l'HE. Le degré de rotation peut fournir des informations sur la concentration de l'HE, ainsi que sur ses propriétés thérapeutiques potentielles [14].
- **La composition chimique** : c'est un autre aspect important de l'analyse physico-chimique des huiles essentielles. Cette analyse passe par l'identification et la quantification des différents composés présents dans l'huile essentielle. La chromatographie en phase gazeuse, la spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire sont quelques-unes des techniques analytiques utilisées pour identifier et quantifier les composés présents dans les huiles essentielles [14].

Tableau 1 : Tableau détaillant les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles et leurs techniques de détermination.

Physico-Chimique	Technique d'analyse
Densité	Hydromètre, pycnomètre, densitomètre
Indice de réfraction	Réfractomètre
Rotation optique	Polarimètre
Composition chimique	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS), spectroscopie infrarouge (IR).
Point d'ébullition	Distillation
Viscosité	Viscosimètre, rhéomètre
pH	pH-mètre
Solubilité	Essais de solubilité

1.2.3 Méthodes d'extraction des huiles essentielles

Le processus d'extraction des huiles essentielles varie en fonction des caractéristiques souhaitées et des composants nécessaires à l'extrait botanique. La qualité des huiles essentielles est principalement déterminée par la méthode d'extraction utilisée. Les techniques d'extraction peuvent être divisées en deux catégories : les méthodes classiques (Distillation, Expression, Enfleurage, Incision ou plus avancées) et les méthodes innovantes (extraction sous irradiation micro-ondes ou par ultra-sons), qui ont été développées pour augmenter l'efficacité du processus d'extraction en réduisant le temps nécessaire à l'isolement de l'HE, en augmentant le rendement [15].

- ✓ **L'hydrodistillation** : repose sur le principe de distillation azéotropique. Sous l'effet de la pression atmosphérique et lors de la phase d'extraction (chauffage), les molécules d'eau et les huiles essentielles créent un mélange hétérogène qui atteint son point d'ébullition à une température relativement basse, d'environ 100 °C. En revanche, le point d'ébullition des composants des huiles essentielles est nettement plus élevé. Par la suite, le mélange HE/eau est distillé simultanément. Cette technique est généralement employée lorsque les composants chimiques des huiles essentielles résistent à la chaleur. Elle est également utilisée pour l'extraction des huiles à partir de feuilles et de fleurs, qu'elles soient fraîches ou séchées, et dans ce contexte, un dispositif Clevenger est employé [16].

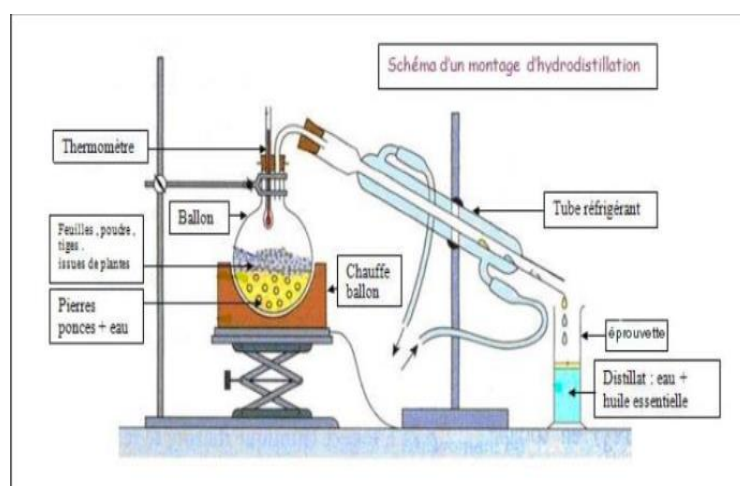


Figure 1 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation

- ✓ **Entrainement à la vapeur d'eau** : le matériel végétal n'est pas en contact direct avec l'eau, il est soutenu par une grille ou une plaque trouée positionnée à une distance appropriée du fond de l'alambic rempli d'eau. Sous l'effet de la chaleur, l'eau se

transforme en vapeur et traverse les plantes, entraînant avec elle des molécules aromatiques vers un dispositif de refroidissement. La vapeur d'eau contenant ainsi de l'essence se transforme en état liquide par condensation. Ainsi, le processus de distillation produit une séparation en deux phases distinctes l'huile et l'eau condensée, également connue sous le nom d'eau florale ou d'hydrolat. [17]

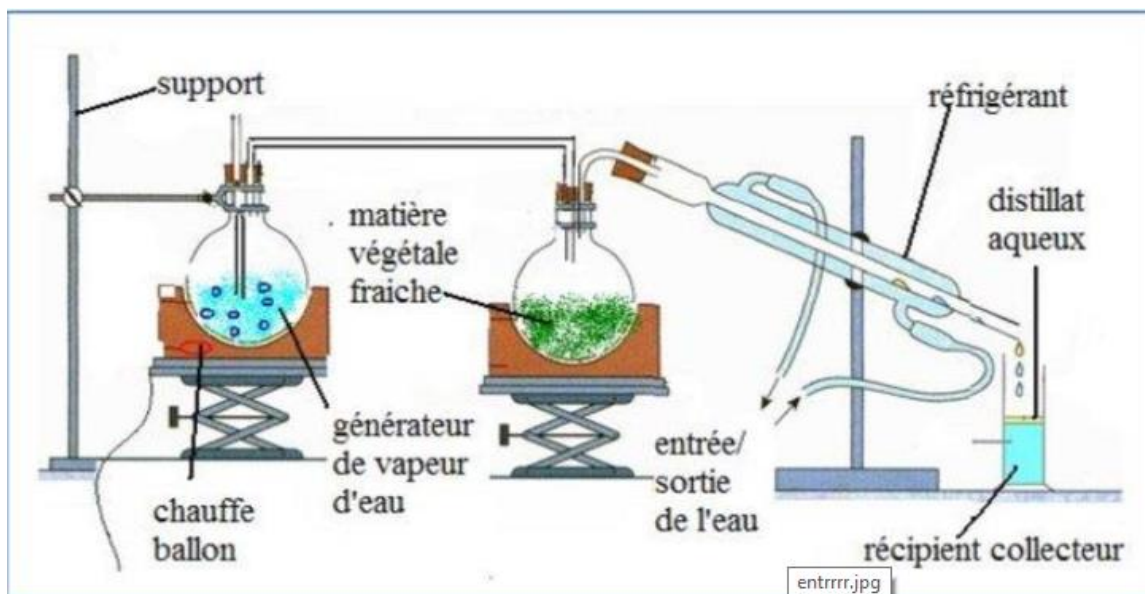


Figure 2 : Montage d'entrainement à la vapeur d'eau.

- ✓ **Extraction par solvant :** L'extraction par solvant, dans le sens classique du terme, consiste à mettre de la matière végétale en contact avec un solvant, généralement volatil et ayant une affinité avec l'huile essentielle, dans un extracteur. La matière végétale, chargée dans l'extracteur, est épuisée par lavages successifs par le solvant approprié pendant une durée déterminée [18].
- ✓ **Extraction par fluide supercritique :** L'originalité de la technique d'extraction par fluide supercritique, dite SFE, provient de l'utilisation de solvants dans leur état supercritique, c'est-à-dire dans des conditions de températures et de pressions où le solvant se trouve dans un état intermédiaire aux phases liquide et gazeuse et présente des propriétés physico-chimiques différentes, notamment un pouvoir de solvation accru. Si, en pratique, de nombreux solvants peuvent être employés, 90% des SFE sont réalisées avec le dioxyde de carbone (CO₂), principalement pour des raisons pratiques. En plus de sa facilité d'obtention due à ses pression et température critiques relativement basses, le CO₂ est relativement non toxique, disponible à haute pureté et à faible prix, et il possède l'avantage d'être éliminé aisément de l'extract [19].

- ✓ **Extraction assistée par ultrasons** : L'extraction assistée par ultrasons est un nouveau procédé d'extraction permettant d'extraire des molécules de faibles poids moléculaires [20]. Dans les secteurs agroalimentaire et pharmaceutique, les ultrasons permettent l'extraction de composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les huiles essentielles, les polysaccharides et les esters. Cette technologie s'est développée jusqu'au niveau industriel. En effet, les traitements par ultrasons améliorent l'extraction des composés phénoliques des végétaux [21,22].

Tableau 2 : Tableau démontrant les avantages et désavantages des différentes méthodes

D'extraction des huiles essentielles [23].

Méthode d'extraction	Avantages	Désavantages
Distillation à la Vapeur	- Extraction efficace de la plupart des huiles essentielles. - Huile de haute qualité. - Peut être utilisé avec une variété de matières végétales.	- Ne convient pas aux huiles délicates ou sensibles à la chaleur - Temps d'extraction long - Consommation d'énergie élevée.
Hydrodistillation	- Convient aux huiles sensibles à la chaleur. - Procédé relativement simple et peu coûteux. - Peut extraire une large gamme d'huiles.	- Temps d'extraction long. - Nécessite une grande quantité de matériel végétal.
Extraction par solvant	- Rendement élevé d'huiles essentielles. - Temps d'extraction court.	- Nécessite l'utilisation de solvants, qui peuvent être nocifs. - Huile de mauvaise qualité.
Extraction par fluide Supercritique	- Efficacité d'extraction élevée. - Sélectivité pour les composés cibles. - Résidu de solvant minimal. - Conditions d'extraction douces.	- Équipement coûteux. - Évolutivité limitée. - Exigences de pression et de température élevées.

Extraction assistée par Ultrasons	- Efficacité d'extraction élevée. - Temps d'extraction réduit. - Faible consommation d'énergie.	- Limité à l'extraction à petite échelle. - Potentiel de dégradation des composés thermosensibles.
--	---	---

1.2.4 Techniques d'analyse des huiles essentielles

L'analyse des **HEs** consiste à l'identification et à la détermination de la teneur des différents composés constituant une essence ; c'est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques, classiques et modernes, sont utilisées pour l'analyse des HEs produites, on distingue

1.7.1 La chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Chromatographie en phase gazeuse CPG, La volatilité et la polarité des constituants des huiles essentielles ont rendu la CG la méthode de choix, dans la plupart des cas, le CG est couplé à des modes de détection par ionisation de flamme ou par spectrométrie de masse. CGMS ou CG/FID des outils appropriés pour la caractérisation des HEs. La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) qui est une technique polyvalente et sensible pour détecter les substances volatiles des huiles essentielles ainsi que les substances thermolabiles et moins volatiles [24].

1.7.2 Les analyses spectroscopiques

1.7.3 Le chémotype

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce. En effet une même plante aromatique, botaniquement définie, synthétise une essence qui sera biochimiquement différente. "Biochimiquement différent" deux chémotypes présenteront non seulement des activités thérapeutiques différentes, mais aussi des toxicités très variables. La non-connaissance de cette notion capitale et le manque de précision laissent la porte ouverte aux échecs thérapeutiques et à la toxicité de certaines d'entre elles [26].

1.2.5 Les constituants majeurs des HE d'Origan

L'Origan est connu largement dans le monde des herbes et des épices pour ses huiles volatiles ; riches en monoterpènes phénoliques principalement le carvacrol, de temps en temps thymol, et d'autres composés présent dans l'Origan sont habituellement de moins

d'importance quantitativement tels que des monoterpènes acycliques comme, géraniol, acétate géranylique, linalool, acétate linalylique et β -myrcène et des composés bornanes tels que le camphène, camphre, bornéol, bornyle et acétate d'isobornyle. En outre, quelques sesquiterpènes, tels que caryophyllène, le bisabolène, bourbonnène, germacrene-D, humulène, muurolène, muurolène, γ -cadinène, (-)- α -copaène, α -cadinol, oxyde de caryophyllène [27].

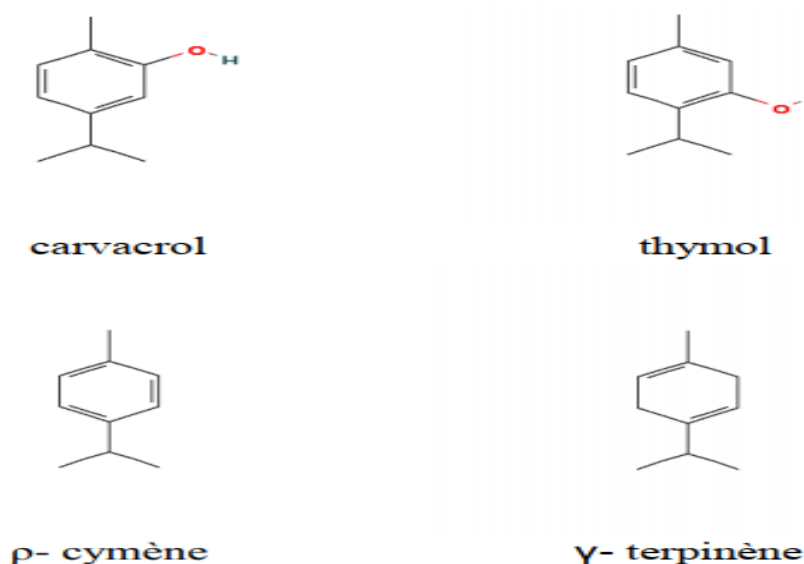


Figure 3 Quelques structures de substances majeures rencontrées dans les HE d'*Origan*. [25]

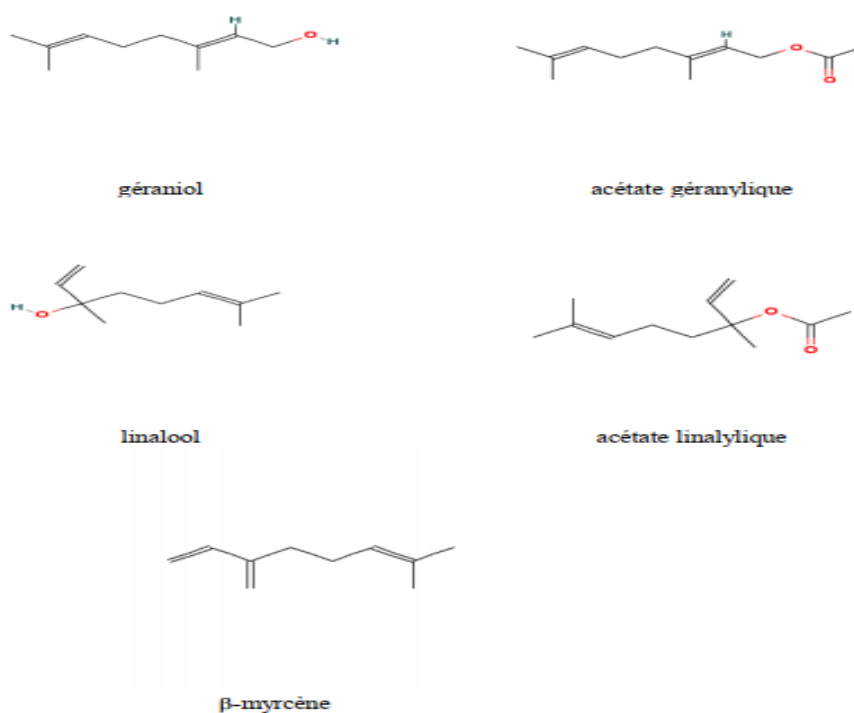


Figure 4 : Quelques structures de monoterpènes acycliques rencontrées dans les HE d'*Origan*

Tableau 3 : Nomenclature des composés volatils selon IUPAC.

N°	Nom de composés volatils	Nom de composés volatils selon UPAC
1	Carvacrol	5- isopropyl-2-methyl phenol
2	Thymol	2- isopropyl-5-methyl phenol
3	p-cymene	1-methyl-4-(1-methylethyl) Benzene
4	γ-terpinène	4-methyl -1-(1-methylethyl)1,4-cyclohexadiene
5	Geraniol	3,7-dimethyl octa-1,6-dien-3-ol
6	Acétate géranylique	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate
7	Linalool	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-
8	Acétate linalylique	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-, acetate
9	β-myrcene	7-methyl-3-methylideneocta-1,6-diene
10	Camphene	2,2-dimethyl-3-methylidenebicyclo[2.2.1]heptane
11	Camphre	1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one
12	Bornéol	(6R)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-6-ol

1.2.6 Activité biologiques des huiles essentielles

1.2.6.1 Activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est due principalement à leur composition chimique et en particulier à la nature de leurs composés majoritaires [28]. Les HEs d'Origan, étaient inhibiteurs de la croissance de toutes les souches microbiennestestées, à savoir les bactéries Gram-positifs, et les bactéries Gram-négatifs, ainsi que pour les levures, Les propriétés antimicrobiennes des HEs ont été en grande partie attribuées à la présence des composants phénoliques [29]. Le thymol et le carvacrol, par exemple, semblent rendre la membrane de la cellule perméable et être légèrement plus actifs contre des bactéries à Gram-positif que les bactéries à Gram-négatif [30].

1.2.6.2Activité Antioxydant

L'origan est couramment utilisé comme un additif alimentaire sain contenant des substances phénoliques massives avec des caractères antioxydants. De plus, *O. vulgare* pourrait protéger contre les lésions pulmonaires et la toxicité hépatique [31], via ses

propriétés antioxydants, HE d'origan à un effet protecteur significatif sur les tissus des testicules et de la rate contre la toxicité du chlorure mercurique [32].

1.2.6.3Activité antivirale

Des études ont montré que l'huile essentielle d'origan et son principal composant, "le carvacrol" étaient efficaces contre les virus à ARN et à ADN. Cette double efficacité présente des avantages par rapport aux médicaments antiviraux (synthétiques) courants, qui n'agissent généralement que sur les virus à ARN ou à ADN ou qui peuvent même être spécifiques à un seul virus ou groupe de virus [33]. Les herpèsvirus humains (par exemple, HSV-1 et HSV-2), des virus à ADN enveloppés, ont attiré la plus grande attention au cours de la dernière décennie. Il a été démontré que les huiles essentielles d'anis étoilé, d'origan et d'*Eucalyptus caesia* présentent une forte activité anti-HSV-1 in vitro [34].

1.3 Historique

Depuis plus de 4 000 ans, l'origan est utilisé par les guérisseurs du monde entier pour traiter une grande variété d'affections et renforcer la capacité de l'homme à combattre la maladie [35]. L'origan et ses huiles essentielles depuis longtemps été appelés "les antibiotiques de la nature", "le prince des herbes" et même le "miracle méditerranéen" en raison de leur liste infinie de bienfaits potentiels. Certaines sources lui attribuent le nom de l'herbe, qui était également connue sous le nom de "Majoram sauvage" dans les temps anciens [36]. La Grèce est le premier endroit connu où l'origan a été utilisé, son nom vient des mots grecs *oros*, qui signifie "montagne", et *ganos*, qui signifie "joie" la joie des montagnes [36]. Les Romains ont découvert l'origan lorsqu'ils ont envahi la Grèce. Leur amour de sa saveur et sa facilité de culture ont contribué à sa diffusion en Europe et en Afrique du Nord. L'origan s'est ensuite retrouvé en Chine. Il y était utilisé à des fins médicinales. Les Chinois croyaient qu'il aidait à combattre la fièvre, les vomissements et les troubles de l'estomac. À l'époque élisabéthaine, on croyait que l'origan favorisait la bonne chance et la guérison [35]. L'origan n'est devenu populaire aux États-Unis qu'après la Seconde Guerre mondiale, lorsque les soldats ont été exposés à son utilisation culinaire en Europe.

1.3.1Description de la famille Lamiaceae

Lamiaceae, ou Labiatae, également connue sous le nom de famille de la menthe ou de l'ortie morte, dans l'ordre des Lamiales, est une famille de plantes à fleurs dicotylédones, avec une distribution mondiale, principalement dans les régions méditerranéennes et en Asie du Sud-Ouest. La Lamiaceae élargie contient environ 236 genres et a été déclarée contenir 6900 à

7200 espèces. Cette famille est particulièrement importante pour l'homme en raison des plantes utiles pour leur saveur, leur parfum ou leurs propriétés médicinales [37].

1.3.2 Caractéristiques botaniques

- **Description du genre *origanum***

L'*origanum*, plus couramment appelé « origan », fait partie des genres les plus utilisés à travers le monde et est particulièrement répandu en Asie. Elle appartient à la famille des Lamiaceae et se présente sous la forme de plusieurs tiges dressées de section carrée qui se ramifient [38].

L'origan est une plante épicée, une herbe vivace de la catégorie des dicotylédones, mesurant entre 25 et 85 cm. Ses feuilles, qui sont opposées et pointues à l'extrémité, mesurent entre 1 et 4 cm. Elles sont vertes sur les deux côtés, avec des feuilles inférieures attachées par un pétiole tandis que les feuilles supérieures sont presque sans pétiole. Ses fleurs mesurent entre 3 et 4 mm de long et présentent des épis dressés.

Chaque fleur se trouve à la jonction d'une bractée ovale, légèrement membraneuse, sans poils et parfois légèrement pubescente, qui est de couleur rouge-violacé ou parfois glauque.

Elle pousse de la mer jusqu'à 4 000 mètres d'altitude, principalement sur des substrats calcaires. L'origan est semé au début du printemps, les plants étant espacés de 30 cm dans un sol plutôt sec, exposé directement au soleil. La floraison a lieu de juin à août et chaque fleur donne naissance à quatre graines lorsqu'elle est arrivée à maturité. Les sommités fleuries sont parsemées de petites glandes qui renferment les huiles essentielles responsables de l'arôme et du goût distinctifs de la plante. La culture de l'origan se fait dans une plage de pH allant de 6,0 à 9,0, avec une préférence pour une zone située entre 6,0 et 8,0 [38].

- **Description de l'espèce *origanum vulgare* L. ssp *glandulosum* (Desf.) Lets.**

Plante vivace et sarmenteuse (Figure I); avec un port sous-arbustif, cette plante forme de touffes de quelques centimètres de diamètre et une hauteur comprise entre 30 à 60cm. Les principaux caractères qui permettent de reconnaître cette plante sont les tiges toutes dressées, épis denses, à fleurs restant contiguës après floraison. Calice tubuleux à 5 dents courtes, bilabié ou non. Corolle blanche ou rosée, à lèvre supérieure émarginée et à lèvre inférieure trilobée bien longue que la lèvre supérieure [39].

Tableau 4 : Dénominations collectifs donnés à l'espèce *Origanum vulgare* .L dans différentes langues officielles nationales et régionales d'après.

Français	Origanum vulgare
Arabe	الزعتر
Anglais	Common marjoram, Oregano
Italien	Origano comune
Allemand	Dost, Wohlgemuthe, Origano



Figure 5 : Rameau de l'*Origanum vulgare* L.

1.3.3 Habitats et culture

L'Origan originaire d'Afrique du Nord, il colonise les terrains secs et chauds, les broussailles, les garrigues et les pâturages, surtout en montagne, Il pousse de préférence sur les sols calcaires et chauds L'origan se multiplie par division de touffe au printemps ou éventuellement par semis. On le récolte à la floraison, en été. Les parties utilisées sont les fleurs, les tiges et les feuilles [40].

1.3.4 Taxonomie du genre *Origanum*

Le genre *Origanum* comprend 49 taxons de rangs d'espèces, sous espèces ou de variétés, Ces taxons sont répartis en 10 sections. A titre d'exemple la taxonomie relative à la plante récoltée en Algérie appartient au genre *Origanum* et à la section *Origanum* qui comprend six espèces parmi lesquelles *Origanum vulgare*. L [41].

Tableau 5 : Section d'*origanum vulgare*. L

N°	Espèces	Distribution de l'espèce
01	- <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>vulgare</i>	- L'Europe, Iran, Inde et la Chine.
02	- <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>glandulosum</i>	- Algérie et la Tunisie
03	- <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>gracile</i>	-L'Afghanistan, Iran, Turquie et l'ancien URSS.
04	- <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>hirtum</i>	- L'Albanie, Croatie, Grèce et la Turquie
05	- <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>viridulum</i>	- L'Afghanistan, Chine, Croatie, France, Grèce, Inde, Italie et le Pakistan.
06	- <i>Origanum vulgare</i> L. ssp. <i>virens</i>	- Les Açores, îles de Baléares, îles de Canaries, Madère, Maroc, Portugal et l'Espagne

Systématique [42]

Règne : Plante. **Sous-classe** Gamopétales

Série : Superovariées, tétracycliques

Super ordre : Tubiflorales

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Sous -famille : Népétoideées

Chapitre II : les polymères

II.1 - Généralités sur les polymères

Les polymères sont présents dans la nature depuis l'aube de la vie. Les polymères naturels vitaux, comme l'ADN, l'ARN, les protéines et les polysaccharides, sont essentiels à la vie des plantes et des animaux. À travers les âges, l'être humain a eu recours à des polymères naturels pour satisfaire ses besoins en matière d'habillement, de décoration, d'habitat, d'équipement, d'écriture, et bien plus encore. Toutefois, l'industrie contemporaine des polymères remonte au XIX^e siècle, période durant laquelle des avancées notables ont été faites dans la transformation de polymères naturels particuliers. Ces avancées ont permis de créer des polymères synthétiques qui sont désormais largement utilisés dans diverses applications industrielles et de consommation. Aujourd'hui, les polymères sont un composant essentiel de nombreux produits et matériaux que nous utilisons dans notre vie quotidienne [43].

Les polymères peuvent être constitués de monomères identiques ou variés, et ceux qui sont constitués de deux sortes de monomères distincts ou davantage sont désignés sous le nom de copolymères [44].

Les polymères offrent la possibilité d'une fabrication à grande échelle, d'une modification des surfaces, ainsi que d'une décomposition et d'une diffusion maîtrisées des composés emprisonnés. L'utilisation de polymères naturels pour la conception de nanoparticules polymériques offre des avantages tels que la biodégradabilité et la biocompatibilité. En revanche, les polymères synthétiques offrent une plus grande cohérence et flexibilité, puisqu'ils se déclinent en diverses compositions et possèdent des caractéristiques qu'il est aisé de modifier pour répondre à des besoins précis [45].

II.2 Définition des polymères

Un polymère est une substance, qu'elle soit naturelle ou synthétique, composée de grandes molécules appelées macromolécules. Ces macromolécules sont composées d'éléments plus élémentaires appelés monomères. On retrouve des polymères dans divers êtres vivants, notamment sous forme de protéines et de cellulose, mais aussi dans des minéraux tels que le diamant, le quartz et le feldspath. Ils constituent également les composants de divers matériaux produits par l'homme, comme le béton, le verre, le papier, les plastiques et les caoutchoucs. Le mot « polymère » désigne un ensemble d'unités monomères, et quand ce nombre est très élevé, on parle de haut polymère.

Le nombre de motifs de monomères constituant la macromolécule est appelé le degré de polymérisation.

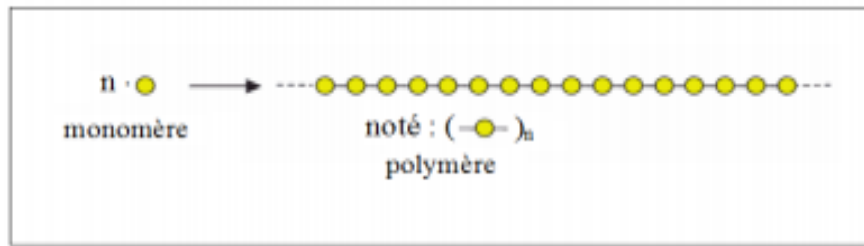


Figure 6 : Modèle schématique de la synthèse d'un polymère.

La lettre **n** désigne le « degré de polymérisation », noté D.P

Selon les valeurs de **n**, on a

- pour des valeurs élevées ($n > 100$), on parle de macromolécules,
- lorsque le degré de polymérisation est inférieur à 30, on parle d'oligomère,
- lorsqu'il est supérieur à 30, il s'agit d'un polymère.

Selon l'origine des matières premières et des voies de synthèse, on distingue deux types de polymères les biopolymères et les polymères synthétiques [46].

II.3 Les biopolymères

Selon l'UIPAC, Les biopolymères se définissent comme étant des bio-macromolécules synthétisées par des organismes vivants. Et selon l'ADEME (Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie), les biopolymères sont des polymères naturels issus de ressources renouvelables de plantes, d'algues ou d'animaux.

Les biopolymères peuvent aussi être obtenus par polymérisation de monomères naturels et par la fermentation des micro-organismes.

Les biopolymères peuvent être classés en trois familles :

- ✓ les polymères issus directement des ressources végétales et animales tels que les polysaccharides, les protéines et les polynucléotides,
- ✓ les polymères d'origine bactérienne comme les Polyhydroxyalcanoates (PHA),
- ✓ les polymères obtenus indirectement par polymérisation de monomères eux-mêmes issus de ressources végétales comme l'acide lactique, résultants de la fermentation de sucres ou encore des composés monomères réactifs dérivés d'huiles végétales [47].

II.4 Propriétés des biopolymères

Les biopolymères présentent des propriétés particulièrement intéressantes pour des applications spécifiques dans l'industrie des matières plastiques, dont la biodégradabilité est la plus importante.

- **La biodégradabilité**

La biodégradabilité d'un matériel se définit par sa capacité intrinsèque à être dégradé par une attaque microbienne. Cette attaque entraîne une simplification progressive de sa structure et sa conversion finale en eau (H₂O), dioxyde de carbone (CO₂) et/ou du méthane (CH₄) et une nouvelle biomasse [48].

- **La perméabilité**

La plupart des biopolymères tels que l'amidon, la cellulose et les protéines sont hydrophiles, ce qui leur confère des propriétés de perméabilité à la vapeur d'eau. Ces propriétés sont dues notamment à la présence de fonctions polaires hydroxyle et/ou amine qui a une forte réactivité avec l'eau par formation de ponts hydrogène.

La perméabilité à la vapeur d'eau pourrait se présenter d'une grande utilité dans l'emballage des produits humides leur permettant de continuer de sécher pendant leur stockage.

- **La biocompatibilité et la biorésorbabilité**

On dit qu'un matériau est biocompatible lorsque ce dernier serait capable d'assurer une fonction avec une réponse appropriée et sans effets indésirables sur l'environnement biologique dans lequel il est appelé à fonctionner.

La réponse biologique d'un matériau dépend de trois facteurs

- ✓ ses propriétés,
- ✓ la caractéristique de l'hôte,
- ✓ la demande fonctionnelle pour le matériau.

Les biopolymères par leur origine naturelle remplissent logiquement cette fonction et les implants médicaux en matériau inerte comme les céramiques sont de plus en plus remplacées par des polymères d'origine naturelle.

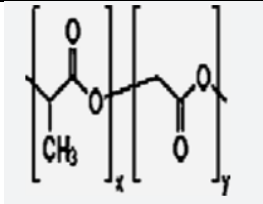
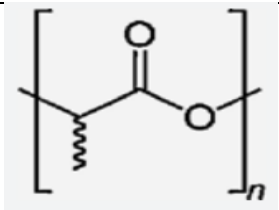
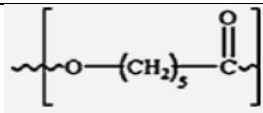
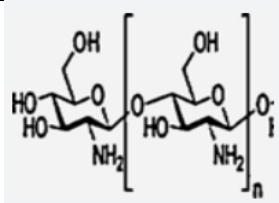
En plus de la biocompatibilité, on recherche également pour des applications médicales spécifiques des matériaux biorésorbables pouvant se décomposer tout naturellement dans l'organisme humain pour être remplacés par un tissu vivant. Les biopolymères sont dégradés naturellement dans l'organisme humain par hydrolyse enzymatique et libèrent des molécules assimilables et non toxiques.

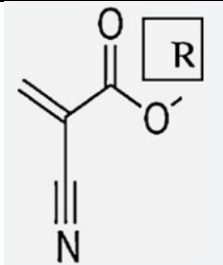
- **Propriétés chimiques**

La présence de fonctions chimiques sur les molécules leur attribue des propriétés particulières et des facilités à réagir avec d'autres molécules. Leur réactivité est due à la présence des fonctions alcool, acide, amine, ou aldéhyde qui réagissent facilement grâce à leurs sites nucléophiles et électrophiles [49].

Par exemple, la présence de certaines insaturations et des groupements hydroxyles sur les chaînes alkyles des triglycérides permet leur fonctionnalisation et conduit à la formation de polyuréthanes, polyamides ou polyesters.

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des nanoparticules polymériques formulées à partir de différents polymères pour une administration ciblée de médicaments.

Polymère	Structure	Encapsulant	Avantage thérapeutique	Références
PLGA Poly (lactic-coglycolic acid)		Estradiol	Biodisponibilité accrue	[50]
Acide polylactique (PLA)		Hémoglobine	Absorption moindre des Macrophages	[51]
Polycaprolactone (PCL)		Insuline	Préservation de l'activité biologique de l'insuline	[52]
Chitosane		Glycyrrhizinate d'ammonium	Augmentation de l'absorption orale du	[53]

			glycyrrhizinate d'ammonium	
Poly- alkylcyanoacrylate (PAC) Poly(éthyl) Cyanoacrylate		Ftorafur	Libération contrôlée du médicament jusqu'à 10 heures	[54]

II.5 Les polymères synthétiques

Les polymères synthétiques peuvent être reproduits sous diverses formes avec des propriétés de volume et de surface souhaitables. Les avantages spécifiques de ces matériaux incluent la possibilité d'adapter leurs propriétés mécaniques et leur cinétique de dégradation à diverses applications. Pour des applications telles que les implants ou les systèmes de libération contrôlée de médicaments, les polymères synthétiques qui se dégradent par hydrolyse sont préférés, car leur dégradation est invariante d'un patient à l'autre et d'un site d'implantation à l'autre. En revanche, les biopolymères ont une dégradation enzymatique, et ce mode est étudié pour l'ingénierie tissulaire et comme substitut de la matrice extracellulaire.

Les polymères synthétiques les plus utilisés comme biomatériaux sont le poly(acide lactique) (PLA), le polyvinylpyrrolidone (PVP), l'alcool polyvinylique (PVA), le poly(ϵ -caprolactone) (PCL), le polyuréthane (PU), polyéthylène glycol (PEG), oxyde de polyéthylène (PEO), poly(L-lactide-co-caprolactone) (PLCL), carboxyméthylcellulose (CMC) et poly(fluorure de vinylidène) (PVDF), entre autres [55].

II.6 La chitine et le chitosane

II.6.1 La recherche s'intéresse de plus en plus à la chitine et ses dérivés

Le nombre de publications sur le thème de la chitine et ses dérivés ne cesse de s'étendre depuis 1970. Cette année-là, le nombre de publication portant sur la chitine ou le chitosane était de 40, d'après la base Web of Science, alors qu'il atteint 5 260 en 2011. Avant 1960, le nombre d'études publiées par an sur ce thème était inférieur à 5. La figure 7 illustre cette évolution. D'après les conclusions de ces publications, ces produits sont promis à un bel avenir. Leurs propriétés biologiques et rhéologiques sont encore sous-exploitées par rapport à

leurs potentiels, par exemple comme films alimentaires. De nombreux laboratoires s'investissent dans la mise au point de nouvelles applications, notamment dans le domaine médical. De plus, il existe un engouement pour les produits d'origine naturelle et de surcroît d'origine marine.

Les premiers brevets concernant le chitosane semblent dater des années 30 [56], et son application concernait la fabrication de biofilms [57]. Au cours de l'année 2010, la littérature sur la chitine et le chitosane s'est enrichie de nombreuses revues qui constituent de réels atouts pour la poursuite des études dans ce domaine. Les laboratoires leaders se situent majoritairement en Asie, où se situe également la majorité de la production et des applications.

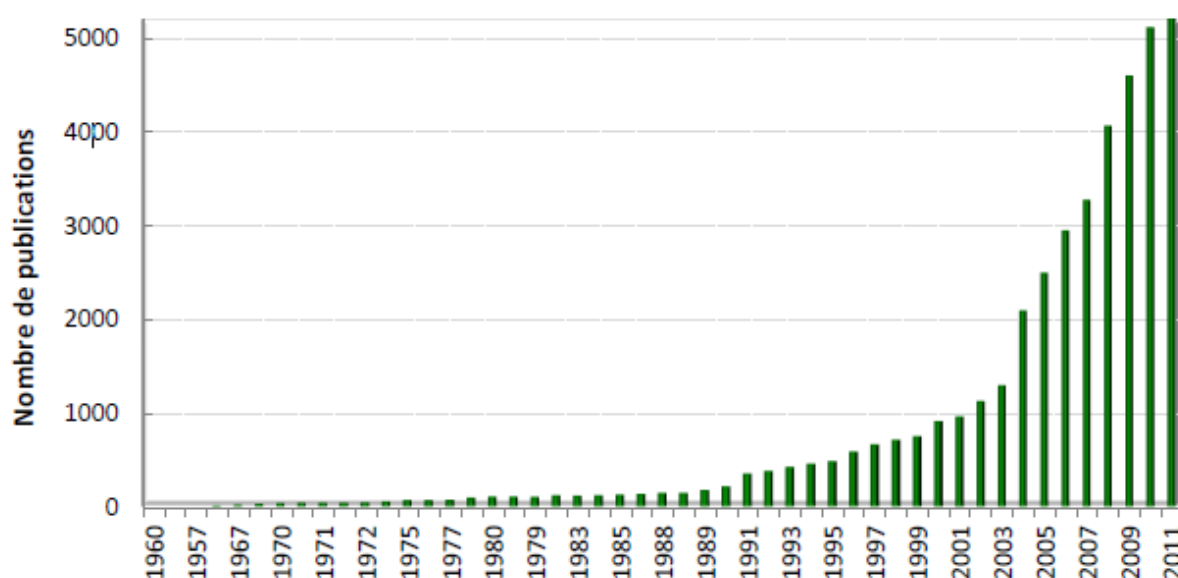


Figure 7 : Evaluation du nombre de publication par année traitant de « chitine » ou « chitosane ».

II.6.2 Les enjeux de l'étude

La thématique de cette étude s'inscrit dans la valorisation des coproduits de crustacés. La chitine est l'un des constituants majoritaires de l'exosquelette des crustacés. Son extraction est habituellement réalisée par traitement chimique. Elle repose principalement sur deux étapes

- la déminéralisation, par hydrolyse acide, pour éliminer les minéraux ;
- la déprotéinisation, par hydrolyse basique, pour éliminer les protéines.

Ce procédé chimique consomme de grandes quantités d'eau et de réactifs (principalement l'acide chlorhydrique, l'hydroxyde de sodium et des agents de blanchiment) qui sont nocifs

pour les manipulateurs, les équipements et l'environnement. De plus, l'étape de déprotéinisation basique se fait en général à chaud et donc nécessite un apport énergétique conséquent. En outre, les étapes de lavage génèrent des volumes très importants d'effluents pollués, dont le recyclage engendre un coût. Enfin, le procédé d'extraction chimique risque de dénaturer la structure de la chitine et ne permet pas la valorisation des autres composés des coproduits de crustacés, tels que les peptides et les pigments [58].

À l'inverse, un procédé biologique de purification de la chitine répondrait mieux aux enjeux actuels de développement durable. Son empreinte sur l'environnement devrait être réduite car les volumes d'effluents chargés en réactifs chimiques sont plus faibles. Ses conditions plus douces devraient préserver la qualité de la chitine. Enfin elles devraient également favoriser la valorisation des autres constituants, présents dans les coproduits de crustacés. Il s'agit notamment des peptides et des pigments.

Les expériences d'extraction de chitine par voie fermentaire et enzymatique seront décrites au cours du premier chapitre de ce manuscrit. Par ces voies, les taux de protéines et minéraux résiduels sont plus importants par rapport à l'emploi de l'extraction chimique. Des traitements complémentaires sont souvent nécessaires pour améliorer le degré de pureté en chitine. Enfin, les temps de réaction sont beaucoup plus longs que par la voie chimique.

II.6.3 Les ressources pour la production de chitine

Les sources privilégiées pour la production de chitine sont les coproduits de crustacés, en particulier les crevettes et les crabes. Cependant, le choix de la matière première est lié à l'activité locale. Certaines zones géographiques privilégient d'autres ressources, telles que les krills ou les bouquets. Les plumes de calmar sont parfois exploitées pour extraire de la chitine β . Cette structure est différente de la chitine α extraite des crustacés. Leurs propriétés s'adressent à des applications technologiques spécifiques. Des études ont également été menées sur la chitine α des éponges telles que *Verongula gigantea* et sur la chitine β de tubes digestifs de vers telles que *Riftia pachyptila* [59].

II.6.4 Les domaines d'applications de la chitine et de ses dérivés

La chitine est naturelle, non-toxique, biodégradable et versatile. Son utilisation repose principalement sur sa capacité à former des matrices et ses activités biologiques intéressantes [60]. Le caractère poly-cationique de très forte densité de charge du chitosane est souvent à l'origine de ses propriétés. En effet, il favorise la formation de complexes poly-électrolytes et ainsi la capacité à former des matrices [61]. De plus, les dérivés de la chitine possèdent des

activités biologiques comme hypo-cholestérolémique, antioxydant, anti-tumoral, antimicrobien, anti-hypertensive, antidiabétique et favorisant le système immunitaire [62]. Ces domaines d'application vont être détaillés ci-dessous, par ordre croissant de grade technologique.

II.6.5 La chitine

La chitine sert de base pour la fabrication du chitosane. Selon l'origine de la chitine, divers procédés sont nécessaires pour obtenir un degré élevé de pureté. Le processus de purification revêt une importance capitale pour les applications dans les domaines biomédical et pharmaceutique, car la présence de protéines, de minéraux ou de pigments résiduels peut entraîner des effets indésirables. La désacétylation est le procédé de transformation de la chitine en chitosane. Elle peut être réalisée par des techniques enzymatiques ou chimiques. Peu importe la technique employée, la dépolymérisation de la chitine est inévitable.

Le rendement en chitine varie en fonction de l'espèce entre 9 à 35 % par rapport à la biomasse séchée. Le chitosan peut également être produit à partir de moisissures telles que *Rhizopus* et *Mucor* [63].

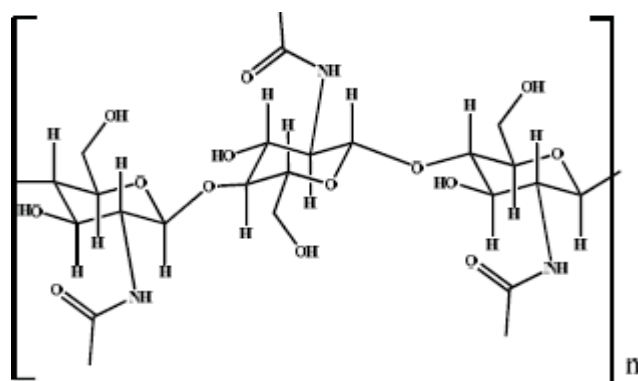


Figure 8 : Structure de chitine en 3D

II.6.6 Les caractéristiques biochimiques et physicochimiques de la chitine et ses dérivés.

« Chitine » peut être considérée comme le terme générique pour les amino-polysaccharides composés d'unités de **N-acétyl-β-D-glucosamines (NacGlu ou A)**, à hauteur de 50 à 100 %, et de **D-glucosamines (Glu ou D)**, la fraction complémentaire. Les unités sont reliées entre elles par des liaisons β(1-4) et les groupements N-acétyles sont fixés au C-2 [64].

Une chitine parfaite posséderait un degré d'acétylation (DA) de 100 % tandis que le chitosane, son dérivé désacétylé idéal, aurait un DA de 0 % (ou un degré de désacétylation, DD, de 100 %) si la désacétylation était complète. Dans la nature, ces deux extrêmes n'existent pas, la forme la plus courante est une chitine de DA de 85-95 %, rarement moins. Le chitosane est obtenu par désacétylation de la chitine. La limite de DA entre chitine et chitosane varie selon les auteurs. On parle de chitosane à partir de 50 % de NacGlu selon Al Sagheer (2009), plus généralement le chitosane est défini comme étant la forme désacétylée à plus de 60-70 %. La figure représente les deux molécules.

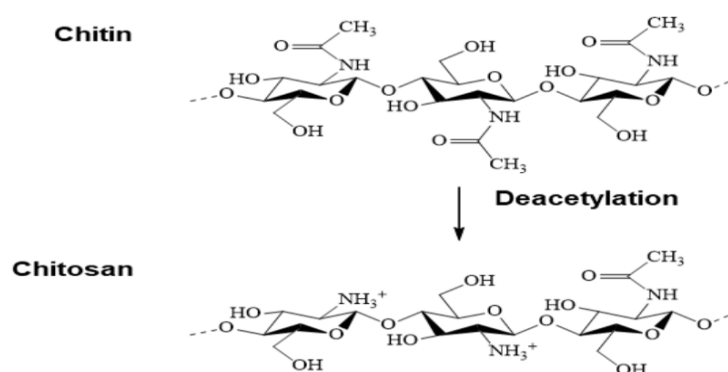


Figure 9 : Représentation idéale de la chitine et son dérivé obtenu par désacétylation, le chitosane.

La stabilité thermique de la chitine est étudiée pour caractériser les différentes chitines et ses dérivés. Elle est évaluée par analyse thermogravimétrique (ATG) et se situe entre 370 °C et 600 °C [65]. Lorsqu'elle est complexée dans la matrice des cuticules, la stabilité thermique est modifiée, influencée par les interactions avec les protéines et minéraux [66].

II.7 Définition de chitosane

Le chitosane est un polymère cationique naturel, semi-cristallin, dérivé de la chitine des parois cellulaires des champignons ou de l'exosquelette des arthropodes. Les films à base de chitosane, avec leurs propriétés de barrière modérée à l'oxygène et de bonne barrière au dioxyde de carbone, contribuent à maintenir un environnement humide autour de la lésion, un facteur critique dans la cicatrisation des plaies.

Le chitosane, découvert et nommé en 1859 par Roget, est obtenu par désacétylation partielle de la chitine poly (β -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetyl-D-glucosamine), dans des conditions alcalines, étant le dérivé le plus crucial en termes d'applications. Chimiquement, il s'agit d'un acopolymère composé de diverses proportions de N-acétyl-d-glucosamine et de d-glucosamine. Ses

propriétés dépendent fortement de son degré de désacétylation, de son poids moléculaire moyen, de sa polydispersité et de sa structure.

Les changements de densité de charge affectent les propriétés de dissolution et de liaison du chitosane. La variation de la densité de charge entraîne une modification considérable de l'indice de gonflement, de la taille des pores et de la perméabilité de la membrane médicamenteuse en chitosane. Le poids moléculaire modifie la teneur en unités de N-acétylglucosamine dans le chitosane, ce qui aura une influence à la fois intramoléculaire et intermoléculaire, entraînant des conformations différentes.

Les propriétés intrinsèques du chitosane, telles que la biocompatibilité, la biodégradabilité, la non-toxicité, l'adhésivité biologique, l'activité antimicrobienne et l'effet hémostatique, en font un matériau polyvalent. Avec ses groupes aminés réactifs, le chitosane est le seul polymère cationique naturel ayant de nombreuses applications commerciales il accélère la cicatrisation des plaies et est anticoagulant, antifongique et antitumoral. La nature cationique du chitosane est la clé de la plupart de ses propriétés biologiques, le degré de désacétylation (DG) étant le paramètre ayant l'impact le plus important [55].

II.7.1 Propriétés physico-chimiques de la chitine et du chitosane

La chitine et le chitosane sont principalement caractérisés par leur degré d'acétylation (DA) et par leur masse molaire, dont la détermination nécessite la mise en solution du polymère.

1. Le degré d'acétylation (DA)

Le terme chitosane n'est pas attribué uniquement pour définir un composé, mais plutôt pour désigner toute une famille de copolymères ayant des fractions d'unités acétylées variables qui se distingueront entre eux par le degré d'acétylation (DA) pourcentage des groupes acétyle (-COCH₃) dans la chaîne polymérique [67].

De nombreuses méthodes ont été proposées afin de déterminer le DA

- sur des échantillons solides la spectroscopie IR [68], l'analyse élémentaire, la RMN solide,
- sur des échantillons en solution dosage UV, titrage colloïdal [69], RMN liquide [70].

2. La solubilité

Du fait de sa forte cristallinité, la chitine n'est soluble que dans des solvants peu communs, ce qui limite son utilisation et sa valorisation. En effet, elle n'est soluble que dans le 2-hexafluoropropanol, et dans des mélanges tels que le diméthylacétamide /chlorure de lithium, ou l'acide trichloroacétique / dichloroéthane.

Le chitosane, insoluble dans l'eau, les acides concentrés, les bases et les solvants organiques peu se solubiliser dans les solutions acides dilués tels que l'acide chlorhydrique, l'acide formique, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide lactique à $\text{pH} < 6,5$. L'acide phosphorique, l'acide sulfurique, l'acide citrique et l'acide sébacique ne sont pas de bons solvants pour le chitosane.

Lorsque le pH est faibles, les amines subissent une protonation et deviennent chargés positivement, le chitosane devient alors un polyélectrolyte cationique hydrosoluble. Il est d'ailleurs le seul polycation d'origine naturelle [68].

D'autre part, le chitosane devient insoluble à des pH élevés. Cette transition entre l'état soluble et l'état insoluble du chitosane a lieu pour des valeurs de pH comprises entre 6 et 6,5.

La solubilité du chitosane dépendant aussi du degré de désacétylation (DD), de la nature de l'acide utilisé, de la force ionique et de la distribution des groupes amines sur la chaîne macromoléculaire [58].

Le solvant le plus couramment utilisé pour la dissolution du chitosane est l'acide acétique dont les équations d'équilibre sont les suivantes :



L'intérêt porté à la solubilité du chitosane est justifié par la nécessité de dissoudre la substance afin de faciliter d'éventuelles transformations chimiques. Les réactions chimiques réalisées en phase homogène conduisent généralement à de meilleurs rendements réactionnels, et ce, en moins de temps que lorsque ces mêmes réactions sont effectuées dans des conditions hétérogènes. Le chitosane est une substance présentant une très faible solubilité dans des milieux organiques et plus particulièrement lorsque cette dissolution est tentée dans des solvants aprotiques ou non polaires.

Ce quasi insolubilité s'explique par trois principales raisons [71] :

- la grande masse moléculaire de chacune des chaînes polymériques,
- la formation de liaisons hydrogènes entre les différents groupes fonctionnels portés par chacune des unités,
- les repliements des chaînes.

3. Le poids moléculaire

Dans le cas de la chitine et de son principal dérivé ; le chitosane, la connaissance de ce paramètre est très importante pour leurs utilisations industrielles et leurs applications dans les différents domaines de recherche. En effet, la conductivité, la densité, la tension de surface et

la viscosité des solutions de chitosane sont significativement affectées par le poids moléculaire. Pour la chitine, le poids moléculaire dépasse largement un million Daltons, tandis que pour le chitosane, il varie entre 105 et 1,2.106 Daltons [72].

II.8 Les activités biologiques du chitosane

II.8.1 Activité antimicrobienne

L'action anti-microbienne serait associée à la charge positive du carbone C-2. Cette activité serait stimulée lorsque la solubilité augmente [73]. Le chitosane agit en interagissant avec les membranes des cellules microbiennes [74]. Il semble que les bactéries Gram-négatives, comme E. coli, soient particulièrement sensibles à son action [75]. Il semble que cette activité soit stimulée par des niveaux élevés de désacétylation.

II.8.2 L'activité cicatrisante

Le rôle du chitosane est avéré dans la réparation tissulaire de l'épiderme [76], et la cicatrisation [78]. De ce fait, le chitosane est utilisé pour fabriquer des pansements et des bandages. Par exemple, un mélange de chitosane et oxychitine est commercialisé comme agent de recouvrement pour les greffes, le HemCon® Bandage. Le degré de désacétylation augmentant, les performances de cicatrisation sont améliorées [79].

II.8.3 L'activité de chitooligosaccharides

Les chitooligosaccharides (CHOS) sont de courtes chaînes composées de N-acétylglucosamine ou de glucosamine, avec un degré de polymérisation (DP) entre 3 et 10. Contrairement à la chitine, beaucoup plus longue, les CHOS suscitent un fort intérêt en médecine en raison de leurs nombreuses propriétés biologiques. Depuis les années 1970, ils ont montré des effets anti-tumoraux, anti-métastatiques, anti-inflammatoires (notamment en cas d'asthme), anti-ulcéreux, et favorisent la régénération et la minéralisation osseuse. Ils sont aussi utilisés comme vecteurs de gènes et comme inhibiteurs de la malaria. Enfin, la glucosamine, un de leurs composants, est reconnue pour soulager les douleurs articulaires inflammatoires [58].

Chapitre III : ENCAPSULATION DES HUILES ESSENTIELLES

Introduction

L'encapsulation est un moyen idéal en vue de masquer les goûts de certaines substances telles que les vitamines. Elle peut permettre aussi d'éviter les interactions entre les différents composants d'un complexe alimentaire et de protéger les principes actifs vis-à-vis de l'oxydation (protection des arômes) ou encore de l'humidité (protection du sel et du sucre). L'utilisation de microcapsules est même envisagée afin de réduire le volume gras et créer de nouveaux produits allégés [80]. L'encapsulation permet de transformer un liquide en solide, de masquer une odeur ou un goût désagréable, de protéger des substances sensibles des effets délétères de l'environnement extérieur, ainsi que d'obtenir une libération contrôlée et ciblée des principes actifs [80].

L'encapsulation est une barrière protectrice créée autour de l'huile, ce qui permet de protéger les composés plus actifs de l'huile contre les dommages environnementaux et aussi améliorer la solubilité dans l'eau et masquer l'odeur et le goût indésirable et assurer une longue durée de conservation.

III.1 Définition des procédés d'encapsulation et stockage

L'encapsulation est un procédé qui a pour but de piéger une substance ou un mélange de substances précises à l'aide de matériaux adaptés. Les substances qui feront l'objet d'une encapsulation peuvent être liquides, solides ou gazeuses. Généralement, ce sont des principes actifs sensibles ou instables à certains facteurs environnementaux et qui ont une action bien ciblée. Il peut aussi s'agir de substances dont on souhaite modifier l'état comme par exemple la transformation d'un liquide en solide. Quant aux matériaux d'encapsulation, ils sont principalement des polymères d'origine naturelle ou synthétique, ou des molécules amphiphiles pour leur double polarité, ou bien des matériaux argileux.

Généralement, les produits d'encapsulation se présentent sous deux formes différentes :
Soit une capsule « particule réservoir » comportant un actif liquide ou solide au cœur de sa structure. Le cœur est entouré d'un matériau enrobant constituant une membrane solide ;

Soit une sphère particule comportant un réseau polymérique ou lipidique continu constituant une matrice dans laquelle un composé actif finement y est dispersé à l'état de molécules, de particules fines et solides, ou de gouttelettes de solution [81].

III.2 Techniques d'encapsulation des huiles essentielles (HE)

L'encapsulation des HE a été réalisée à l'aide de diverses procédures chimiques, physico-chimiques et mécaniques. [82]

III.2.1 Procédures chimiques

Parmi les approches chimiques, les liposomes ont été largement utilisés pour l'encapsulation des HE. Les liposomes sont normalement préparés en mélangeant des lipides dans des solvants organiques et séchage ultérieur par évaporateur rotatif, séchage par pulvérisation ou lyophilisation [82].

III.2.2 Procédures physico-chimiques

La coacervation est un processus physico-chimique qui implique la séparation de phase d'un ou de plusieurs hydrocolloïdes de la solution et le dépôt ultérieur d'une phase coacervée nouvellement formée coacervat nouvellement formé autour de l'ingrédient actif en suspension dans le même milieu de réaction [82].

III.2.3 Procédures mécaniques

Parmi ces procédés, le séchage par atomisation est le procédé commercial à faible coût qui est le plus utilisé pour l'encapsulation des HE. Dans le séchage par atomisation, le matériau de base est dispersé dans une solution de polymère, et pulvérisé dans une chambre à air chaud [82].

III.3 Les types de procédés d'encapsulation

De nombreuses techniques ont été utilisées pour encapsuler les huiles, les polyphénols, etc. Chaque technique répond à des critères bien définis. Le choix d'une technique se fera en fonction de la nature du principe actif à encapsuler, de ses propriétés physique et chimique et du matériau de paroi, de la taille des particules souhaitée, de l'application envisagée (pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire). La vitesse et les conditions de libération prévues, des rendements d'encapsulation nécessaires et des contraintes de fabrication et de coût. Les principales méthodes d'encapsulation sont coacervation, polymérisation in situ [83].

III.3.1 Coacervation

La technique de coacervation peut être simple ou complexe si un ou deux polymères sont utilisés, respectivement. La coacervation est généralement définie comme la séparation de deux phases liquides dans une solution colloïdale. L'une des phases est riche en polymère et est appelée phase de coacervat, tandis que l'autre ne contient pas de polymère et est appelée

solution d'équilibre. Dans le cas de la coacervation simple, il n'y a qu'un seul polymère, tandis que la coacervation complexe implique l'interaction de deux colloïdes de charge opposée [83].

a) Coacervation simple

En 1949, Bungenberg de Jong a classé la coacervation en deux types simple et complexe. La coacervation simple est basée sur l'ajout d'un solvant pauvre à une solution colloïdale hydrophile, ce qui entraîne la formation de deux phases l'une est riche en molécules colloïdales (coacervat) et l'autre est presque exempte de coacervat [83].

b) Coacervation complexe

La coacervation complexe est un phénomène spontané qui se produit entre deux polymères de charge opposée. La neutralisation de ces charges induit une séparation de phase (phase riche en polymère versus phase aqueuse). Cette technique a été largement appliquée à la microencapsulation [83].

III.3.2 Séchage par pulvérisation

Le séchage par atomisation est une méthode populaire de formation de microparticules car elle est facile à mettre en œuvre au niveau industriel et permet une production continue. Il consiste en une atomisation du liquide en petites gouttelettes, une étape de séchage est réalisée à l'aide d'un gaz réchauffé et la collecte des particules solides. La gomme arabique est l'un des matériaux de paroi les plus couramment utilisés dans la microencapsulation par séchage par atomisation [83].

III.3.3 Expansion rapide des solutions supercritiques (RESS)

Les méthodes conventionnelles présentent certains inconvénients tels que l'utilisation de grandes quantités de solvants organiques, une large distribution de la taille des particules et des résidus de solvants. Pour pallier ces inconvénients, des procédés basés sur des fluides supercritiques ont été utilisés. Ce dernier procédé est devenu une alternative intéressante pour encapsuler les substances naturelles en raison de l'utilisation de solvants respectueux de l'environnement [83].

III.3.4 Encapsulation dans des liposomes

Les liposomes sont des systèmes formés d'une ou plusieurs couches de phospholipides délimitant un ou plusieurs compartiments aqueux. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles capables de s'auto-organiser spontanément en milieu aqueux. Les liposomes peuvent être classés en fonction de leur taille et de leur lamellarité [83].

III.3.5 Nanoprécipitation

Il s'agit d'une technique simple et reproductible qui permet d'obtenir des nanoparticules monodisperses. La nanoprécipitation permet d'obtenir des particules reproductibles de taille submicronique avec une distribution étroite en utilisant une faible source d'énergie externe. Cette technique convient à l'encapsulation de matériaux hydrophobes tels que les HE [83].

3.4 Le principe de la libération de principe actif

Il existe différents mécanismes selon que l'on souhaite une libération instantanée ou progressive [84].

3.4.1 La libération déclenchée les capsules présentent une membrane étanche, qui se brise ou fond de façon brutale sous l'effet d'un stimulus extérieur (pression, fissure dans la matrice, pH, température etc.). C'est par exemple ce qui est attendu dans les systèmes d'autoréparation de peinture où la libération de la substance active permet d'apporter une réparation esthétique à une rayure mais aussi une protection contre la corrosion ultérieure du support [84].

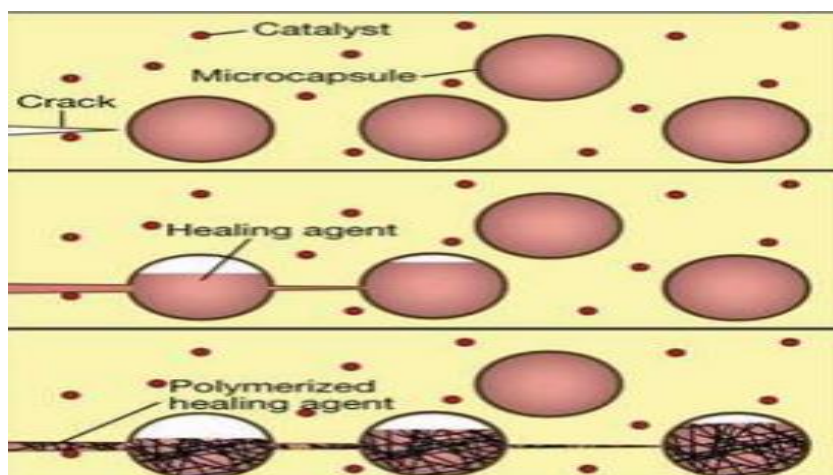


Figure 10 : Mécanisme de réparation par propagation de fracture mécanique.

III.4.2 La libération prolongée : Ce type de libération a lieu aussi bien avec des sphères que des capsules. Deux mécanismes existent et cohabitent le plus souvent la diffusion passive et la dissolution/dégradation de la paroi. Les cinétiques de libération obtenues sont différentes [5].

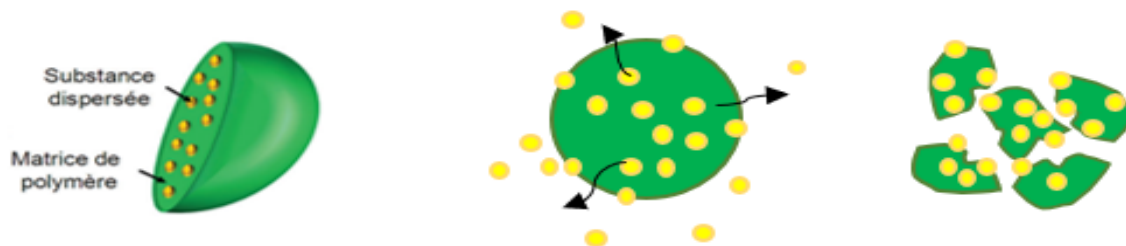


Figure 11 : Principe de libération prolongée par diffusion (gauche) et par érosion (droite)

III.5 L'encapsulation et ses avantages

-Encapsulation d'huiles essentielles (HE) pour une libération contrôlée L'encapsulation représente une approche viable et efficace pour augmenter la stabilité physique des HE, la protection contre l'évaporation et, en raison d'une gamme de taille étroite, permet une libération contrôlée et une meilleure bioactivité.

-Encapsulation des huiles essentielles (HE) pour une biodisponibilité accrue Outre les caractéristiques de libération contrôlée, plusieurs chercheurs ont également signalé biodisponibilité accrue des HE après encapsulation dans des matrices variables.

- Encapsulation des huiles essentielles (HE) pour une stabilité accrue L'encapsulation permet non seulement une libération contrôlée et une meilleure bioaccessibilité des HEs, mais elle augmente également leur stabilité car elles sont susceptibles de se transformer et de se dégrader après avoir été exposées à des stress environnementaux, dégradation après exposition à des stress environnementaux [82].

III.6 Encapsulation dans des particules polymères

L'encapsulation des HE dans des particules de polymères a été étudiée. Cependant, la principale limitation est la perte d'OE, en particulier dans les techniques qui incluent une étape de chauffage ou d'évaporation. D'autre part, l'encapsulation pourrait offrir de nombreux avantages tels que la protection des HE contre la dégradation. En effet, les températures élevées, la lumière UV et l'oxydation peuvent compromettre l'activité biologique des HE fragiles par volatilisation ou dégradation des ingrédients actifs. La formulation des OE sous forme de microcapsules ou de microsphères pourrait également être utilisée pour contrôler la libération des OE encapsulés [83].

III.7 Domaine d'application

L'encapsulation joue un rôle très important dans les secteurs pharmaceutiques, cosmétiques, agro-alimentaires, industries chimiques, nutraceutiques, agriculture et textile du fait que les matériaux protègent les composés sensibles de l'humidité, la chaleur ou des conditions extrêmes, améliorant aussi leur stabilité et leur viabilité.

Tableau 7 : Domaine d'application des différentes méthodes d'encapsulation dans l'industrie alimentaire.

Techniques d'encapsulation	Type de capsule	Domaine d'application
Coacervation	Pâte/poudre/capsule	Chewing-gum, biscuiterie
Atomisation	Poudre	Confiseries, Poudre de lait, Boissons, Instantanées
Atomisation à froid	Poudre	Plats préparés, glaces.
Extrusion	Poudre/granule	Boissons Instantanées, thé, Confiserie

III.8 L'anatomie et la physiologie de la peau

La peau humaine est constituée de trois grands types de tissus

III.8.1 L'épiderme : la cornée et le derme. L'épiderme multicouche, dont l'épaisseur varie en fonction de la taille et du nombre de cellules, a une épaisseur moyenne de 0,8 mm sur les paumes et de 0,06 mm sur les paumes. La cornée, également appelée corneum, est la couche la plus externe de la peau. Elle est composée de 10 à 25 cornéocytes, qui sont des cellules mortes kératinisées. Elle est adaptable et largement imperméable, et constitue le principal inhibiteur de la pénétration des médicaments. La fraction lipidique contient des amphiphiles suffisants pour maintenir la structure de la cornée. L'épiderme est continuellement renouvelé par les cellules basales, qui subissent des changements morphologiques et histochimiques afin de produire la couche supérieure de la cornée [86].

III.8.2 Le derme : Épaisse de 3 à 5 mm, la couche de tissu conjonctif qu'est le derme contrôle la température du corps, élimine les déchets et les polluants, nourrit et oxygène la

peau. Sa surface est située à moins de 0,2 mm des capillaires, ce qui permet aux molécules de traverser la barrière cutanée. L'apport sanguin permet de maintenir une faible concentration de perméat, ce qui est crucial pour la perméation transdermique et assure ainsi une fonction de barrière cutanée adéquate [86].

III.8.3 L'hypoderme soutient le derme et l'épiderme en stockant les graisses, en maintenant la température du corps, en fournissant un soutien alimentaire et en assurant une protection mécanique. Il contient les principaux vaisseaux sanguins et les organes sensoriels. L'administration transdermique de médicaments implique une pénétration à travers les trois couches et dans la circulation systémique, contrairement à l'administration topique [80].

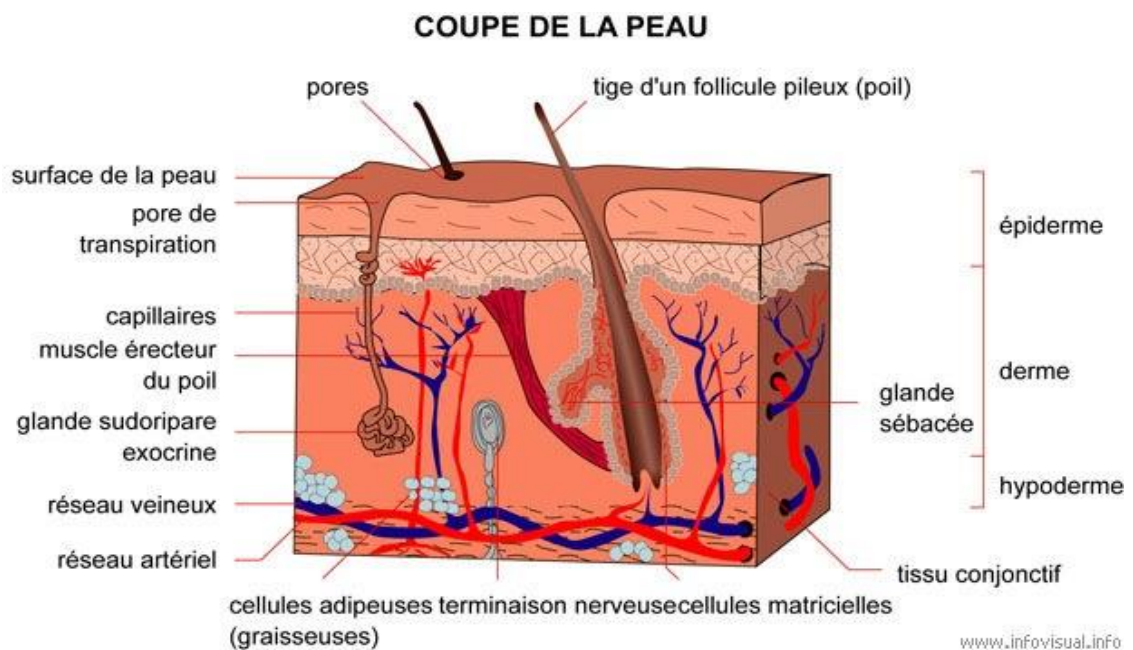


Figure 12 : Structure de la peau.

III.9 PATCH TRANSDERMIQUE

Un patch transdermique cutané est une membrane adhésif médicamenteux qui est placé sur la peau afin de délivrer une dose spécifique de médicament à travers la peau. Il permet de délivrer une dose spécifique de médicament à travers la peau [87].

III.10 Mécanisme d'absorption d'un patch

Les trois principales voies d'absorption des médicaments hydrophiles et lipophiles utilisent en effet des méthodes différentes sont les suivantes :

III.10.1 La voie trans-folliculaire : offre une large zone de diffusion du médicament ; pénètre rapidement dans la systémique. La peau comporte un grand nombre de pores, de glandes sudoripares, de glandes sébacées et de follicules pileux. Elle est également composée de glandes sudoripares, de glandes sébacées, de follicules pileux et de conduits qui leur permettent de s'ouvrir à la surface de la peau, ce qui lui permet de s'ouvrir à la surface de la peau. Le transport des médicaments par ces est continu à travers la couche cornée, bien qu'il soit influencé par plusieurs variables. Ce transport est influencé par plusieurs variables, notamment la sécrétion des glandes, le type et le volume de sécrétion de la peau. La sécrétion des glandes, le type et le volume de sécrétion, etc. Cependant, la voie trans-appendiculaire est moins efficace. En effet, elle n'occupe que 0,1 % de la surface de la peau [86].

III.10.2 Voie transcellulaire : grâce à ce système, les médicaments sont administrés à partir des cornéocytes, qui possèdent des propriétés hydrophiles. Administrés à partir des cornéocytes, qui possèdent une voie hydrophile et qui contiennent de la kératine fortement hydratée. Les lipides qui entourent et relient les cornéocytes. Un médicament nécessite donc plusieurs processus de partitionnement et de diffusion. C'est la voie qu'empruntent le plus souvent les différents types de médicaments. Le plus souvent. La méthode transcellulaire permet au de traverser le cytoplasme (ou matrice) des cellules. Les médicaments hydrophiles conviennent à cette approche. La kératine hautement hydratée offre une voie aqueuse aux médicaments hydrophiles [86].

III.10.3 Voie intercellulaire la matrice lipidique continue présente entre les cellules sert de conduit à travers les cellules. Elle sert de conduit à travers lequel les médicaments se diffusent. Les médicaments se diffusent dans ce canal. La nature de cette barrière Cette voie présente une structure tortueuse créée par les cornéocytes. Les cornéocytes et le médicament doivent se diffuser vers la face interne. Le médicament doit s'y répartir dans la bicouche lipidique pour passer à travers l'alternance lipidique et aqueuse. L'alternance de domaines lipidiques et aqueux. Il est préférable. Pour les médicaments lipophiles non chargés, car il a été démontré que l'eau s'écoule 50 fois plus rapidement. Il a été démontré que l'eau s'écoule 50 fois plus rapidement par cette voie [86].

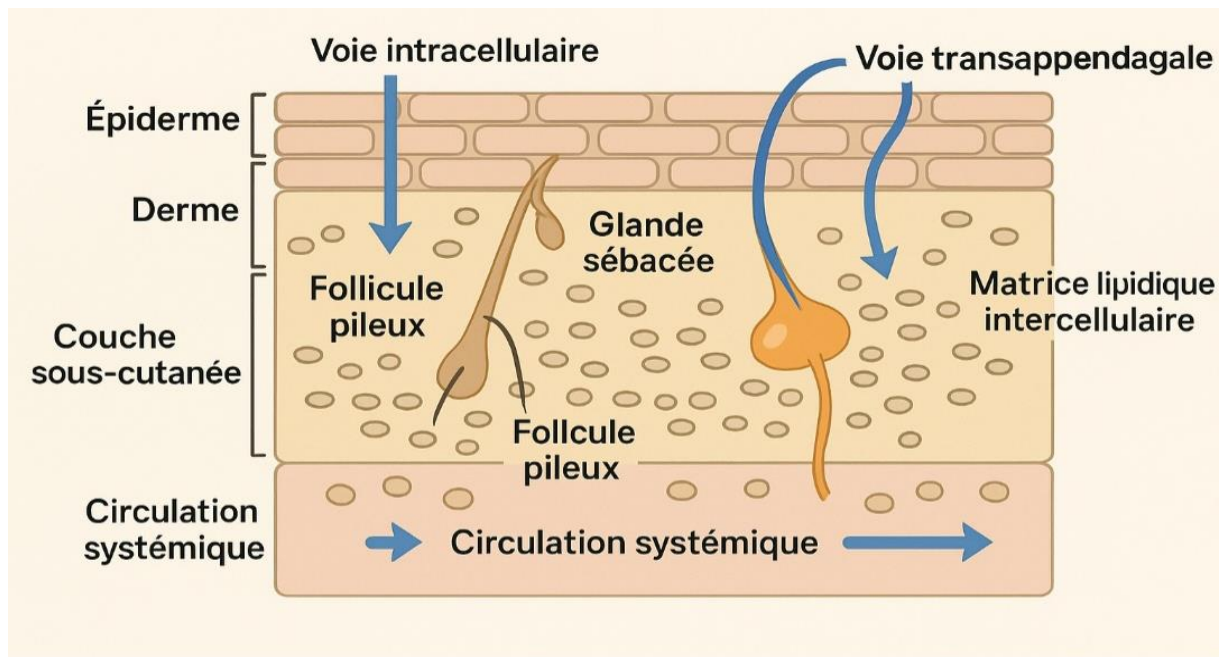


Figure 13 : Mécanisme d'absorption d'un patch par la peau.

III.11 Composition d'un patch

Un patch est composé par les éléments suivants [86] :

- a) **Médicament** : La solution médicamenteuse doit être en contact direct avec la pellicule de protection.
- b) **Polymère** : Le polymère est le principal composant des systèmes d'administration transdermique.
- c) **Couche dorsale** : Elle soutient et protège les timbres transdermiques de l'environnement externe.
- d) **Membrane de contrôle de la vitesse** : La vitesse à laquelle un médicament est délivré à partir d'une forme posologique est déterminée par des membranes de contrôle de la vitesse.
- e) **Adhésif** : Le rôle principal de l'adhésif dans les patchs transdermiques est de maintenir le contact avec la peau pendant une durée déterminée.
- f) **Film protecteur** : Le film protecteur, qui fait partie de l'emballage primaire, empêche la perte du médicament par le polymère.
- g) **Plastifiants** : Les plastifiants augmentent la flexibilité et la fragilité du polymère.
- h) **Autres excipients** : Les activateurs de perméation sont utilisés pour dissoudre le médicament et les polymères.

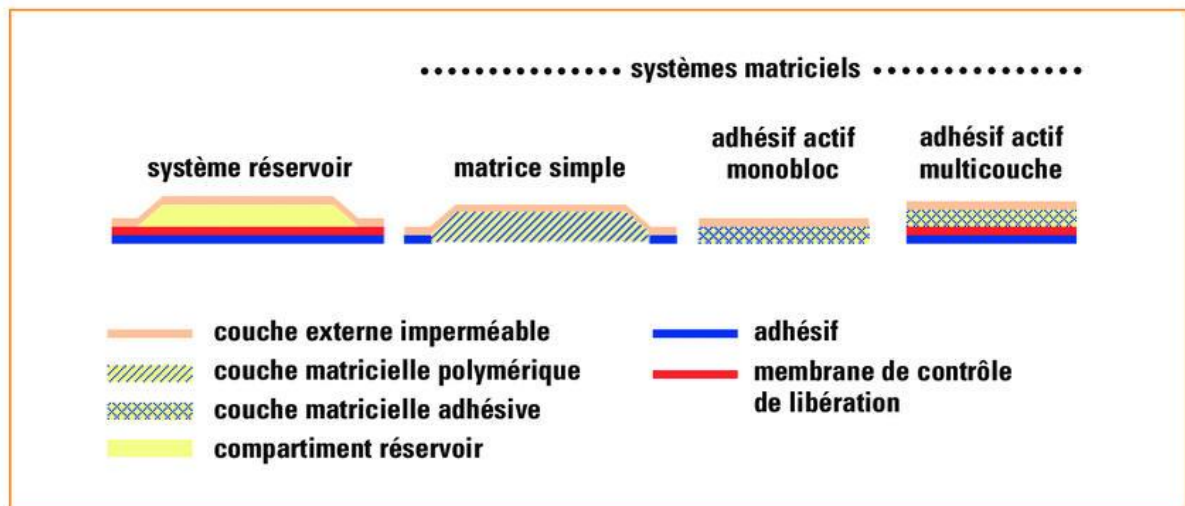


Figure 14 : Structure des systèmes thérapeutiques transdermiques actuels.

CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES

Introduction

L'objectif de cette section de cette mémoire est de décrire la méthodologie utilisée pour encapsuler l'huile essentielle du l'origan dans le polymère chitosane. Cette technique d'encapsulation est une méthode efficace pour améliorer la stabilité et la biodisponibilité des HE et la libération contrôlée (prolonge) de ces molécules actives. Dans cette étude, nous avons utilisé le chitosane comme polymère d'encapsulation en raison de leurs propriétés biomédicales, telles que leur biocompatibilité, leur non-toxicité et leur capacité à protéger les molécules actives. Cette section fournira une description et caractériser leurs propriétés physico-chimiques.

Démarche expérimentale : La démarche expérimentale de notre travail portant sur l'encapsulation de l'huile essentielle *Origanum vulgare*. L.

1. Matériel

IV.1 Extraction de l'huile essentielle d'origan

IV.1.1 Matériel végétale

Cette étude a porté sur une plante aromatique et endémique provient des montagnes de la région de Médéa. Qui était *Origanum vulgare*. L.

Les plantes de l'origan ont été achetées avec notre promoteur au marché chez un herboriste spécialiste à la wilaya de Blida, les échantillons étaient frais et récoltées dans la commune de à Médéa, ou pousse l'espèce d'origan à l'état spontané.

L'identification botanique de la plante a été réalisée par Mr. METTAI docteur en botanique au sein de la faculté de sciences naturelles à l'université de Blida-1-

IV.2 Matière première d'extraction du chitosane

- Les carapaces de crevettes, utilisées durant cette étude, à partir de MASMAKT Boufarik, Cette espèce appelée communément crevette blanche, est présente en abondance à différentes profondeurs de 1500 à 900 m, le long du littoral Algérien.
- Chitosane commercial obtenu à partir de la carapace de crabes, produit (FISHER SCIENTIFIC).

IV.2.1 Produit chimique utilisés

Matiere	Marque	Imperté
Glycerol/glycerine	BIOCHEM Chemopharma	99,5%
Acetone	BIOCHEM Chemopharma	99%
Tween 80	Sigma aldrich	49%
Chitosane	Fisher scientifique	/
Éthanol	BIOCHEM Chemopharma	96%
Méthanol	BIOCHEM Chemopharma	96%
Acide acétique	Carlo Erb	99%
L'hydroxyde de sodium	Sigma aldrich	37%
Acide chlorhydrique	Heynwel	37%

4.3 Matériels biologiques

a) Le genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est constitué de bacilles à Gram négatifs, droits ou légèrement incurvés, ayant une taille de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm de longueur, aérobies stricts, oxydase positifs, non sporulés et généralement mobiles grâce à une ciliature polaire. [88].

b) Le genre *Escherichia coli*

Escherichia coli fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit de courts bâtonnets mobiles au moyen de flagelles péritriches, Gram négatifs, anaérobies facultatifs, non sporulés, oxydase négative, mesurant de 2 à 4 µm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 µm. Ils sont capables de fermenter plusieurs sucres, mais leur fermentation du lactose avec production de gaz est caractéristique. La multiplication à 44 °C (optimum 40 °C et extrême à 45,5 °C), la production d'indole et la présence d'une activité β-glucuronidase, sont également caractéristiques [89].

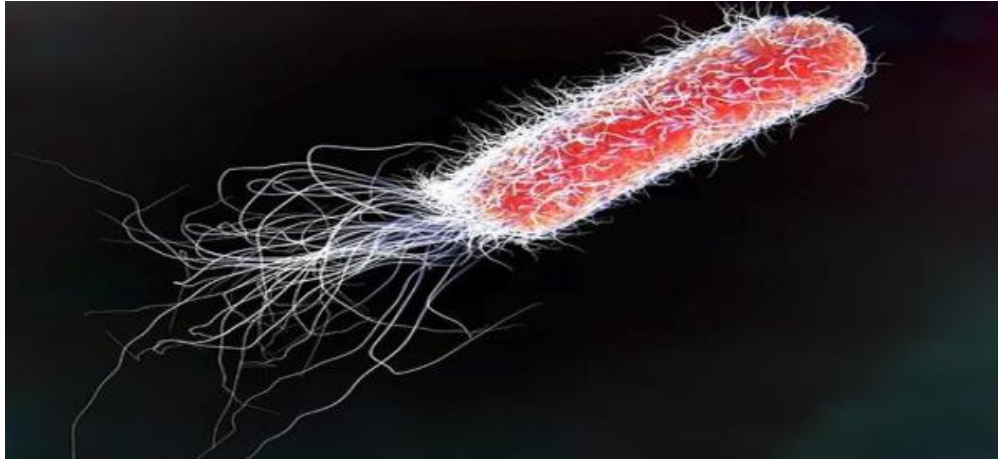


Figure 15 : Observation microscopique d'Escherichia coli.

c) Le genre *Staphylococcus*

Staphylococcus aureus [88]. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.t, comme tous les staphylocoques, une bactérie sous forme Cocci à Gram positif, de 1 µm de d'un diamètre environ, apparaissant en amas à l'examen microscopique. Immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique [90].



Figure 16 : Observation microscopique de Staphylococcus aureus

d) Le genre *klebsiella*

Klebsiella pneumoniae est l'espèce type du genre *Klebsiella*. C'est un bacille Gram négatif, non mobile, encapsulé, anaérobie facultatif, capable de fermenter le lactose sur milieu MacConkey avec des colonies d'aspect mucoïdes [91].



Figure 17 : Observation microscopique de *Klebsiella spp.*

e) Le genre *Enterococcus faecalis*

Désigne une bactérie qui appartient à la famille des *Enterococcus* (entérocoques). C'est un bacille Gram négatif. Comme tous les entérocoques, elle est susceptible d'entraîner des infections, en particulier en milieu hospitalier. On parle alors de maladies nosocomiales. *Enterococcus faecalis* colonise le tube digestif et peut provoquer des infections digestives ou urinaires et des endocardites[92].

f) *Candida albicans*

Pathogène isolé à partir de cathéter central. C'est un champignon pathogène courant qui peut provoquer des infections opportunistes chez les personnes immunodéprimées [93].

g) *Candida glabrata*

Pathogène isolé à partir des urines. C'est une levure pathogène qui peut provoquer des infections superficielles et systémiques chez les personnes immunodéprimées. Elle est souvent résistante aux médicaments antifongiques couramment utilisés [94].

h) *Aspergillus*

Les aspergilloses sont des affections dues à des moisissures opportunistes du genre *Aspergillus*. Présents dans l'environnement sous forme de spores, ils ne deviennent pathogènes, elles constituent un ensemble nosologique très large et de pronostic [95].

4.3.1Mueller–Hinton

La gélose Muller-Hinton est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion ou de

dilution en gélose. La standardisation du milieu de Mueller-Hinton est nécessaire pour obtenir des résultats fiables au niveau de l'antibiogramme.

4.3.2 Sabouraud

La gélose Sabouraud est une gélose non sélective utilisée pour cultiver les champignons et plus précisément en pour la culture fongique et principalement utilisé pour l'isolement des dermatophytes, des levures et de divers autres champignons pathogènes et non pathogènes. C'est une gélose glucosée présentant un pH légèrement acide pour favoriser la culture des champignons. Ce milieu a été développé par Le dermatologue français Raymond J. A. Sabouraud en 1892.

IV.3.3 Souches bactériennes

L'activité antimicrobienne de l'HE ainsi les membranes du Chitosane et chitosane /HE et Chitosane-R/HE est testée sur des souches bactériennes ATCC et pathogène. Ces derniers proviennent du laboratoire central du CHU de Blida.

- Chitosane-R chitosane réticulé avec le glutaraldehyde.

Tableau 8 : Souche bactériennes utilisées.

Nom de la souche	N°ATCC	Gram	Famille
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	25922	-	Entérobactéries
<i>Pseudomonas aeruginosa,</i>	27853	-	Pseudomonadaceae
<i>Enterococcus faecalis</i>	229212	-	Enterococcus

2. Méthodes d'étude

IV.4 Extraction de l'huile essentielle d'*O.vulgarae*. L

L'extraction a été effectuée au sein de notre laboratoire (LGC) Par hydrodistillation via un dispositif de type Clevenger.

IV.4.1 Procédés d'extraction

Après avoir pesé 40 g de matière végétale, (constituée des parties aériennes d'espèce étudiée) ces derniers ont introduit dans un ballon de 500 ml rempli d'eau aux 2/3 de son volume. Le ballon chauffé à l'aide d'une chauffe ballon produit de la vapeur chargée de produits volatils. Cette vapeur se condense au contact du réfrigérant sous l'effet de l'eau froid (alimentation de l'eau à contrecourant dans le réfrigèrent). Les premières gouttes d'huile sont apparues après 20 minutes du chauffage, elles sont superposées sur l'hydrolat, plusieurs extractions été effectuées dont chaque extraction s'effectue pendant 1heur 30 minutes.

L'huile essentielle obtenue a été mise dans des petits flacons sombres bien fermés et conservés au réfrigérateur à une basse température (environ 4°C) dans l'obscurité jusqu'à son utilisation ultérieure.

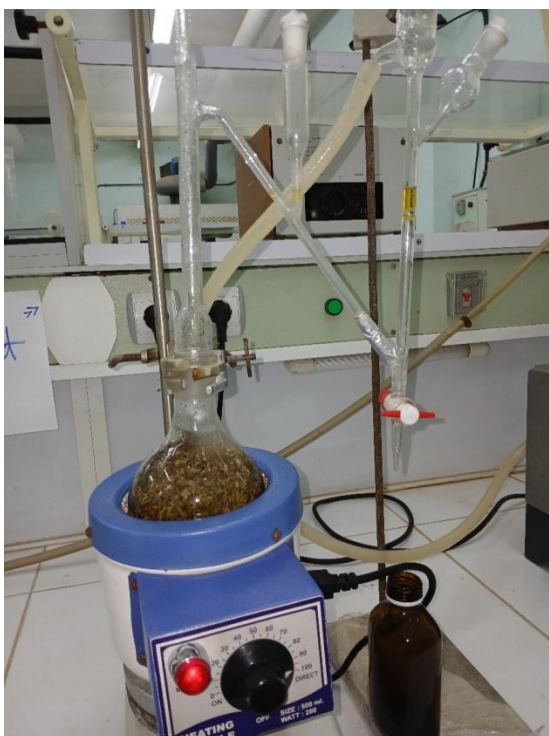


Figure 18 : Montage légendé d'extraction de type Clevenger.

IV.4.2 Rendement de l'extraction

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport en pourcentage entre la masse de l'huile récupérer et la masse de la matière végétale sèche. Le rendement en HE est donné par la relation suivante

$$R(\%) = \frac{m_{HE}}{m_V} \times 100 \quad (1)$$

Avec :

R : rendement de HE origan en %

m_{HE} : masse de l'huile essentielle récupérée (g)

m_V : masse de la matière végétale (g)

IV.4.3 Etude de la cinétique d'extraction de l'huile essentielle

En théorie, le temps d'extraction correspond à la durée nécessaire pour obtenir toute l'huile contenue dans le matériau végétal. En pratique, il est difficile d'en collecter toute la quantité. C'est pourquoi nous ne voyons plus d'huile dans le distillat à ce moment-là. Cela marque la fin du processus. Dans le cadre de cette recherche, une surveillance cinétique a été effectuée sur l'extraction de l'huile essentielle.

Nous avons réalisé des extractions avec 40 g de matière végétale sèche à chaque fois, et ces extractions ont été effectuées après l'apparition de la première goutte d'huile essentielle, pour des durées respectives de 20, 35, 50 et 65 minutes. Il est observé que la durée de préchauffage du système est de 20 minutes. Pour 2 kg d'*O.vulgarae.L* nous avons effectué plusieurs nombre d'extraction et pour chaque extraction, nous avons fixé le volume d'HE.

IV.5 Caractérisation de l'huile essentielle d'*O.Vulgarae.L*

- l'évaluation des propriétés organoleptiques (aspect, couleur, odeur et goût).
- la détermination des indices physico-chimiques (densité, indice de réfraction, indice d'acide, indice de saponification et indice d'ester).
- l'élaboration du profil chromatographique et la mesure des différents composants.

IV.5.1 Caractéristiques organoleptiques

L'évaluation des propriétés organoleptiques des huiles essentielles exige l'usage de nos sens pour juger de leur aspect, de leur parfum et de leur teinte.

IV.5.2 Indices physico-chimiques

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physico-chimiques sont celles indiquées par le recueil de normes de l'association française de normalisation (AFNOR)

- 1) **La densité à 20 °C** est déterminée en divisant la masse d'un volume spécifique d'huile essentielle (HE) à 20 °C par la masse du même volume d'eau distillée à cette

température. Elle s'évalue à l'aide d'un pycnomètre, comme le montre la formule suivante :

$$d_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (2)$$

Avec :

m_0 : La masse de pycnomètre vide

m_1 : La masse de pycnomètre rempli d'eau

m_2 : La masse de pycnomètre rempli d'Huile essentielle

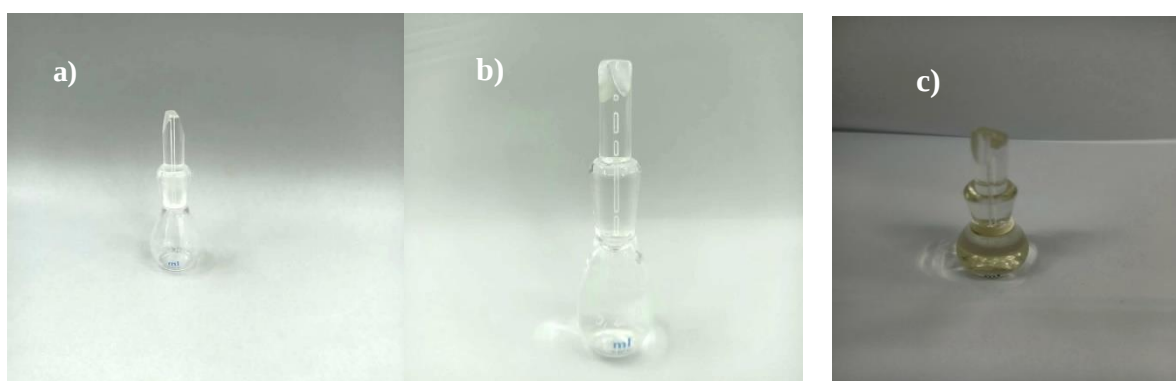


Figure 19 : Figure 19 (a) Pycnomètre vide (b) pycnomètre rempli d'eau distillé (c) pycnomètre rempli d'HE.

2) Indice de réfraction

L'indice de réfraction a été établi en lisant directement l'angle de réfraction à l'aide d'un réfractomètre CARL ZEISS JENA, en utilisant la lumière d. Les indices de réfraction des liquides à une température de 20 °C sont référencés dans les manuels sous forme de valeurs standards. Pour les composés organiques, il a été observé que l'indice de réfraction diminuait de 0,0004 pour chaque hausse de 1 °C. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire de toujours ajuster les calculs à la température de 20 °C.

L'indice de réfraction η_D^{20} à la température de référence $t=20^\circ\text{C}$ η_D^{20} est déterminée par la formule suivante

$$\eta_D^{20} = \eta_D^{T'} + 0.0004(T' - 20) \quad (3)$$

η_D^{20} : est la valeur obtenue à la température t' .

L'instrument est calibré pour fournir une valeur de 1,333 à 20 °C, une mesure précise qui s'applique aux liquides, notamment l'eau distillée, garantissant ainsi une fiabilité optimale dans les applications scientifiques et industrielles.



Figure 20 : Réfractomètre CARL ZEISS JENA.

3) Indice d'acide

Il s'agit de la quantité de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides libres présents dans un gramme d'huile essentielle. Le processus de neutralisation des acides libres est réalisé à l'aide d'une solution éthanolique de KOH 0.1M titrée. Ce dosage a été établi conformément à la norme NF T 75-103. L'indice d'acide est donné par la formule suivant :

$$I = \frac{V \cdot C \cdot 56.11}{m} \quad (4)$$

Avec :

V : Volume, en ml de la solution de KOH utilisée pour le titrage

C : Concentration exacte en moles par litres de la solution KOH

m : masse en gramme de la prise d'essai.

4) Indice de saponification

L'indice de saponification I_s est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libères et à la

saponification des esters présents dans 1 g de substance.

On introduit dans un ballon en verre 1 g d'HE contenant 23.5 ml de la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) (0,5 mol/l). L'ensemble est placé sur une source de chaleur et relié à un réfrigérant, puis on laisse chauffer à 100 °C pendant une heure. Ensuite, on ajoute, après refroidissement, 21.7 ml d'eau distillée et 5 gouttes de phénol phtaléine (2 %) indicateur coloré et on titre l'excès de KOH avec une solution de HCL (0,5 mol/l).

La formule pour le calcul de cet indice est la suivante

$$I_s = \frac{56.1 \cdot N \cdot (v_1 - v_2)}{M} \quad (5)$$

V1 = volume en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique (0,5mol/l) utilisé pour l'essai à blanc

V2= volume en millilitres, de la solution d'acide chlorhydrique (0,5 mol/l) utilisé pour la détermination de l'indice

N= normalité de KOH

M = masse en grammes, de la prise d'essai (2g)

4) Indice d'ester (Ie)

L'indice d'ester exprime en mg la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des esters présents dans 1 g de substance. Il est calculé à partir de l'indice de saponification et de l'indice d'acide. La formule pour le calcul de cet indice est la suivante

$$I_e = I_s - I_a \quad (6)$$

IV.6 Analyses chromatographique et méthodes spectroscopiques

IV.6.1 Analyse chromatographique CG-SM d'huile essentielle d'origan

Cette analyse a été effectuée au laboratoire chromatographie au centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques (CRAPC) Bousmail Tipasa. Le spectromètre de masse **Hewlett Packard Agilent 5973** à impact électronique, couplé à un chromatographe en phase gazeuse **Hewlett Packard Agilent 6890 plus** a été utilisé. Une colonne HP-5MS été utilisé de longueur de 30 m, diamètre interne de 0,25 mm, épaisseur du film de 0,25 une Phase stationnaire 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane.

Conditions opératoires de l'analyse

➤ Injecteur

Température : 250°C.

Mode d'injection split : 1,50.

Volume injecté : 0.2µl.

➤ Colonne

Type : HP-5MS.

Dimensions : long 30 m*D int 0.25mm*épaisseur film 0.25µm.

Phase stationnaire : 5% Phenyl 95% dimethylpolysiloxane.

➤ Température du four

45°C pendant 8min, 2°C/min jusqu'à 250°C, isotherme 10 min.

Durée d'analyse : 120 min.

Gaz vecteur : Hélium pur 6.0.

Débit GV : 0.5 ml/min.

➤ Détecteur de masse

Mode d'analyse : Scan.

Délai du solvant : 3 min.

Température de l'interface : 270°C

Type d'ionisation : Impact électronique.

Intensité du filament : 70 év.

Type de l'analyseur de masse : Quadripôles.

Température de la source : 230 °C.



Figure 21 : Spectromètre de masse CG-SM.

IV.6.2 Analyse par UV-Visible

Le spectrophotomètre de marque SHIMADZU 8900 a été utilisé pour analyser l'échantillon, en se concentrant sur la plage de 200 à 500 nm. Nous avons mélangé quelques gouttes d'huile essentielle d'origan avec le même volume de méthanol. La solution a été examinée par spectrophotométrie dans l'UV-visible en remplissant une cuvette en quartz avec la solution, puis en l'insérant dans la chambre pour obtenir le spectre et par la suite le décoder.



Figure 22 : Spectrophotomètre type SHIMADZU

IV.6 .3 Analyse par FTR-IRFT

La spectrophotométrie infrarouge est une technique de caractérisation qui nous permet d'analyser et d'identifier la nature des liaisons chimiques et des groupements fonctionnels présents dans notre huile.

Pour la caractérisation de l'huile essentielle, une pastille de **KBr** est préparée, et on étale une goutte d'HE sur cette pastille pour être analysé dans l'appareil de spectroscopie infrarouge. de la marque FTIR- 8900 shimadzu au sein de notre département.



Figure 23: Spectrophotomètre de marque FTIR- 8900 shimadzu.

IV.7 Extraction du chitosane à partir de des carapaces

IV.7.1 Prétraitement de la carapace

Avant leur utilisation, les carapaces sont d'abord débarrassées de leurs antennes et leurs pattes. Elles subissent ensuite un prétraitement qui consiste en un lavage intense afin d'éliminer les résidus organiques (tissus) et bouillis pendant 1 heure, après ça elles sont lavées une seconde fois et enfin séchées à l'air libre. Après séchage, les carapaces sont débarrassées une dernière fois d'éventuels tissus encore présent.

IV.7.2 La déminéralisation

L'extraction des minéraux, à savoir le carbonate de calcium et le chlorure de calcium, a été réalisée sous les conditions optimales obtenues

- Température ambiante.
- Concentration de HCl 2-3M.
- Temps de réaction pendant 24h.

Vu que le rapport poids de carapace de crevette par le volume d'acide chlorhydrique était sans effet sur l'étape de déminéralisation, nous avons opté pour un rapport solide/solvant égale à 1/15 (g/mL) dans le souci de maintenir une certaine fluidité durant la réaction.

L'agitation étant maintenue constante en utilisant un agitateur magnétique.

En fin de réaction, le surnageant est éliminé par filtration, le culot retenu est rincé abondamment avec l'eau du robinet pour retirer l'acide, chlorure de calcium et les impuretés jusqu'à la neutralité, et contrôlant le pH de l'eau du rinçage.

Les éventuelles impuretés sont ensuite éliminées, puis les échantillons sont lavés à l'eau distillée[96].

IV.7.3 Déproténisation

Les échantillons déminéralisés ont subi un traitement avec 10 % de NaOH à température ambiante pendant 24 heures, les éventuelles impuretés sont ensuite éliminées, puis les échantillons sont lavés à l'eau distillée.

Ensuite, les échantillons ont été immergés dans de l'eau distillée avant d'être séchés. Le produit final est la chitine, qui est ensuite caractérisée [96].

IV.7.4 Blanchiment

Il est nécessaire de décolorer la chitine obtenue à partir de l'échantillon. Elle a initialement été combinée avec de l'acétone dans un ratio de (110) solide/solvant pendant 10 minutes, puis le mélange est filtré et séché pendant 2 heures à température ambiante.

La chitine est ensuite décolorée à l'aide d'hypochlorite de sodium (0,315 %) pendant 5 minutes. Une fois filtrée la chitine, lavée et séchée [96].

IV.7.5 Désacétylation la chitine en chitosane

La préparation du chitosane en milieu alcalin consiste à retirer les groupes acétyle de la chitine à l'aide d'une solution de NaOH à 50 % (115), ce qui donne du chitosane.

Cette opération est effectuée avec une solution de NaOH à 50 % dans un rapport solide/solution de 115 (w/v) à une température de 50 °C pendant 24 heures. Les échantillons ont ensuite subi un filtrage et un lavage à l'eau distillée jusqu'à neutralité, suivie lavage à l'éthanol puis séchage dans une étuve à 60C° pendant 3h. Pour la caractérisation [96].

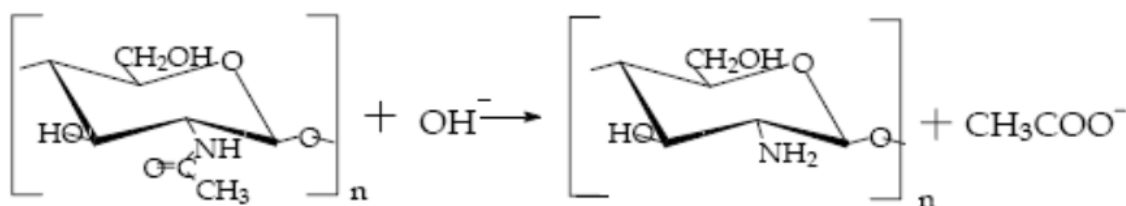


Figure 24 : Transformation de la chitine en chitosane.

Le schéma suivant résume le procédé d'extraction de la chitine et du chitosane non dégradé et parfaitement soluble dans les milieux acides dilués

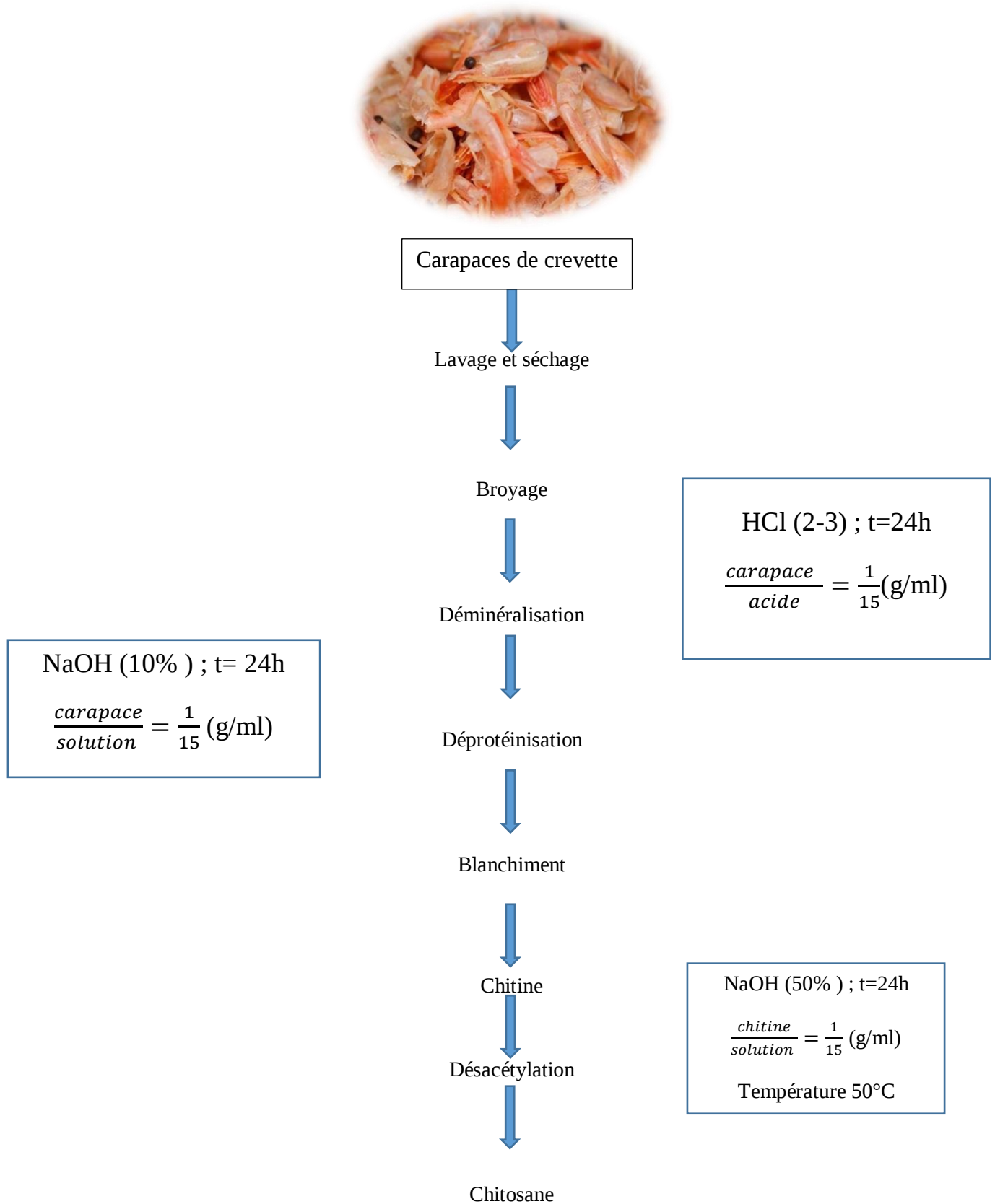


Figure 25 : Procédé d'extraction de la chitine et du chitosane.

IV.8 Cratérisation du chitosane

IV.8.1 Observation au microscope optique du chitosane : ont été observées au microscope optique au niveau du laboratoire gestion déchet au niveau de département génie du procédé.

A. Microscope polarisant

Le microscope polarisant, appelé aussi microscope polariseur analyseur ou microscope pétrographique, est un microscope optique muni de deux filtres polarisants, appelés respectivement polariseur et analyseur, il est utilisé en pétrographie pour l'observation et l'identification des minéraux.

B. Stéréoscope

Un Stéréoscope est un dispositif optique à aculaires, à prismes ou à miroirs, destiné à l'examen des couples de vues stéréoscopiques à faible grossissement .il permettent d'observer d'une façon plus claire les objets sombre ou claire placés sur un fond et éclaires à l'aide d'une lampe.

IV.8.2 Analyse par spectroscopie Infra- rouge FTR du chitosan

Pour le chitosane, on était préparé une pastille (1/3 de la poudre du chitosane et 2/3 de KBr) puis on lance l'analyse dans l'appareil de spectroscopie infrarouge de la marque 8900 shimadzu au sein de notre département.

IV.8.3 Solubilité

En raison de sa cristallinité élevée, la chitine ne se dissout que dans des solvants rares, ce qui restreint son utilisation et sa valorisation. En réalité, elle ne se dissout que dans le 2-hexafluoropropanol, ou dans des combinaisons telles que le diméthylacétamide/chlorure de lithium, ou encore l'acide trichloroacétique/dichloroéthane [97].

Le chitosane est insoluble dans l'eau, les acides concentrés, les bases et les solvants organiques, mais peut se solubiliser dans des solutions acides diluées telles que l'acide chlorhydrique, l'acide formique, l'acide acétique, l'acide oxalique et l'acide lactique à pH < 6,5. L'acide phosphorique, l'acide sulfurique, l'acide citrique et l'acide sébacique ne sont pas de bons solvants pour le chitosane [98].

IV.8.4 Poids moléculaire du chitosan

La connaissance de ce paramètre est très importante pour leur utilisation industrielle et leur application dans les différents domaines de recherche. En effet, la conductivité, la densité, la tension de surface et la viscosité des solutions du chitosane sont significativement affectées par le poids moléculaire.

Plusieurs méthodes ont été élaborées pour déterminer le poids moléculaire du chitosane, notamment la viscosité [99]



Figure 26 : Rhéomètre de type Anton Paar (MCR 302).

IV.8.5 La Diffraction par rayons X (DRX)

La Diffraction par rayons X est une technique d'analyse qui permet d'étudier les différentes phases de matières et matériaux cristallins.

La DRX permet d'accéder à de nombreuses informations sur l'arrangement des éléments sein d'un matériau. Elle permet ainsi d'identifier le ou les composés et leurs formes cristallographiques. Elle consiste à faire diffracter les rayons X sur un échantillon solide plat ou sous forme de poudre [100].



Figure 27 : Diffraction par rayons X.

Mode opératoire

Le but est de déterminer la forme cristalline du chitosane, pour réaliser l'analyse, on dépose une quantité de l'échantillon dans le porte-échantillon de l'équipement et on lance l'analyse sans traitement particulier. Le rayonnement utilisé est $K\alpha$ du cuivre à la longueur d'onde λ , le balayage a été fait dans le domaine $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$. Le résultat est présent sous forme de diffractomètre.

IV.8.6 La diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS), également connue sous le nom de spectroscopie de corrélation de photons (PCS) ou diffusion quasi-élastique de la lumière, est une technique précieuse. La DLS permet la détermination de la taille des solutions de polymères. En analysant la modulation de l'intensité de la lumière diffusée dans le temps lorsqu'un laser traverse la solution, la DLS mesure la taille hydrodynamique des particules. Cette taille est liée au mouvement brownien des particules, les particules plus petites diffusant plus rapidement que les plus grosses [101].

La DLS fournit des informations précieuses sur la taille des particules, l'indice de polydispersité sur la distribution de leur taille et leur stabilité colloïdale, et le potentiel zêta pour déterminer leurs propriétés électrostatiques.

Protocole

Pour la caractérisation par DLS et la mesure du potentiel zêta et de l'IP, nous avons suivi une procédure spécifique. Trois échantillons ont été préparés pour l'analyse. Il est dilué en ajoutant 1 ml de l'échantillon à 100 ml d'eau distillée. Cette dilution a été effectuée afin d'obtenir des résultats plus précis et de minimiser les effets de la concentration élevée de particules dans l'échantillon. Les échantillons ont ensuite été transférés dans les cuves appropriées pour l'analyse dans l'appareil de DLS. Nous avons utilisé un instrument de DLS de marque HORIBA qui intègre aussi des options capables outre la taille des particules, de déterminer également le PZ ainsi que l'IP.

- **Condition opératoire**

- Angle de diffusion : 90° .
- Température du support : 25°C .
- Viscosité moyenne de dispersion : 0.896 mPa.s.
- Conductivité : 0.057 mS/cm.



Figure 28 : La diffusion dynamique de la lumière de marque HORIBA.

IV.9 Activités biologiques

IV.9.1 Activité antioxydante

La méthode de DPPH reste largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydante. Elle vise à mesurer la capacité de l'huile essentielle à piéger le radical relativement stable, 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). Le piégeage des radicaux libres de DPPH provoque un changement de couleur de la solution initiale du violet foncé au jaune suite à la réduction du DPPH en DPPH-H (diphényl-picrylhydrazine).

Protocole

La réaction est réalisée dans un volume total de 2 ml contenant 0,4 ml de DPPH à 0,5 mM solubilisé dans l'éthanol. Les échantillons d'huiles essentielles ont été préparés par dissolution dans l'éthanol absolu à raison de 1,25 µl/ml, ces solutions dites solutions mères subiront ensuite des dilutions pour obtenir les concentrations finales de 0,0005%, 0,001%, 0,005%, 0,01%, 0,05% et 0.1% . Les concentrations à 0,5% et 1% ont également été préparées par dissolution dans l'éthanol à raison de 5 µl/ml et 10 µl/ml respectivement. Ces mêmes concentrations ont été préparées avec l'acide ascorbique et l'α-tocophérol pour servir en tant que contrôles positifs. On réalise également un blanc avec l'éthanol absolu seul.

Les échantillons sont ensuite laissés à l'obscurité pendant 30 minutes et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution du DPPH est mesurée à 517 nm. L'activité antioxydante est estimée selon l'équation suivante

$$I (\%) = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs test})}{\text{Abs controle}} \times 100 \dots \dots \dots (7)$$

I : pourcentage d'inhibition des radicaux libre.

Abs test : absorbance de la solution de DPPH en présence de l'huile essentielle.

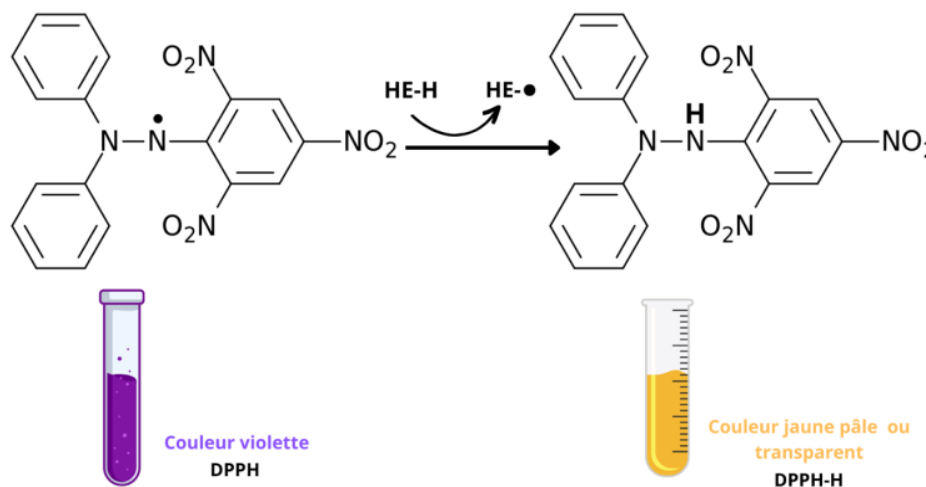


Figure 29 : Représentation schématique de l'activité antioxydante de l'HE avec le DPPH.

IV.9.1.2 Détermination de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀)

L'IC₅₀, également connue sous le nom de concentration inhibitrice à 50%, représente la quantité ou la concentration d'antioxydants (qu'il s'agisse d'un extrait ou d'une autre substance antioxydante) nécessaire pour inhiber ou éliminer 50% des radicaux. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement en fonction des pourcentages d'inhibition observés pour différentes concentrations des extraits testés. Une courbe de régression linéaire ($Y = aX + b$) est établie pour chaque extrait afin de déterminer l'IC₅₀, qui permet de caractériser le pouvoir antioxydant des extraits. Une valeur d'IC₅₀ faible indique une activité antioxydant élevée.

IV.9.2 Activité antibactérienne

Pour évaluer l'activité antibactérienne d'HE étudiée et des membranes synthétisés plusieurs tests ont été réalisés au niveau de notre laboratoire (LGC) par notre Co- Promotrice ABIR Chahrazad après l'avis favorable de notre promotor.

IV.9.2.1 Protocole expérimental pour évaluer l'activité antimicrobienne

a) Ré isolement des souches bactériennes (ATCC/Pathogène) : Afin de réisoler les souches bactériennes d'ATCC/Pathogène dans le milieu gélose nutritive GN, on a suivi les étapes suivantes :

- Prélever grâce à une anse de platine stérile quelques colonies bien isolées de la souche bactérienne des 7 souches bactériennes à étudier et effectuer par la suite un ensemencement enstries sur la surface du milieu GN solide, ont répété l'opération pour chaque boîte de Pétri, on incube ensuite les boîtes à 37°C dans une étuve pendant 18 à 24 heures, On identifie les boîtes avec le nom, le code de la souche bactérienne.

b) Préparation de la suspension bactérienne : La préparation de la suspension bactérienne est une étape importante pour réaliser l'aromatogramme, voici les principales étapes à suivre

- A partir de cultures jeunes (18 heures) sur les milieux de Géloses nutritives (GN), on prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques qu'on transfère dans 5 ml d'eau physiologique stérile.
- On agite ensuite au vortex pendant quelques secondes pour homogénéiser chaque suspension pour chaque germe étudié. Ensuite, il est important de standardiser les suspensions à une densité optique de 0,5 à 0,6 Mc Farland à l'aide d'un densimètre, La suspension bactérienne est prête à être utilisée pour les tests d'activité antibactérienne.

c) Ensemencement : L'ensemencement des souches bactériennes se fera par écouvillonnage sur un milieu MH par dans trois directions, en effectuant une rotation d'environ 60 degrés à chaque fois en réalisant des stries serrées. Le même processus est répété pour chaque suspension bactérienne à tester.

d) Réalisation de l'aromatogramme : L'aromatogramme est une technique qui permet de tester l'activité antibactérienne des huiles essentielles, Pour ce faire, nous utiliserons deux méthodes, à savoir la méthode de diffusion sur milieu solide des disques vierges et la méthode de puits, Un disque stérile de 6 mm de diamètre imprégné d'une quantité connue d'huile essentielle est déposé sur le milieu gélosé préalablement ensemencé avec une culture microbienne, le schéma ci-dessous explique les étapes de chaque méthode

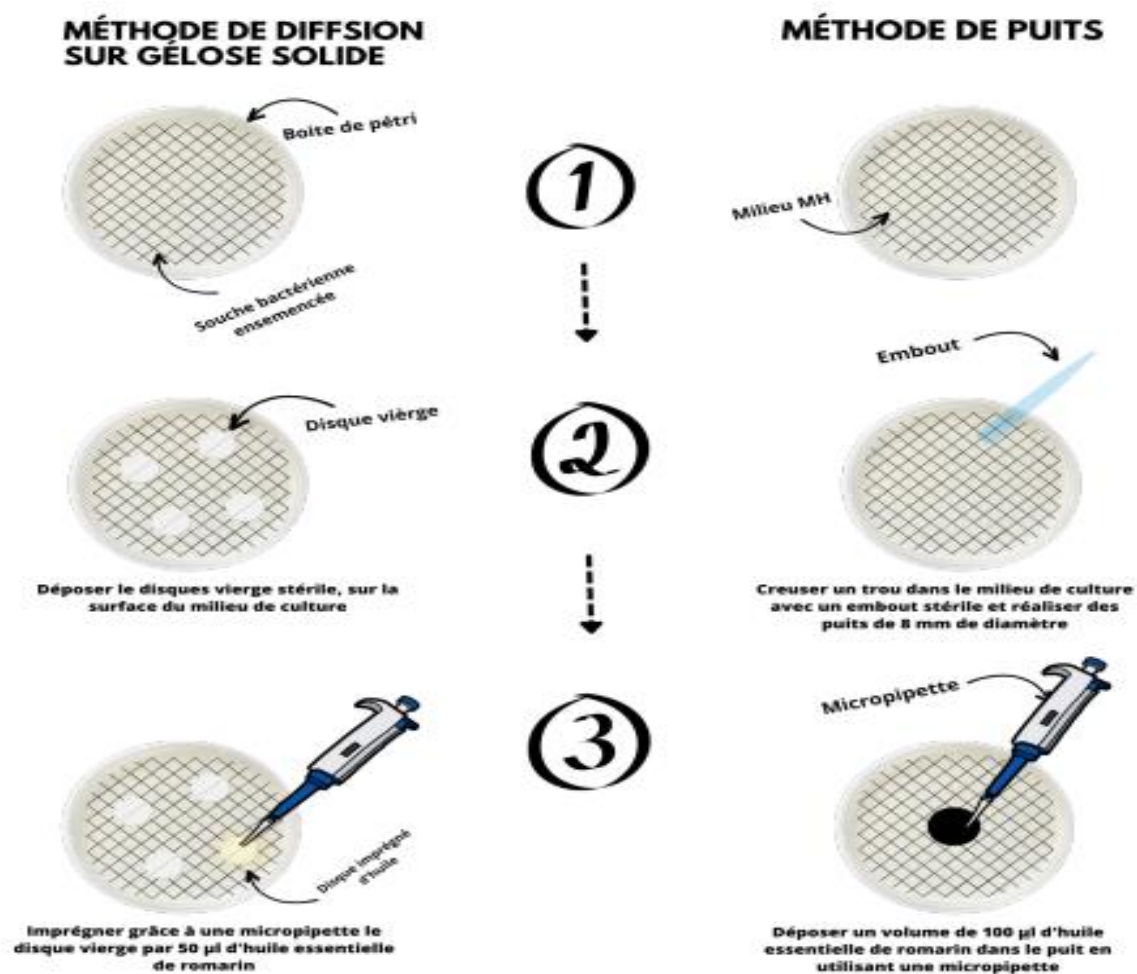


Figure 30 : Schéma représentant les différentes étapes de réalisation de l'aromatoگرامme.

À la suite de l'incubation à 37°C pendant 18 à 24h, on procédera à la lecture des résultats, les résultats d'un aromatoگرامme peuvent être interprétés en mesurant la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour des disques ou des puits contenant l'HE, c'est-à-dire la zone où les micro-organismes ne se sont pas développés [102].

Après incubation, la lecture des résultats se fait par mesure des diamètres des zones d'inhibition en millimètre.

Tableau 9 : Classification les zones d'inhibitions

Diamètre	Disruption
8 mm	sensibilité nulle
9 à 14 mm	Sensible
15 à 19 mm	sensibilité qualifiée de très sensible
Supérieur 20 mm	extrêmement sensible

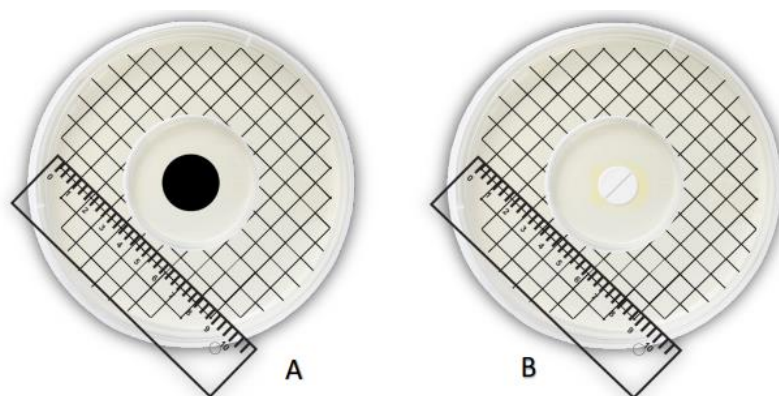


Figure 31 : Illustration de la lecture du résultat de l'aromatogramme. A Méthode de puits, B Méthode de disques.

IV.9.2.2 Principe de la méthode d'aromatogramme

La méthode de diffusion sur disque, appelée aussi méthode de Vincent ou technique de l'aromatogramme ou technique de l'antibioaromatogramme. Cette technique inspirée de celle des antibiogrammes, a été généralisée aux huiles essentielles. Elle consiste à utiliser des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Le principe de cette méthode est toujours la migration de l'HE par diffusion dans la gélose [103].

IV.9.2.3 Protocole expérimentale

➤ Préparation du milieu

Le milieu Mueller-Hinton est chauffé dans un bain marie, après on verse aseptiquement une couche du milieu dans des boîtes de pétri et on laisse solidifier.

➤ Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune de 18h pour les bactéries, on réalise des suspensions troubles en prélevant 2 colonies bien isolées et identiques, qu'on dépose 5ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex.

➤ Dépôt des disques

A l'aide d'une micropipette, on prélève 0µl de chaque dilution d'huile essentielle pure et avec le DMSO, on dépose chaque quantité prélevée sur le disque posé préalablement à l'aide d'une pince stérile sur la surface de la gélose ensemencée, on laisse diffuser pendant 10min. Enfin, incuber à 37°C pendant 24h pour les bactéries.

➤ Préparation des dilutions d'HE

En utilise pour les l'activité antibactérienne et antifongique

IV.9.2.4 Concentration minimales inhibitrice (CMI)

Nous avons déterminé les *CMIs* d'huile essentielle extraite sur les souches bactériennes testées sensibles par la méthode d'aromatogramme en milieu gélosé.

Une gamme de dilution de **HE** testée est réalisée dans de Diméthylsulfoxyde (DMSO) de différents concentration, comme il est mentionné dans le tableau suivant

Tableau 10 : Représentation de dilution d'huile essentielle.

Nombre de dilution	Quantité HE (%)	Quantité DMSO (%)
1	100	0
2	50	50
3	25	75
4	12.5	87.5
5	6.25	93.75
6	3.125	96.875

IV.9.3 Évaluation de l'activité antifongique in vitro

L'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle ont été examinés pour les trois souches de champignons précédemment mentionnées. De manière similaire à l'évaluation de l'activité antibactérienne, deux méthodes complémentaires ont été utilisées pour garantir une évaluation exhaustive de l'effet inhibiteur de l'huile essentielle. La méthode de puits a été employée, permettant de déterminer la capacité de l'huile à inhiber la croissance fongique en observant les zones d'inhibition autour des puits contenant l'huile. De plus, la méthode de diffusion sur milieu solide a été mise en œuvre, où des disques imbibés d'huile ont été placés sur des géloses fongiques pour évaluer leur capacité à induire une inhibition de la croissance fongique.

L'utilisation de ces deux méthodes complémentaires assure une évaluation robuste de l'activité antifongique de l'huile.

IV.10 Protocole des membranes

a. Préparation de polymère

Dissoudre 2g du chitosane dans l'acide acétique 1%, chauffer à 50 -60°C sous agitation jusqu'à dissoudre complète et formation d'une solution homogène et visqueuse.

Laisser refroidir à température ambiante.

b. Emulsification d'huile

L'huile essentielle d'origan (0,5 à 2%) a été introduite dans une solution contenant du Tween 80 (0,2-0,5%) et de petite quantité de l'eau distille. Le mélange a été agité magnétiquement jusqu'à l'homogénéisation complète pendant 10-15 minutes pour obtenir une solution stable.

c. Incorporation de l'émulsion dans la solution de chitosane

Ajouter lentement l'émulsion dans la solution du chitosane sous agitation continue.

Optionnel soniquer doucement le mélange pendant 5-10 min pour améliorer la dispersion puis ajouter 1ml de glutaraldéhyde pour la réticulation des membranes.

d. Coulage des membranes

Verser la solution homogène dans une boîte de pétrie en verre et étaler uniformément pour obtenir l'épaisseur désirée.

e. Séchage

Laisser sécher à 50°C pendant 6-8 heures

IV.10.1 L'activité antimicrobienne de membranes synthétisées

IV.10.1.1 Principe de la méthode de puits

C'est la technique de base utilisée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet anti microbien, elle est aussi appelée la technique de dilution en gélose pour la détermination des extraits actifs [104].

IV.10.1.2 Protocole expérimentale

Des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller Hinton agarensemencée aseptiquement par une suspension qui provient d'une culture jeune de bactéries respectivement. L'ensemencement se fait par écouvillonnage. Après le séchage des boîtes, la gélose est perforée au centre à l'aide de la partie supérieure d'une pipette Pasteur. On a coupé les membranes sous forme des disques de 6 mm et on les placés dans les cavités formées.

Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h. L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits. La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibitions. Un produit est considéré actif, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8 mm.

IV.10.1.3 Principe de la méthode d'aromatogramme

On a suivi le même protocole précédent sauf en place directement les disques de membrane (6mm) sur le milieu. Les boîtes sont mises à incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h.

IV.10.2 Activité antifongique des membranes

On applique le même protocole de l'activité antibactérienne sauf en a utilisé le milieu saborand et deux espèces fongiques.

IV.10.3 Infra- rouge ATR

Dans cette étude, un spectrophotomètre à transformée de Fourier, équipé d'un détecteur (DTGS KBr) à haute performance (1000-375 cm⁻¹), une source infrarouge moyen (4000-400 cm⁻¹) d'un rayonnement de laser et une séparatrice (XT-KBr) ont été utilisés. Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OPUS viewer sous le système d'exploitation Microsoft Windows 7. Après avoir nettoyée avec l'eau distillée et l'acétone et le fond infrarouge a été recueilli, notre membrane signifie est directement déposée sur le cristal de réflexion de l'accessoire, elles doivent être dans une position précise au-dessus du cristal de diamant.

En fait cette analyse au niveau de pavillon 8 en laboratoire plant médicinal de Pr. Hatab.



Figure 32 : Spectrophotomètre ATR-IRFT.

IV.10.4 Etude de la libération prolongée d'huile

Nous avons fait appel à des cellules de FRANZ pour vérifier la libération d'huile par les membranes synthétiques au fil du temps, étant donné que l'usage de ces membranes est prévu pour une application cutanée.

Description de la cellule de FRANZ

La cellule de Franz est une méthodologie largement utilisée pour évaluer la perméation in vitro, qui présente des avantages, tels qu'une faible quantité de médicament nécessaire à l'analyse. Avec la montée de la médecine personnalisée, il est nécessaire de développer différentes formes posologiques pharmaceutiques pour la même molécule active permettant la variabilité d'administration et de dosage.

La cellule de FRANZ se compose par quatre composés principaux comme illustré dans la (Figure 33)

1. Compartiment donneur,
2. Compartiment récepteur,
3. Membrane semi-perméable au-dessus s'étale la quantité de l'émulgel,
4. Ouverture de prélèvement,
5. Double membrane pour la circulation d'eau d'échauffement,
6. Agitateur magnétique.

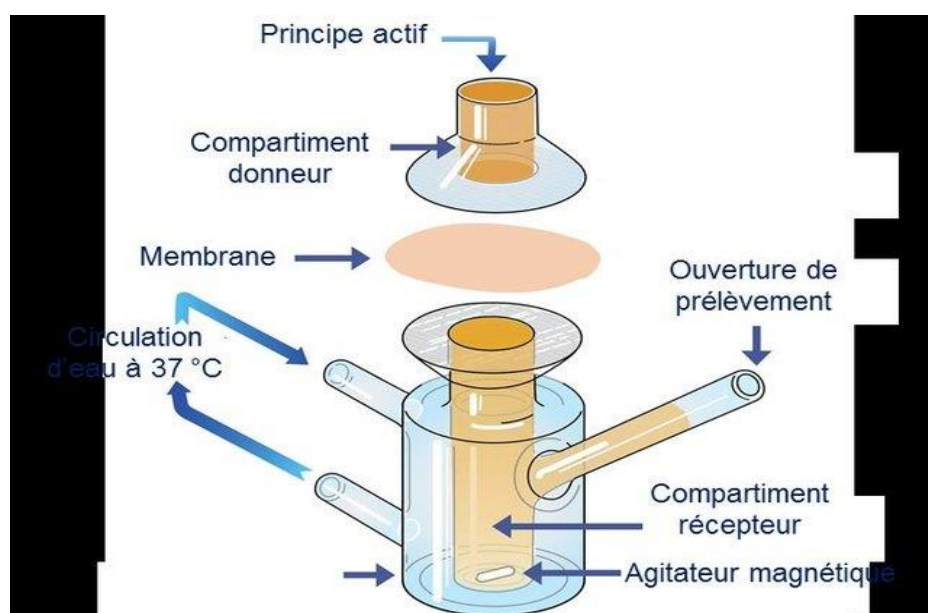


Figure 33 : La cellule de diffusion de FRANZ utilisée dans ce travail

Protocol

1. Préparation de la membrane

- Hydrater la membrane dans une solution tampon $\text{pH}=7.4$.
- S'assurer qu'elle est bien intacte et sans bulles d'air.
- Découper la bonne taille de la membrane.

2. Assemblage de la cellule de Franz

- Remplir le compartiment récepteur avec le milieu de diffusion (tampon), en évitant les bulles.
- Placer la membrane entre la partie donneuse et la partie réceptrice.
- Fixer solidement les deux compartiments.
- Placer un agitateur magnétique dans la chambre réceptrice.
- Mettre la cellule sur un bain thermostatique (37 °C typique pour peau humaine, température à ajuster selon les conditions physiologiques ou expérimentales).

3. Application de la formulation

- Appliquer la membrane formulée sur la membrane (La masse=0.192g).
- Fermer la chambre donneuse avec un bouchon ou un film pour éviter l'évaporation.

4. Prélèvements

- À des temps déterminés (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h...), prélever un volume défini.

5. Analyse des échantillons

- Utiliser une méthode analytique adaptée au composé étudié UV-visible.

CHAPITRE V : Résultats et discussions

V.1 Extraction et rendement en huile essentielle

La quantité du HE récupérer 20 ml à partir de 2kg de plante sèches, par décantation et élimination de l'hydrolat L'huile essentielle d'origan obtenu par l'hydrodistillation est pesée afin de calculer le rendement d'extraction et conservées à une température de 4°C au réfrigérateur dans des flacons opaques à l'abri de la lumière.

Le rendement de l'extraction de l'huile essentielle calculé en fonction de la matière végétale sèche de la plante est de 2.56%.

- Cinétique d'extraction

Cette étude a permis de suivre la cinétique d'extraction de l'HE d'origan en fonction du temps. Elle est présentée dans la figure suivante :

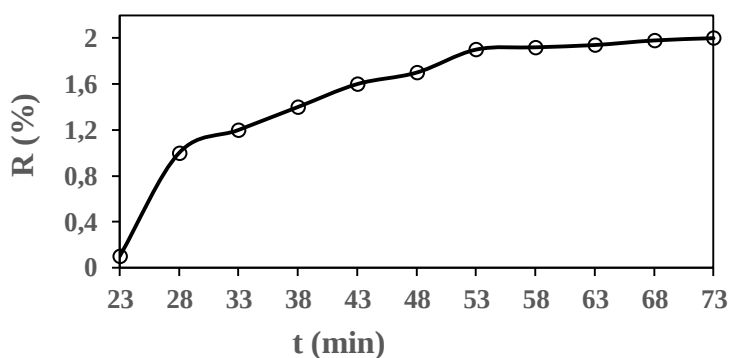


Figure 34 : Variation de rendement d'extraction en fonction de temps.

La courbe de la cinétique d'extraction de l'HE se caractérise par une partie ascendante où la majeure partie de l'huile extraite correspond à un temps de 73 minutes. L'allure de la courbe représentée confirme l'existence de 3 étapes

La première étape, est caractérisée par une augmentation rapide de l'extraction au bout de 30 minutes, cela peut s'expliquer par un entraînement massif de l'HE (environ 90% de l'HE a été récupérée) ;

La deuxième étape (30-50) minutes, un ralentissement de l'extraction par rapport à l'étape précédente où le taux d'extraction diminue de la valeur de la quantité globale recueillie ;

La dernière étape correspondant à la stagnation du volume de l'HE. Elle indique la fin d'extraction. Donc la durée maximale est de 53 à 73 minutes pour récupérer le maximum de l'huile essentielle.

V.2 Caractérisation de l'huile essentielle.

V.2.1 Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques sont résumées dans le tableau suivant

Tableau 11 : Les caractéristiques organoleptiques de l'HE d'*Origanum vulgare*.L.

Espèce	Aspect	Couleur	Odeur	Flaveur
<i>Origanum vulgare</i> .L (ce travail)	Liquide, limpide	Jaune claire	Aromatique, carvacrol	Piquante, épicée
<i>Origanum Vulgare</i> type Espagne	Liquide, limpide	Jaune foncé	Caractéristique aromatique	Phénolique, épicée

On constate que ces paramètres organoleptiques de l'huile essentielle étudiée sont conformes avec ceux répertoriés.

V.2.2 Caractérisation physico-chimique de l'huile essentielle

La caractérisation de l'huile essentielle de l'*Origanum Vulgare* .L, Les résultats des indices physico-chimiques sont regroupés dans le tableau

Tableau 12 : Caractérisation physico-chimique d'HÉO

Paramètre	Résultats d'HÉO
d_{20}^4	0.9399
η_D^{20}	1.513
Is	22.13
Ia	12.29mg /g
Ie	9.84

Selon la norme AFNOR (2000) on a trouvé que

- ✓ l'indice de réfraction de l'HÉO extrait à partir des feuilles d'origan vulgare est situé à l'intérieur de l'intervalle compris entre 1.50-1.51 avec une valeur de 1.513.
- ✓ La densité à 20°C de l'huile essentielle d'origanum de la région Médéa possède une valeur de 0.9399 compatible avec le domaine de densité approuvé par la norme AFNOR (0.93-0.95)
- ✓ L'indice d'acide de l'HÉO obtenu par hydrodistillation de l'origanum est de 12.29mg/g. Cette valeur contribue à l'oxydation de cette huile et par conséquent cela conduit à son instabilité et sa capacité anti radicalaire.
- ✓ L'indice de saponification est important caractérisant la présence de fraction importante d'ester et à côté d'une quantité de composé acide.

- ✓ L'indice d'ester est un facteur de qualité pour l'huile essentielle. la valeur de 9.84 indique la présence de fraction de molécule se forme d'éther et d'ester carboxylique.

V.3 Analyses chromatographiques et spectroscopiques d'HE d'origan

V.3.1 Caractérisation par CG/SM

L'identification des composés de l'HE par CG/SM a été essentiellement basée sur la comparaison des spectres de masse de la molécule inconnue à celui d'un composé pur fourni par la base de données informatiques.

Le chromatogramme de la figure 35 et le tableau 13 résument l'ensemble des composés identifiés ainsi que leurs proportions.

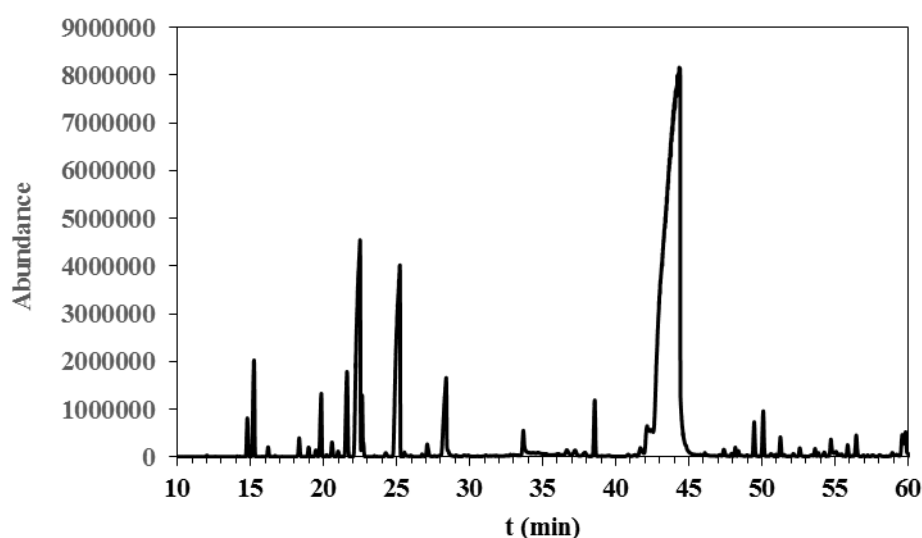


Figure 35 : chromatogramme CG-MS de l'huile essentielle *Origanum Vulgarae* .L

Tableau 13 : Compositions chimiques de l'HE d'*Origanum Vulgarae* .L

Nbr	tr (min)	Composé	Air	RI	Composition (%)
1	14.775	α -Thujene	48978834	921	0.56
2	15.228	α -Pinene	145179949	927	1.66
3	16.206	Camphene	13064300	940	0.15
4	18.332	β -Pinene	25418617	968	0.29
5	18.973	1-Octen-3-ol	13885113	976	0.16
6	19.459	3-Octanone	10351860	983	0.12
7	19.826	β -Myrcene	92004279	988	1.05
8	20.568	α -Phellandrene	21116524	948	0.24

9	20.977	δ ³ -Carene	8564721	1003	0.10
10	21.590	α-Terpinene	151062044	1011	1.73
11	22.457	p-Cymene	838165496	1022	9.61
12	25.127	γ-Terpinene	711978076	1057	8.16
13	27.103	α-Terpinolene	22572729	1082	0.26
14	28.346	Linalool	222470271	1099	2.55
15	33.686	4-Terpineol	47889246	1171	0.55
16	36.650	δ-1,8-Iridadiene	17067021	1212	0.20
17	37.205	Cis-Dihydrocarvone	16217708	1220	0.19
18	38.554	Carvacrol methyl ether	78647452	1240	0.90
19	42.150	Thymol	181044711	1291	2.08
20	44.323	Carvacrol	5,797E+09	1324	66.45
21	47.412	α-Copaene	11983540	1371	0.14
22	48.159	Geranyl acetate	10229502	1383	0.12
23	49.485	α-Gurjunene	48114713	1403	0.55
24	50.092	trans-Caryophyllene	66008772	1413	0.76
25	51.282	10s,11s-Himachala-3(12),4-diene	27930783	1433	0.32
26	52.588	Aromadendrene	13540861	1454	0.16
27	54.719	Ledene	32565483	1488	0.37
28	55.866	γ-Cadinene	15693283	1508	0.18
29	56.449	δ-Cadinene	34872893	1518	0.40

L'analyse de l'huile essentielle par CG-MS a permis d'identifier 29 composés.

Le chromatogramme de CG-MS est composé essentiel et monterpène à côté d'une carvacrol comme composé majoritaire (66.45%) indiquant ainsi que cette huile essentielle est chémotype carvacrol. à côté de ces composés une faible fraction de composé de sesquiterpène p-Cymène avec une teneur de 9.61%, suivi du γ-Terpinene à 8.16%. Puis le thymol avec une teneur de 2.08% puis α-Phellandrene, α-Pinène, β-Myrcene, α-Terpinène, contribuent à la composition de cette huile essentielle mais d'une façon moins prépondérante.

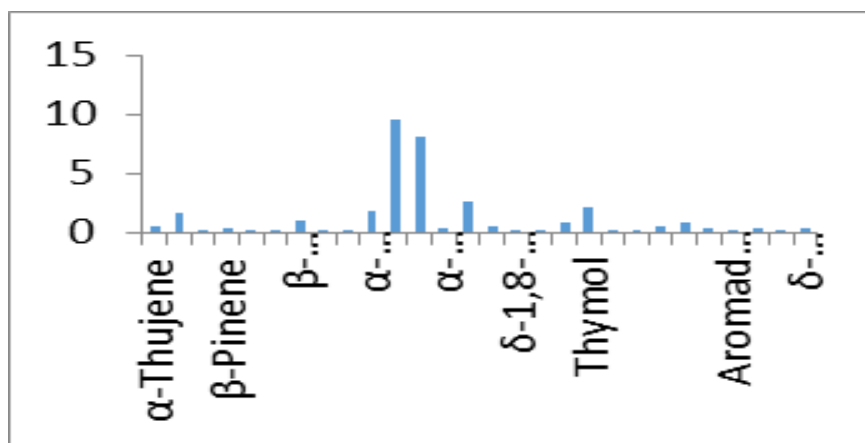


Figure 36 : Constituants de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*. L.

V.3.2 Caractérisation par UV-visible

Analyse UV-Visible de l'huile essentielle de l'origan

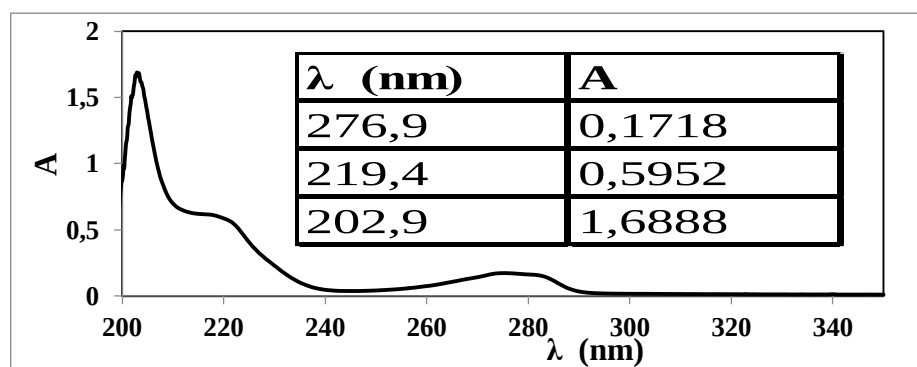


Figure 37 : Spectre UV-Visible de l'huile essentielle de l'*O Vulgarae*. L

Le spectre UV-Vis de l'huile essentielle de l'origan est caractérisé par la présence de 3 pics

Le 1er pic localisé à 203 nm est attribué à la transition électronique $\pi-\pi^*$ d'une double liaison d'un alterné d'un monoterpène ou d'un sesquiterpène cependant le 2ème pic sous forme de bande épaulée située à 219 nm caractéristique d'une l'excitation électronique $\pi-\pi^*$ d'une double liaison conjuguée et enfin une bande localisée à 277 nm spécifique des double liaisons altérées d'un noyau aromatique.

V.3.3 Caractérisation par ATR-IRFT

L'analyse IRFT d'HE est mentionnée dans le spectre suivant

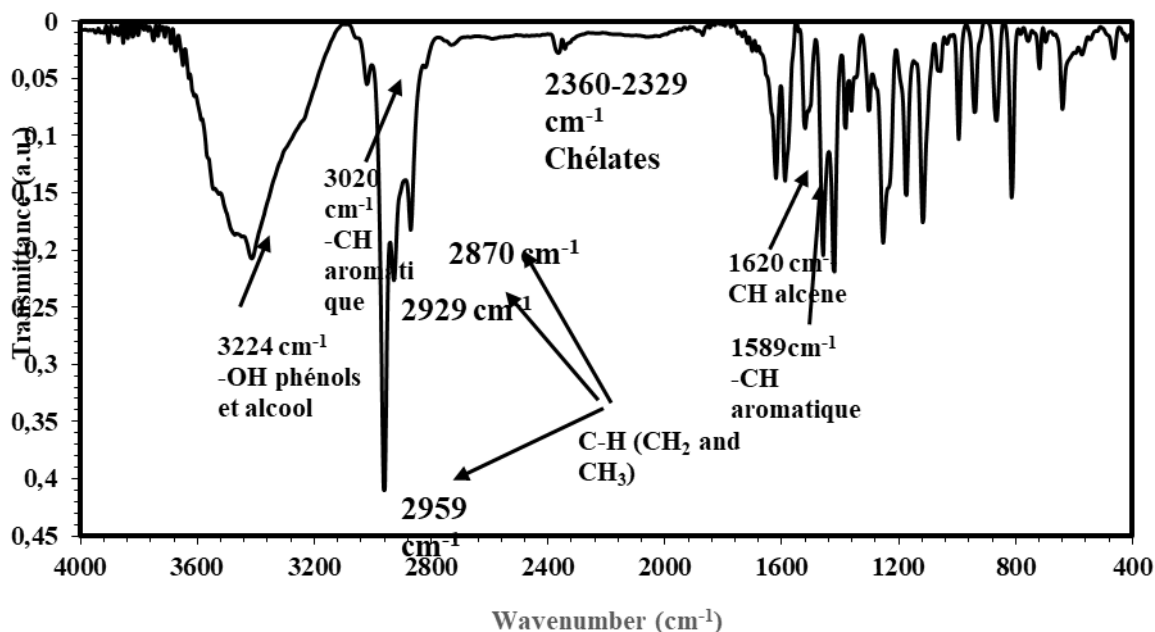


Figure 38 : Spectre infrarouge de l'huile essentielle d'*origan vulgare* .L

La figure présente le spectre IRTF de l'huile essentielle d'origan montre la présence d'une bande d'intensité moyenne située dans les environs de 3224 cm⁻¹ due à la fonction O-H d'alcool, Les fortes bandes à 2959, 2929 et 2870 cm⁻¹ sont attribuées aux élongations C-H asymétriques et symétriques dans les groupes aliphatiques -CH₃ et CH₂ (alcane) et cela peut confirmer la présence de p-cymene.

Les fortes bandes dans la gamme entre 1620 et 1589 cm⁻¹ (signal de l'étirement C=C-C) sont attribué à la vibration de liaison C=C, et plusieurs pics observés dans les régions 1300-500 cm⁻¹ liés à la flexion dans le plan et hors du plan des C-H aromatiques, respectivement, prouvent la présence de cycles aromatiques.

De plus, la présence du thymol est confirmée par les signaux typiques de la fonction phénolique, tels que la flexion des groupes O-H dans la gamme 3020 cm⁻¹,

Les spectres présentent aussi des pics caractéristiques pour le carvacrol [800-1200 cm⁻¹].

V.4 Activité biologique

V.4.1 L'activité antioxydant

L'aptitude antioxydante de l'huile essentielle d'O vulgare, jugée à l'aide du test de neutralisation du radical DPPH, a permis d'établir des graphiques du taux d'activité antiradicalaire pour cette huile et pour le BHT. L'activité antiradicalaire varie en fonction de la dose, puisqu'elle s'accroît avec l'augmentation de la concentration des échantillons.

Grâce à la cinétique du pourcentage d'activité antiradicalaire, nous avons pu déterminer l'IC₅₀, soit la concentration d'HE de BHT requise pour inhiber 50 % du DPPH dans l'environnement. Plus l'IC₅₀ est bas, plus l'activité antioxydante du composé est considérable. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs d'IC₅₀.

Tableau 14 : L'activité antioxydante du radical DPPH par l'HE d'*O.vulgarae*. L et le BHT.

Antioxydant	IC ₅₀ mg/ml
Huile essentielle d' <i>O.vulgarae</i> L.	1.8 mg/ml
BHT	28.5mg/ml

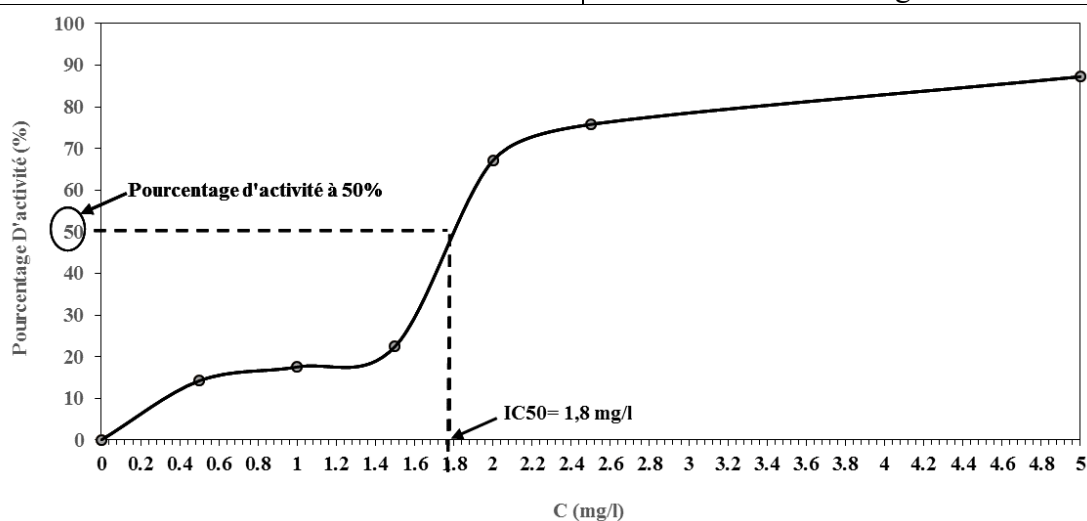


Figure 39 : Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de concentration d'HE.

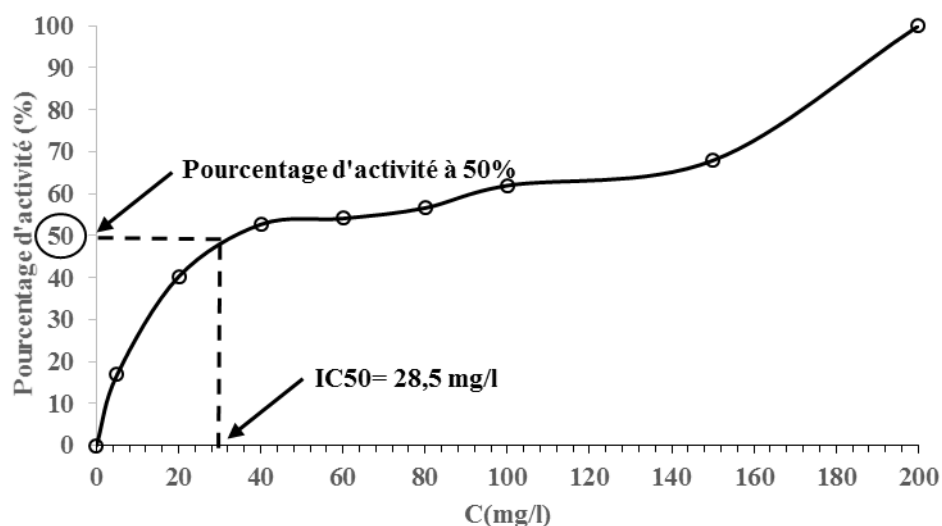


Figure 40 : Courbe représentant la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de concentration de BHT.

On remarque que l'activité antiradicalaire de l'HE (1.8 mg/ml) est inférieure à celle du

BHT (28.5 mg/ml), cela signifie que notre huile essentielle présente une activité considérable. Cela suggère que cette huile essentielle peut avoir un potentiel.

L'huile essentielle d'*origan Vulgarea*.L exhibe un fort potentiel anti oxydant vis-à-vis de l'oxydant model BHT. Son concentration d'inhibition à 50% est de 1.8 mg/ml par contre celui de BHT égale à 28.5 mg/ml donc l'huile essentielle est 15 fois plus forte que le BHT.

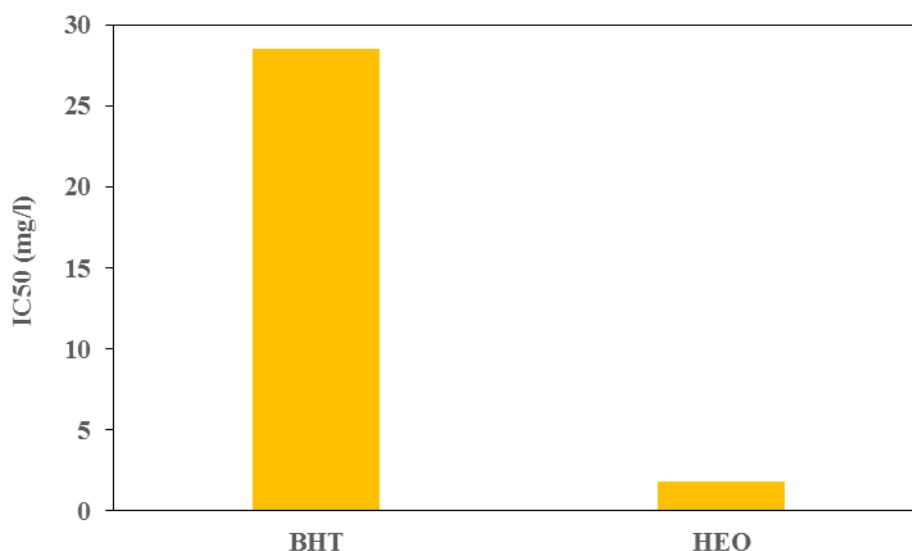


Figure 41 : Histogramme de l'activité antioxydante de BHT et de HEO.

V.4.2 Concentration minimale d'inhibition CMI

- **Etude quantitative de l'activité antimicrobienne**

L'évaluation des résultats de l'analyse bactérienne par l'huile essentielle d'origan a été réalisée pour les 3 souches bactériennes ATCC mentionnées précédemment. Les diamètres d'inhibition mesurés en millimètres ont été utilisés comme critère pour évaluer l'activité antimicrobienne des substances testées. Afin de garantir une évaluation complète et fiable de l'effet inhibiteur de l'huile d'origan, voici les résultats :

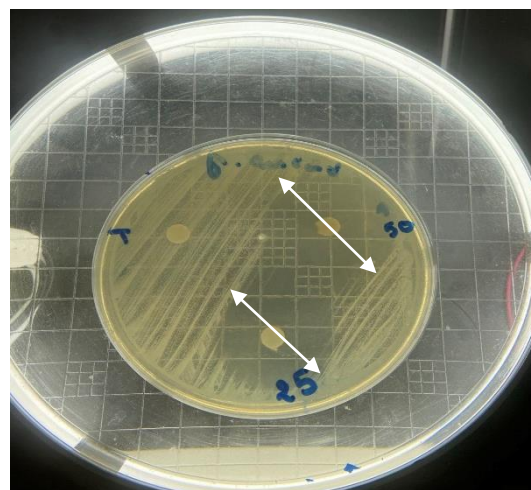
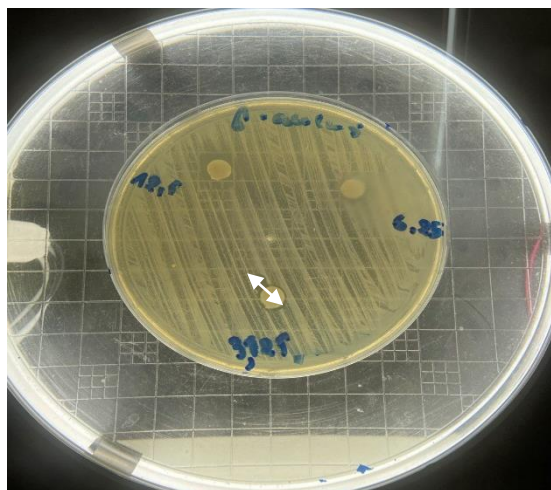


Figure 42 : Activité de l'HE contre *pseudomonase aureues*.

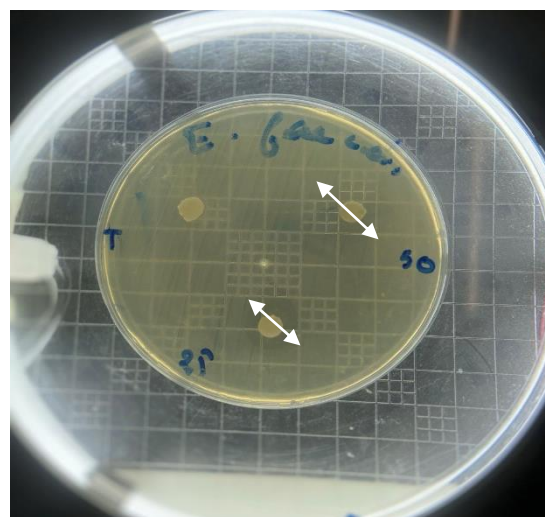
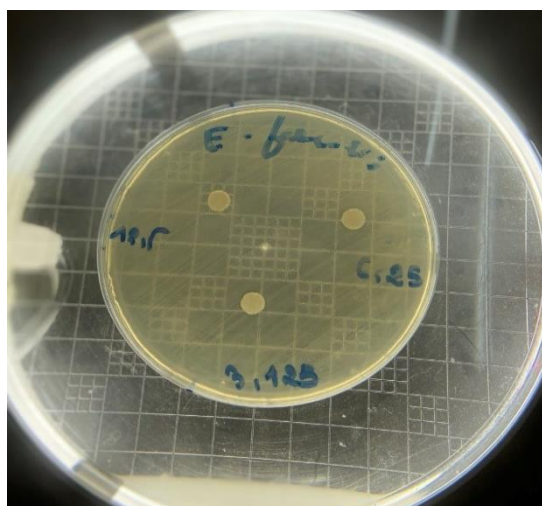


Figure 43 : Activité de l'HE contre *Enterococcus faecalis*.

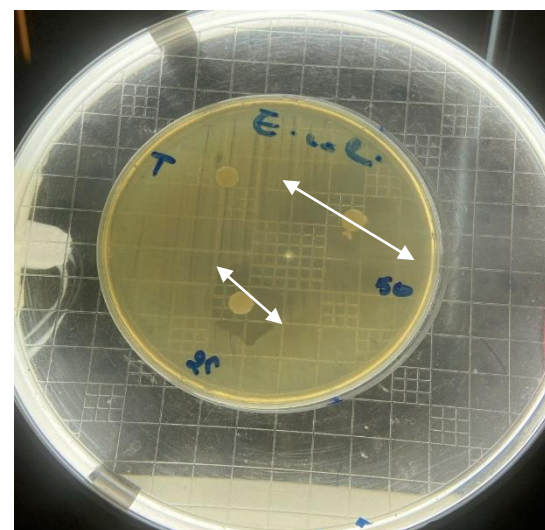
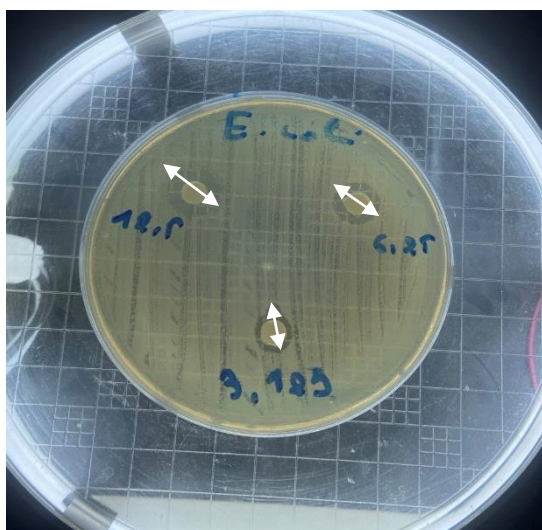


Figure 44 : Activité de l'HE contre *Escherichia coli*.

Les diamètres des zones d'inhibition de la CMI sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antibactérienne CMI.

Concentration %	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>pseudomonas aeruginosa</i>
Témoin	6	6	6
3.125	10	7	7
6.25	13	9	8
12.5	17	12	10
25	19	17	30
50	30	25	40

Les résultats ont révélé des valeurs de CMI variables pour les différentes souches bactériennes testées *Enterococcus faecalis* ATCC 229212 à montré un diamètre de 12mm pour une concentration de 12.5% et un diamètre de 13mm pour *Escherichia coli* ATCC 25922. Pour une concentration de 6.25% .On montre une CMI très basse inférieure à 6.25%, ce qui indique une très forte sensibilité de ces souches vis-à-vis l'huile de l'origan.

Par contre *pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a montré une faible valeur de CMI donc elle est moins sensible que les autres souches pour la concentration 6.25%.

Il convient de souligner que les différences dans les valeurs de CMI peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, notamment les conditions expérimentales, les méthodes utilisées et les différentes sources d'huile d'origan utilisées dans les études.

V.4.3 Etude quantitative de la CMI de l'activité antifongique

Les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*origanum vulgare.L* ont été examinés pour les deux souches de champignons de candidas *Albicans* et *candidas glabrata* précédemment mentionnées.

On a comparé notre résultats par rapport à un témoin positif qui est l'Éconazole nitrate 1 % (10 mg/ml) solution pour pulvérisation cutanée c'est un Antifongiques locaux à large spectre.

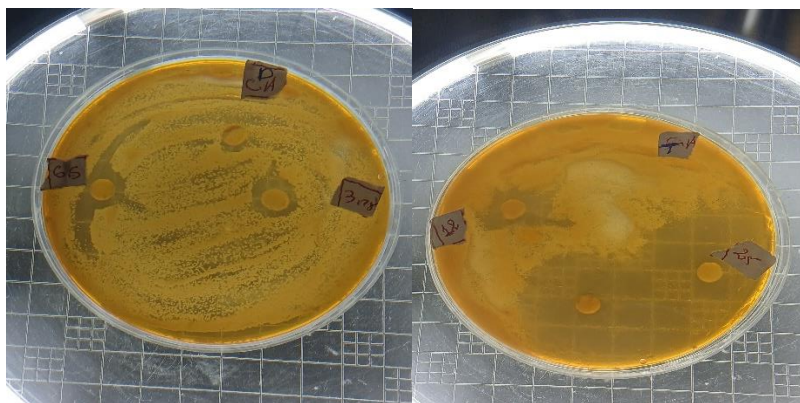


Figure 45 : Activité de l'HE contre *condidas albicans*.

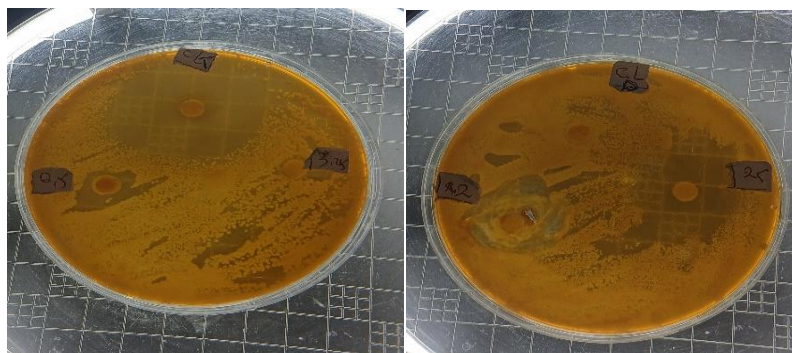


Figure 46 : Activité de l'HE contre *condidas glabrata*.

Tableau 16 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antifongique d'HE.

Concentration %	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	<i>candidas Albicans</i>	<i>Candidas glabrata</i>
Témoin(+)Éconazole nitrate 1 %	39	40
témoin (-) DMSO	6	6
3.125	10	8
6.25	12	11
12.5	19	17
25	34	35

Le tableau présente l'évaluation de l'activité antifongique d'un composé testé à différentes concentrations contre *Candida albicans* et *Candida glabrata*, en comparaison avec deux témoins un témoin positif (éconazole nitrate à 1 %) et un témoin négatif (DMSO). Les résultats montrent une activité antifongique croissante en fonction de la concentration. À la plus faible concentration (3,125 %), les diamètres des zones d'inhibition sont faibles (10 mm

pour *C. albicans* et 8 mm pour *C. glabrata*), indiquant une activité modérée. Cette activité augmente progressivement pour atteindre des zones d'inhibition de 34 mm et 35 mm à 25 %, soit des valeurs proches de celles de l'Éconazole (39 mm et 40 mm). Le DMSO n'a montré aucun effet antifongique, ce qui confirme que l'effet observé est dû au composé testé. Ces résultats suggèrent que le composé possède une bonne activité antifongique, qui est dose-dépendante et efficace contre les deux souches de *Candida*.

V.5 Caractérisation du chitosane

A) Extraction du chitosane

Le chitosane est obtenu à partir de la chitine, un polysaccharide présent dans les carapaces de crevette. L'extraction se fait généralement en trois grandes étapes : Déminéralisation, déprotéinisation puis désacétylation de la chitine extraite. Le rendement du chitosane obtenu à partir de la carapace après déminéralisation, déprotéinisation, désacétylation et blanchiment est de 17 % par rapport à la masse initiale de carapaces. Cette valeur est similaire à ce trouvé par certains auteurs dont les valeurs étaient comprises entre (10-20%).

Ceci a peut-être été expliqué par la littérature, le rendement dépend des paramètres suivants :

- Source de chitine.
- Teneur en minéraux et protéines.
- Efficacité des procédés de préparation du chitosane.

B) Caractérisation structurale par microscope optique

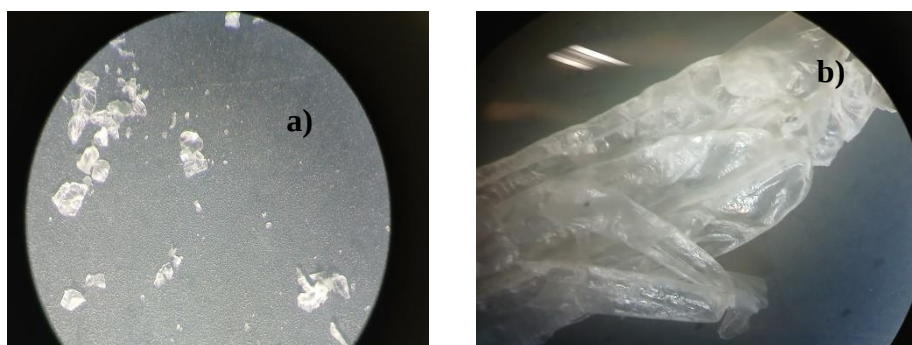


Figure 47 : Micrographes de chitosane : **a)** microscope polarisant **b)** microscope stéréoscope.

V.5.1 Etude de la solubilité du chitosane

- **Dans l'eau :** le chitosane est insoluble dans l'eau neutre ou basique (pH=7).
- **En milieu acide:** en particulier dans les solutions aqueuses diluées d'acides organiques comme l'acide acétique, citrique ou lactique.

La protonation des groupes amines du chitosane ($-\text{NH}_2$) qui le rendent cationique et donc hydrosoluble dans un environnement acide ($\text{pH} < 6.5$)

- **NaOH** : il est insoluble dans le NaOH (base très fortes) car les groupes amines du chitosane restent non protonés (NH_2).



Figure 48 : Solubilité de chitosane.

V.5.2 Spectroscopie FTIR de différent chitosane

Les spectres infrarouges de deux chitosane de la crevette, du chitosane commercial de fisher scientifique, réalisés à l'aide d'un spectromètre FTIR (Shimadzu Infinity-1) dans la plage de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ sur un support de diamant.

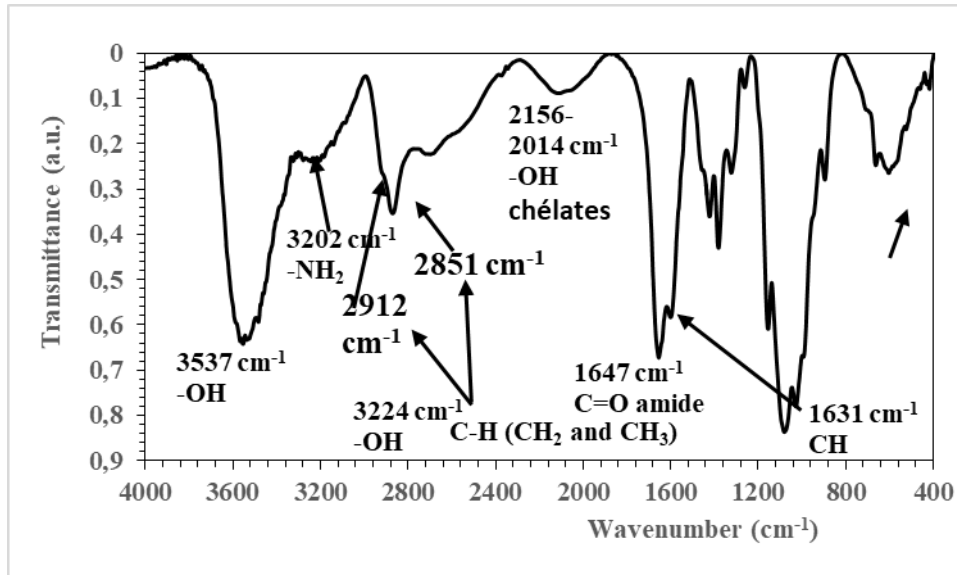


Figure 49 : Spectre IRTF du chitosane Fisher scientifique.

Le spectre IRTF ci-dessus du chitosane Fisher scientifique est caractérisé par la présence de plusieurs pics caractéristiques. Au niveau de la région comprise entre 4000 cm^{-1} et 1600 cm^{-1} , une bande située à 3537 cm^{-1} spécifique à la fonction OH alcool. Le pic localisé à 3202 cm^{-1} est attribué à la fonction amine NH_2 libre du chitosane obtenu après hydrolyse de la fonction amide désacytélation. Un ensemble des pics identifiés entre 2912 cm^{-1} et 2851 cm^{-1}

caractéristique de la vibration des liaisons C-H des groupements CH_3 CH_2 . A 1647 cm^{-1} un pic important correspond à la vibration de la liaison $\text{C}=\text{O}$ de la fonction amide.

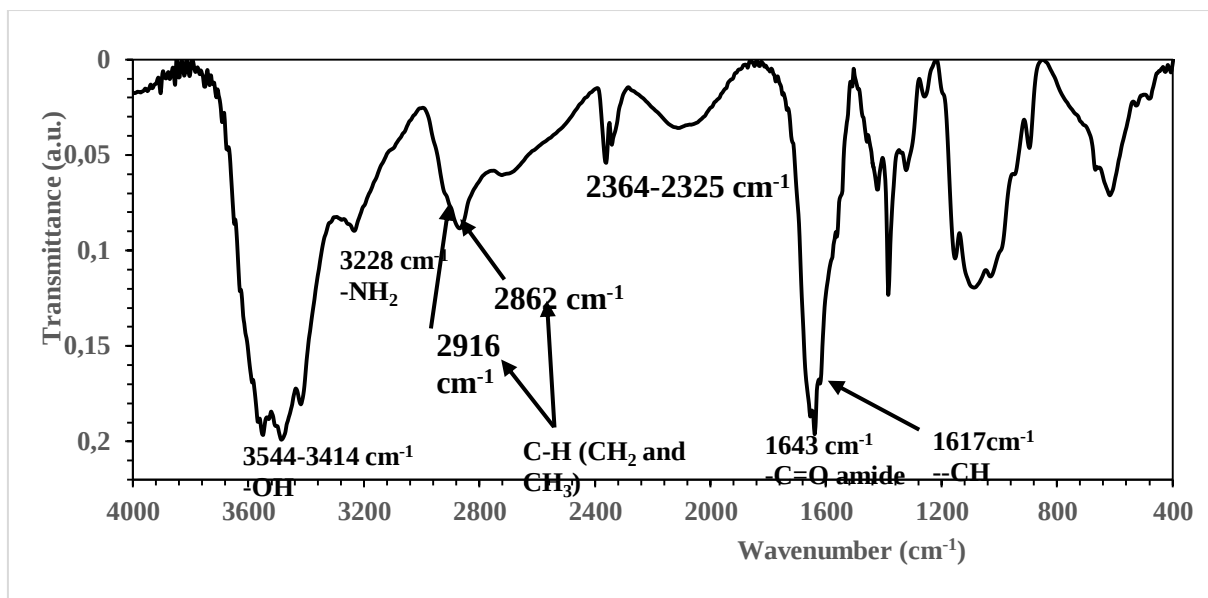


Figure 50 : Spectre IR du chitosane crevette.

Le spectre IRTF du chitosane obtenue à partir de la saponification de la chitine de la crevette et caractérisé par la présence du bande et de plusieurs pics la région entre 3600 cm^{-1} et 2800 cm^{-1} renferme une bonde localisé 3544 cm^{-1} spécifique à la vibration de la fonction alcool, la chitosane d'après ça structure chimique contient des groupes amide ($\text{NHC}=\text{O}$) et amine NH_2 le groupement amide est caractérisé par un pic et la fonction amine par 2 pics qui se trouve au même niveau que la bonde OH.

Cependant ,un des pics la fonction est visible à 3228 cm^{-1} de caractère organique de la molécule est désigné par la présence des pics situé entre 2916 cm^{-1} et 2862 cm^{-1} relatives aux vibrations des liaison CH des groupement CH, CH_2 , CH_3 entre $(2364-2325) \text{ cm}^{-1}$,2 pics caractéristique des chélats sont localisés à 1643 cm^{-1} ,le pic observé spécifique à la vibration de la fonction carbonyle du groupe acétyle COCH_3 .

Détermination du degré de désacétylation DD à partir de FTIR

Le degré de désacétylation est déterminé par la formule [105] :

$$\text{DD} = (\text{A}_{1655} - \text{A}_{34450}) \times \frac{100}{1.33} \quad (8)$$

Enfin, les principales caractéristiques physico-chimiques du chitosane crevette préparé à partir de la carapace des crevettes blanches, comparées à celles d'un chitosane fisher scientifique, sont les suivantes :

Tableau 17 : Caractéristiques physico-chimiques des deux chitosanes.

Paramètre	Chitosane crevette	Chitosane Fisher
Couleur	Jaune pâle	Blanche
D.D (%)	73.8	63,6

D'une manière générale, le degré de désacétylation (D.D) du chitosane varie entre 55 et 99% avec une moyenne de 80%. De plus, la solubilité du chitosane dépend fortement de ce paramètre. Pour des valeurs de D.D 60% le chitosane devient soluble en milieux adéquats [106].

V.5.3 Poids moléculaire

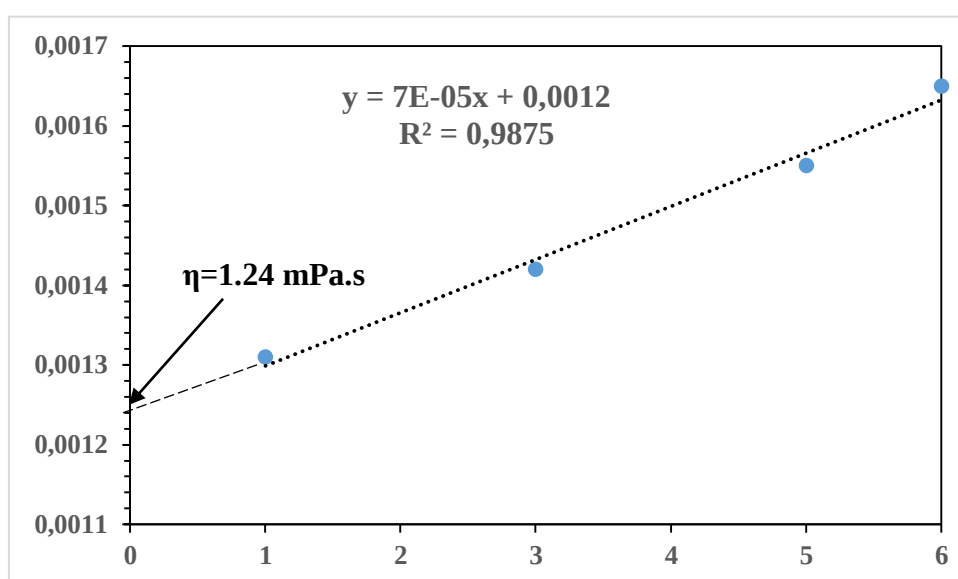


Figure 51 : Courbe de viscosité en fonction du poids moléculaire.

La viscosité intrinsèque, η , en fonction du poids moléculaire moyen, M , est représentée par les équations [107].

$$[\eta] = kM^\alpha \quad (9)$$

Où K et α sont des constantes pour un système polymère-solvant-température donné

$$k = 1.81 \cdot 10^{-3} \text{ ml/g}$$

$$\alpha = 0.93$$

$$[\eta] = 0.00124 \text{ Pa.s}$$

$$M = e^{\frac{(\ln[\eta] - \ln k)}{\alpha}} = 1120 \text{ KDa}$$

Le poids moléculaire du chitosane obtenu à partir de la crevette (1120kDa) et comparable à celui du chitosane étudié dans la littérature

V.5.4 Analyse par la diffusion dynamique de la lumière DLS

On a déterminé le potentiel zêta par cette méthode.

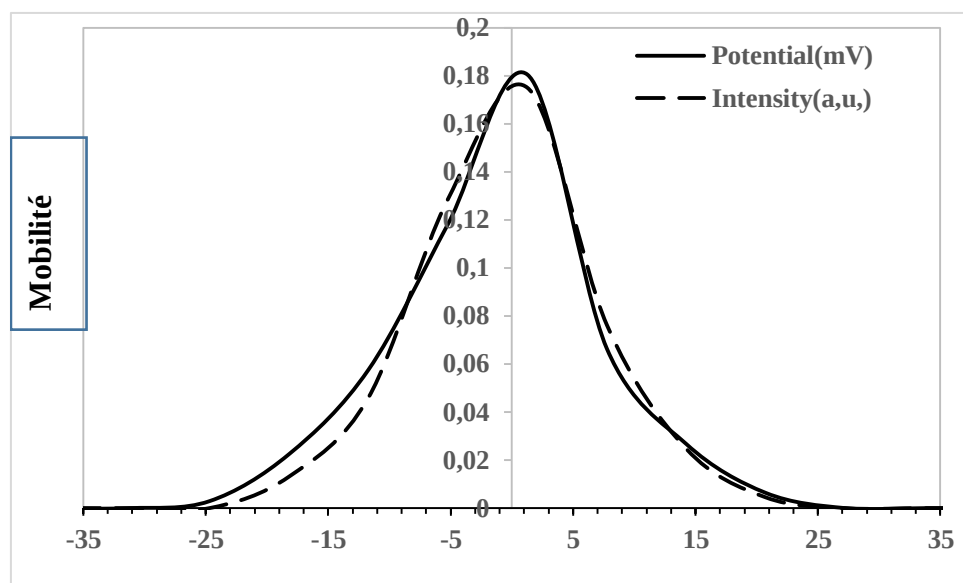


Figure 52 : Distribution de potentiel zêta du chitosane fisher scientifique.

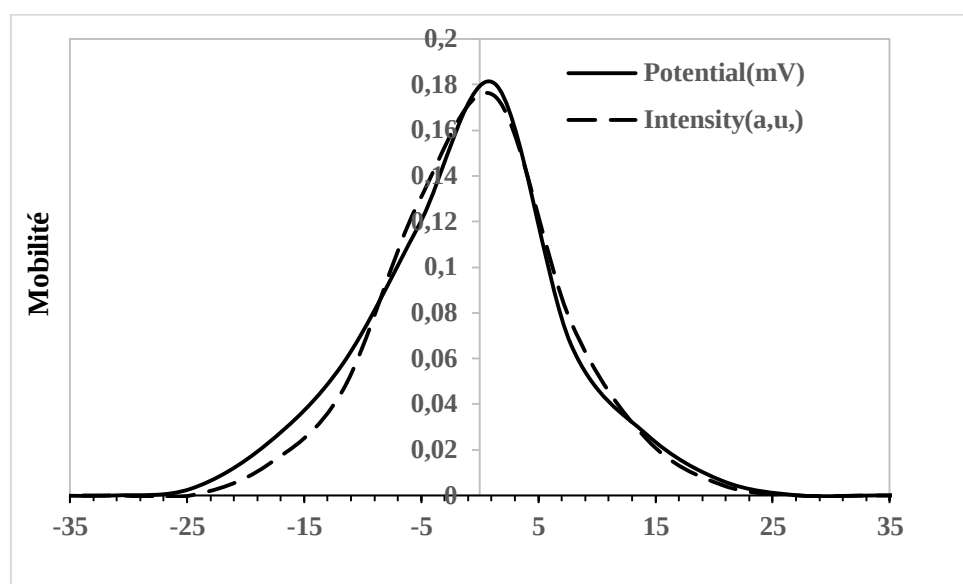


Figure 53 : Distribution de potentiel zêta du chitosane crevette.

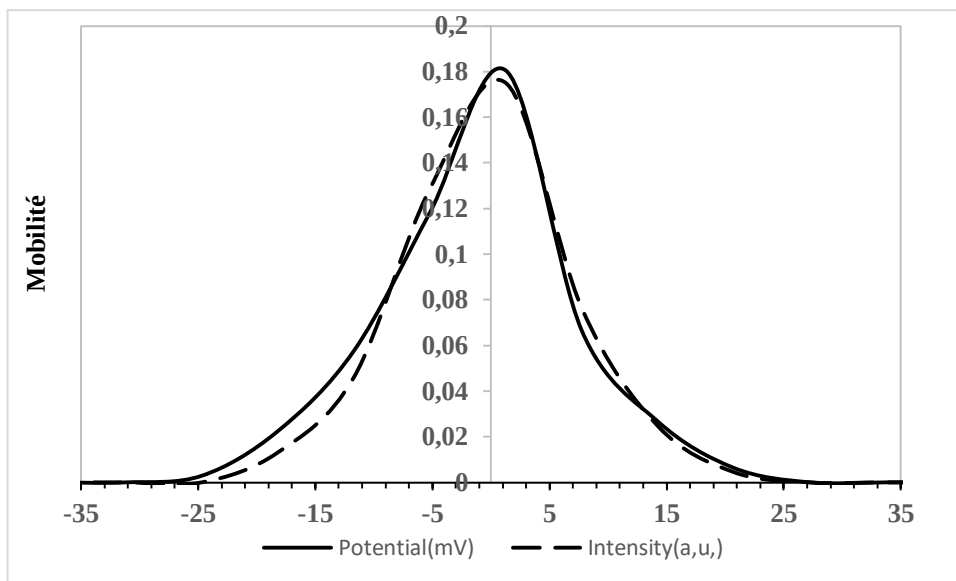


Figure 54 : Distribution de potentiel zêta du chitosane granulé.

La distribution de charge des différents échantillons en solution aqueuse d'acide acétique 1% est déplacée vers la région de charge positive à cause de la protonation des groupements amine de la chitosane obtenu par désacetylation de la chitine.

V.5.6 Diffraction des rayons x Analyse par DRX.

Les diffractogrammes des deux matières (chitosane Fisher scientifique et le chitosane crevette) sont représentés sur les figures ci-dessous

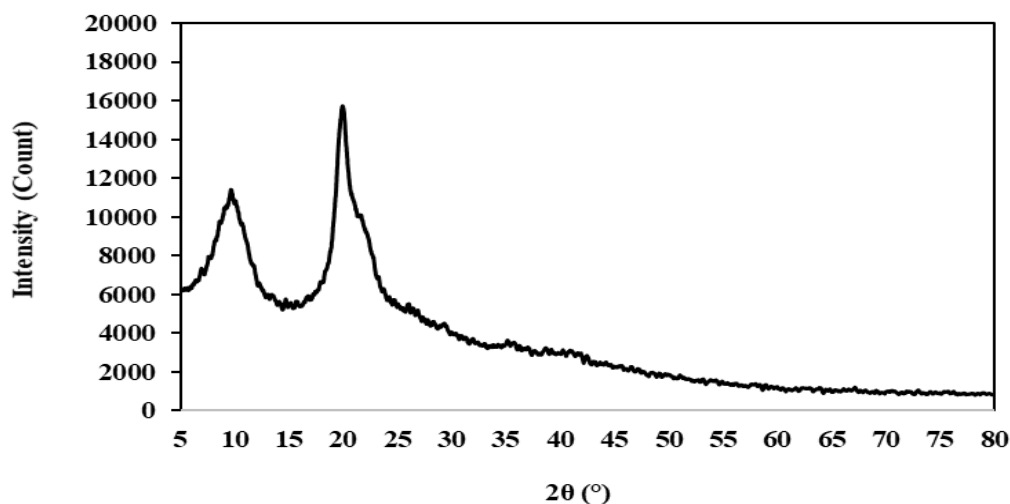


Figure 55 : Diffractogramme du chitosane crevette.

Le diffractogramme présente deux bandes localisés respectivement à 10° et 20°, indicatif du caractère semi-cristallin du chitosane à cause de la présence des bandes larges caractéristique de l'état amorphe.

Le pic majeur semble plus marqué et défini, ce qui indique une certaine cristallinité.

La structure partiellement cristalline du chitosane de crevette, qui peut être attribuée à son processus d'extraction naturel, préserve certaines zones structurées.

Une cristallinité plus marquée pourrait renforcer certaines propriétés mécaniques et barrière.

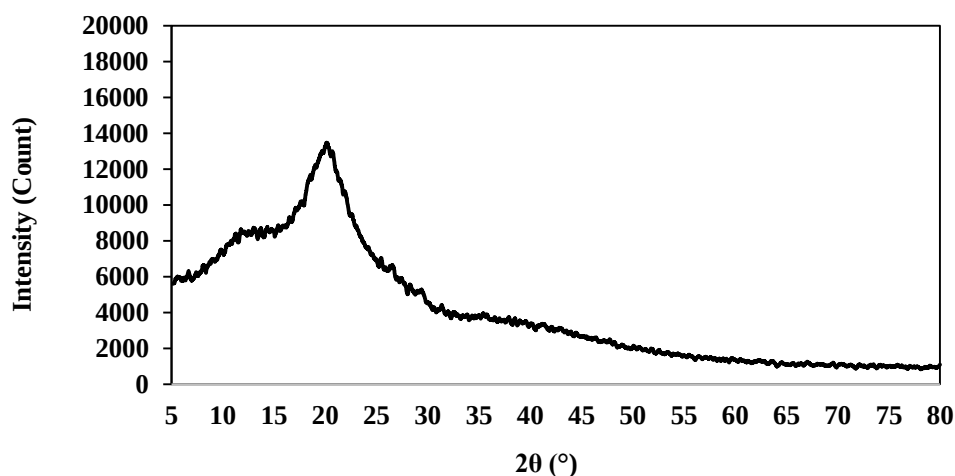


Figure 56 : Diffractogramme du chitosane Fisher scientifique.

Le diffractogramme présente une déviation plus vaste et moins marquée, en particulier autour de 20° (2θ).

La courbe présente une diffusion plus large, ce qui indique une structure amorphe ou moins cristalline.

Le chitosane artificiel présente une cristallinité inférieure à celle du chitosane naturel, ce qui est probablement dû à une désacétylation plus poussée ou à un traitement chimique plus intensif.

Cela peut conduire à une solubilité accrue, mais avec une réduction des propriétés mécaniques.

Tableau 18 : Comparaison entre chitosane crevette et fisher scientifique par DRX.

Caractéristique	Chitosane crevette	Chitosane fisher scientifique
Cristallinité	Moyenne à élevée	Faible
Intensité des pics DRX	Plus marquée	Moins marquée
Solubilité	Légèrement plus faible	Plus élevée
Propriétés mécaniques	Potentiellement meilleures	Moins bonnes

V.6 Caractérisation des membranes synthétisées.

Après la formulation des différents membranes à partir du chitosane comme polymère naturel en raison de ses propriétés, on les effectués plusieurs analyses pour leur caractérisations.

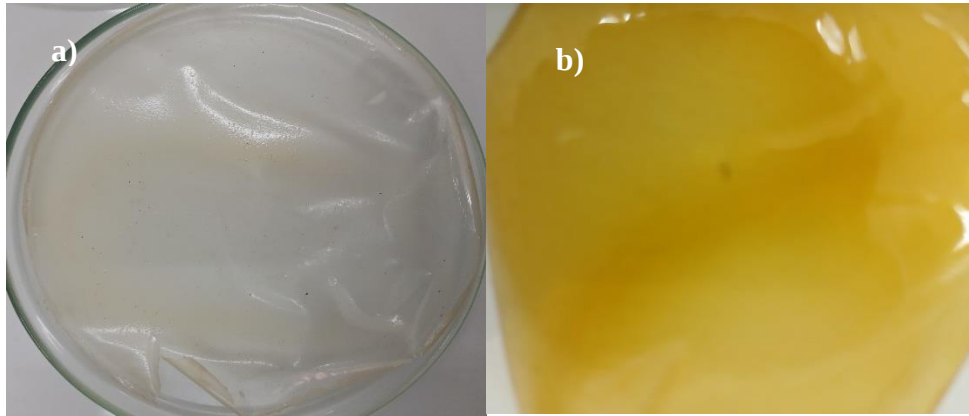


Figure 57 : Membranes du chitosane :a) réticulé avec acide maléique,b) réticulé avec glutaraldhéyide...



Figure 58 : Membrane du chitosane crevette.

V.6.1 analyse par ATR

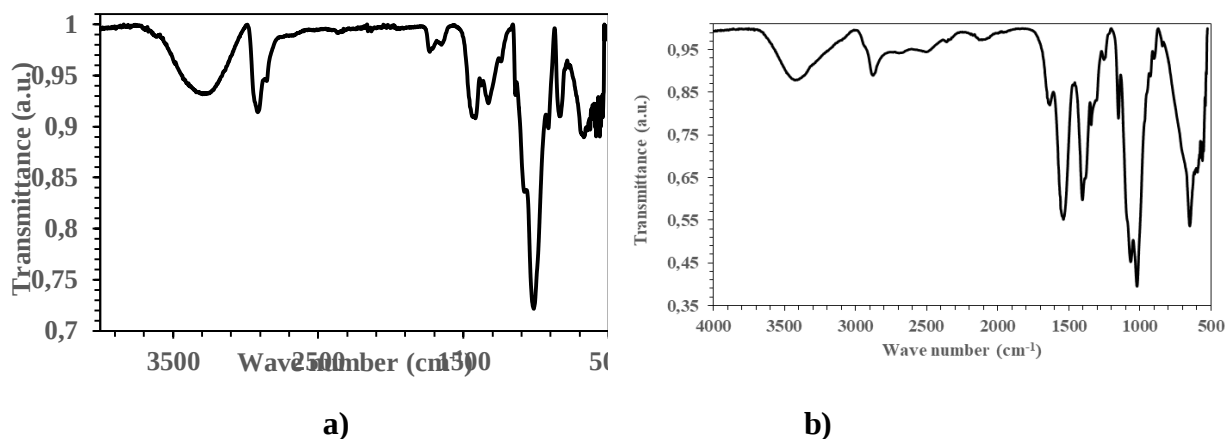


Figure 59 : Spectre ATR membrane de chitosane :a) plastifiée,b) placebo

Le spectre de la membrane brute du chitosane (CS-F) présente une large bande entre 3600 et 3300 cm^{-1} , correspondant aux vibrations d'étirement du groupe -OH, superposées à la bande N-H, indiquant **la formation de liaisons intermoléculaires**. Une bande à 2900 cm^{-1} a été associée aux vibrations d'étirement asymétriques et symétriques du groupe C-H. En outre, elles présentaient des bandes d'absorption caractéristiques à 1600 cm^{-1} associées au groupe amide I et à la déformation asymétrique NH_3^+ , et à 1500 cm^{-1} liées au groupe amide II, à la vibration de flexion N-H et à la déformation symétrique NH_3^+ . Cette dernière bande est liée aux vibrations du groupe amine protoné $\delta(\text{NH}_3^+)$. De plus, les bandes comprises entre 1400 et 1300 cm^{-1} ont été attribuées aux groupes méthylène et méthyle, celles comprises entre 1100 et 1000 cm^{-1} ont été associées à l'étirement du groupe C-O des liaisons glycosidiques.

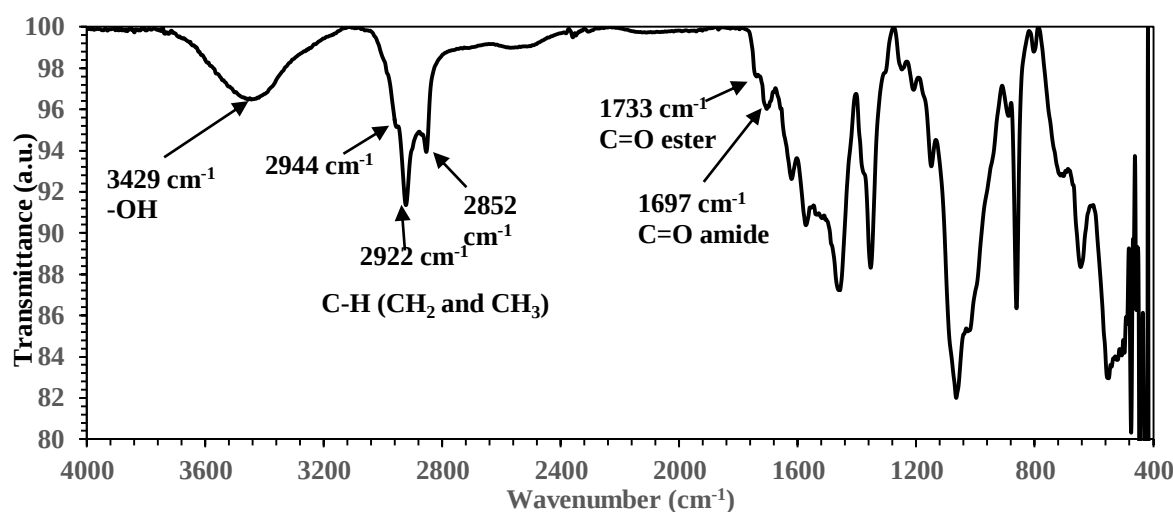


Figure 60 : Membrane avec huile essentielle *origan vulgare* .Lsans agent réticulant.

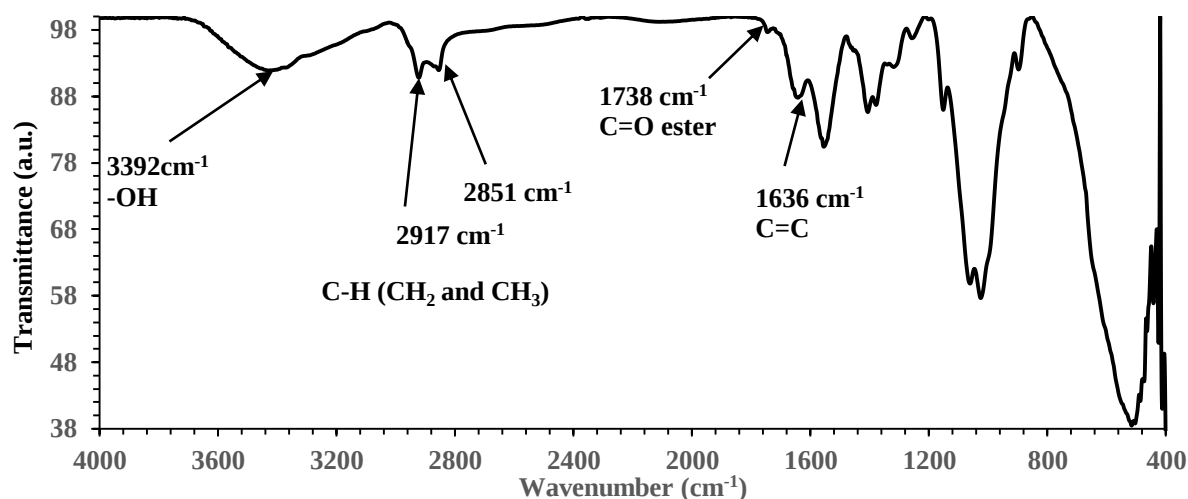


Figure 61 : Membrane du chitosane et huile essentielle avec glutaraldehyde.

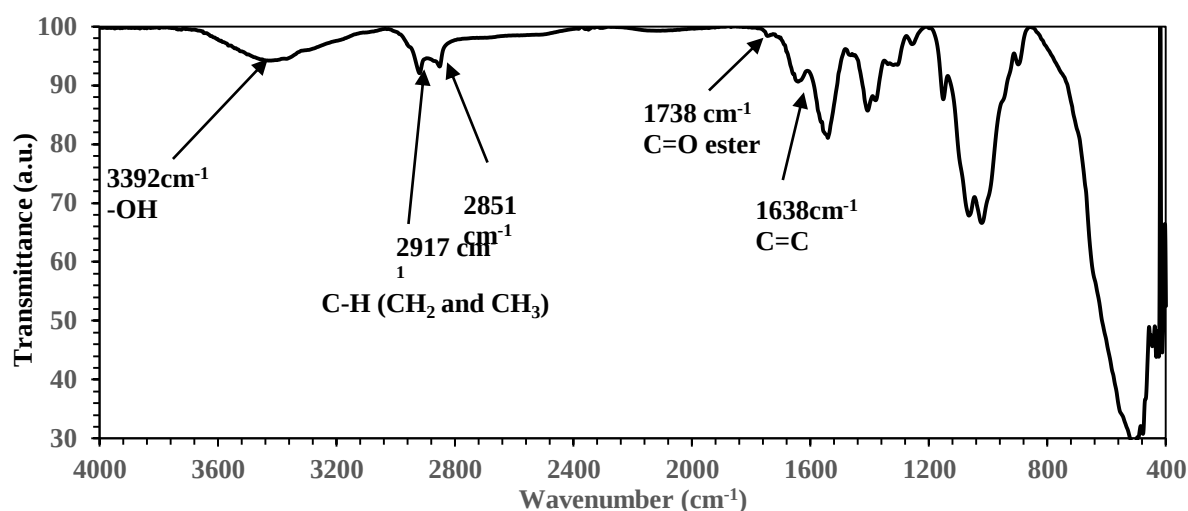


Figure 61 : Membranes du chitosane et huile essentielle avec l'acide maléique.

Les spectres IRTF des membranes du chitosane réticulé par le glutaraldehyde ou l'acide maléique et renfermant l'huile essentielle de l'*origanum vulgare* L. sont identique et ils sont caractérisé par la présence d'une bande spécifique de la vibration de la fonction alcool OH . Le caractère organique est identifié par la présence des pics de la vibration de la liaison C-H des groupementd méthyles et m méthylenes. La présence de la vibration de la fonctionncarbonyle est plus marquée dans le cas de la membranes réticulée avec le glutaraldehyde que celle réalisée avec l'acide maléique.

V.6.2 activité biologique

V.6.2.1 Activité antibactérienne des membranes synthétisées

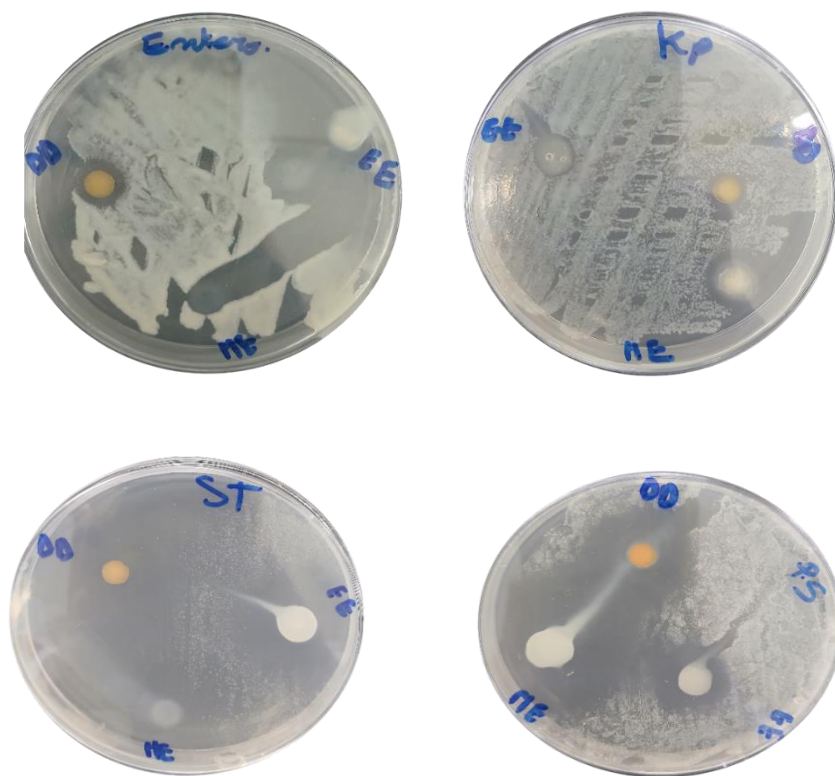


Figure 62 : Activité des membranes contre certaine bactéries.

Tableau 19 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antibactérienne des membranes.

	Les membranes	PS	ST	KP	ENTERO
Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	DD	29	30	10	10
	EE	19	28	12	10
	ME	30	25	16	15

On a marqué un résultat considérable contre les souches bactériennes testées

On a préparé trois membranes différentes.

EE Chitosane-MA/HE

DD Chitosane-GLT/HE

ME chitosane/HE

Pseudomonas PS, Staphylococcus ST, Klebsiella KP, Enterobacter,

On a trouvé des valeurs considérables du diamètre de la zone d'inhibition de la membrane chitosane/HE due à l'absence de l'agent réticulant donc sa libération est très rapide, et pour Chitosane-MA/HE on a trouvé un diamètre de 10 mm pour c'est un diamètre moyennement faible par rapport au Chitosane-GLT/HE cela signifie que le GLT comme agent réticulant et améliorant la libération de l'huile. En outre ces valeurs de diamètre sont variés selon le genre d'espèce bactérienne étudié, on a noté une résistance pour *Klebsiella KP* et *Enterobacter*, et une sensibilité pour *Pseudomonas PS*, *Staphylococcus ST*.

V.6.2.2 activité antifongique des membranes synthétisées.

Les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique des membranes synthétisées ont été Examinés pour les trois souches de champignons de *candidas* précédemment et *aspergillus flavus*.

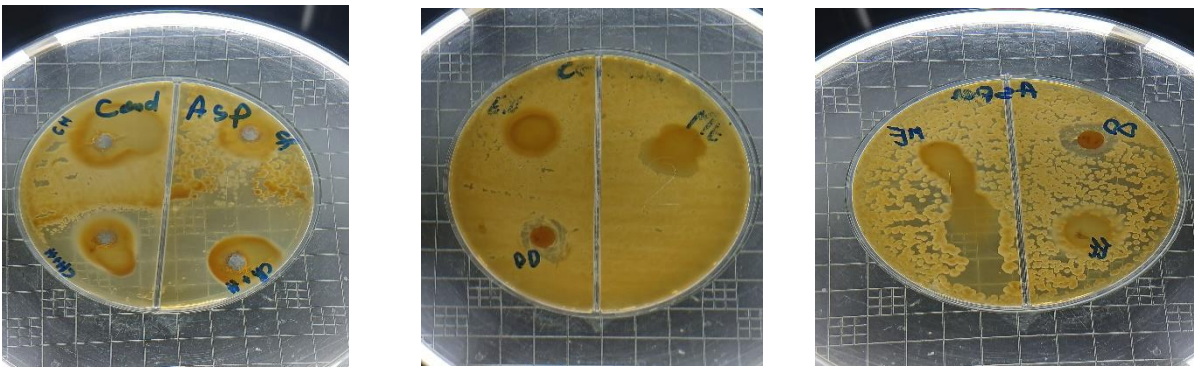


Figure 63 : Activité antifongique des membranes synthétisées.

Tableau 20 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antifongique des membranes.

	Les membranes	Condidas albicans	Aspergillus flavus
Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	DD	29	30
	EE	19	28
	ME	30	25
	Chitosane	29	19
	Chitosane +huile	30	40

Les résultats montre que le chitosan a une activité antifongique considérable avec des diamètres d'inhibition plus de 19mm, en outre le gel du chitosane avec huile essentielle HEO

donne des diamètres très élevée 30 à 40 mm par rapport aux membranes on obtient des diamètres entre 19 mm 30 mm due à la présence de l'agent réticulant qui ralentie la libération de huile

Cette variété peut aussi confirmer par l'étude de la libération

V.6.3 Cinétique de la libération

On a étudié la cinétique de deus membranes synthétisé (réticuler par l'acide maléique, et une autre membrane réticulée par glutaraldhyde pour identifier le meilleur agent réticulant



Figure 64 : La cellule de diffusion de FRANZ

V.6.3.1 membrane réticulé par acide maléique

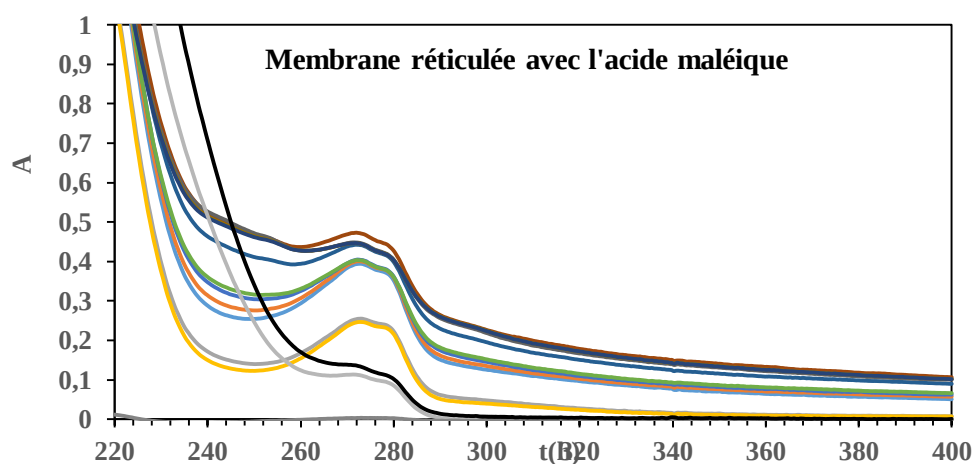


Figure 65 : Profils de libération de membrane réticulée avec l'acide maléique.

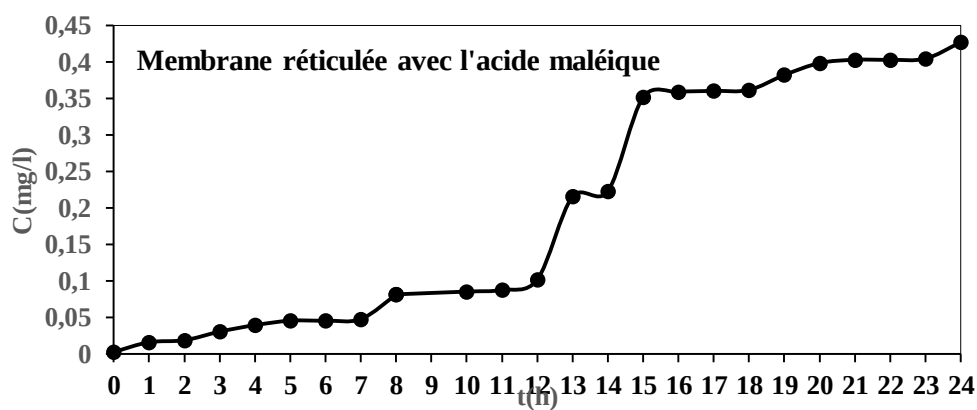


Figure 66 : Libération prolonge in vitro de membrane réticulée avec le l'acide maléique en fonction de temps.

V.6.3.2 membrane réticulé par glutaraldehyde

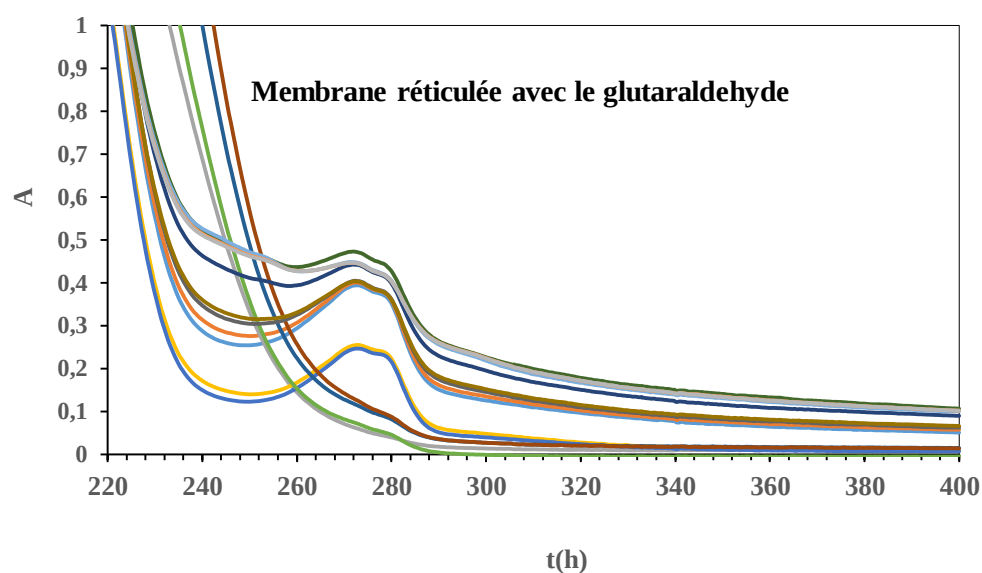


Figure 67 : Différents profils de libération de membranes réticulée avec glutaraldehyde.

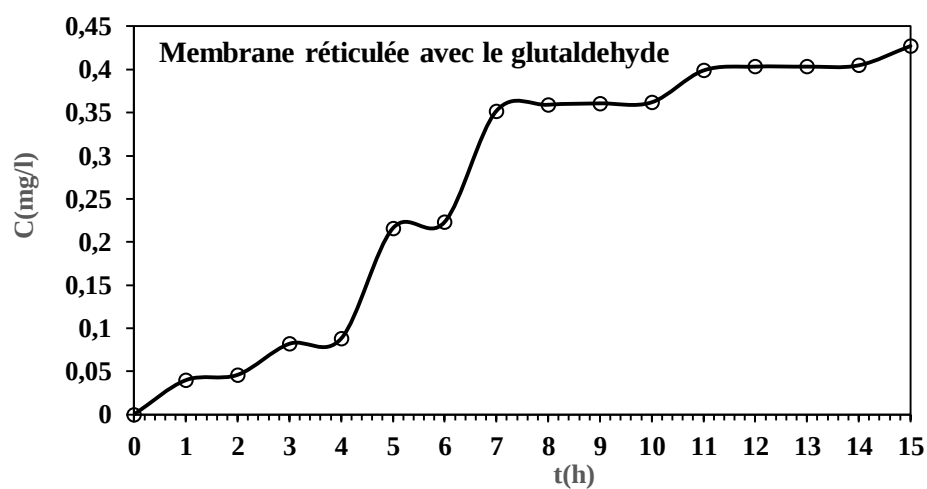


Figure 68 : La libération prolonge in vitro de membrane réticulée avec le glutaraldehyde en fonction de temps.

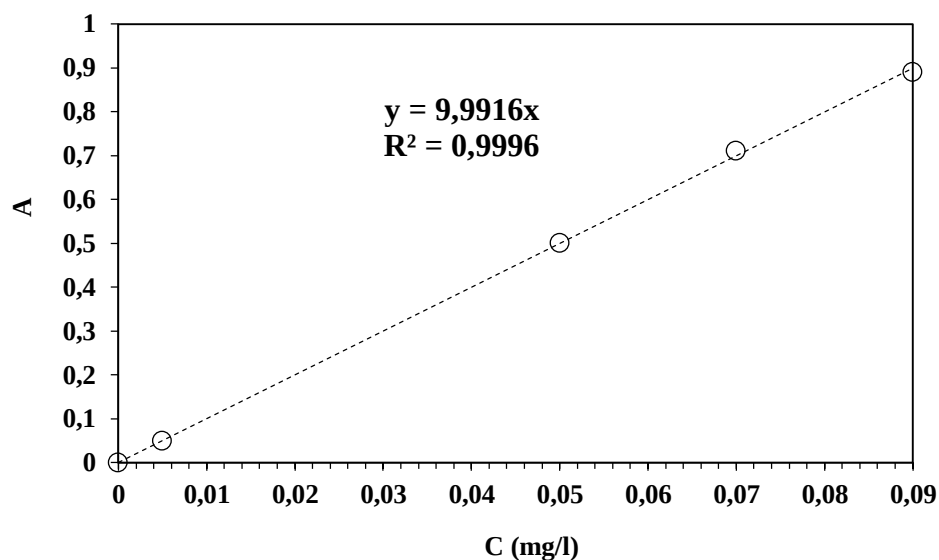


Figure 69 : Variation de l'absorbance en fonction de la concentration de HEO

Les testes in vitro réalisées avec les 2 membranes préparées par réticulation du chitosane et contenant l'huile essentielle de l'origanum vulgare L. et réticulées respectivement avec le glutaraldehyde et l'acide maléique avec la cellule de Franz ont montré une libération contenue de l'huile essentielle dans le compartiment simulant la peau durant une période dépassant les 14 heures. Une stabilité exceptionnelle de la membrane réticulée avec le glutaraldehyde est démontrée.

CONCLUSION GENERALE

L'herbe algérienne est l'une des plus riches au monde et renferme de nombreuses espèces endémiques. L'Est algérien en abrite plusieurs et la plupart d'entre elles sont à usage médicinal.

Notre étude a porté sur les aspects écologique, ethnobotanique, morpho-anatomique de la plante et la composition chimique et les activités biologiques de l'huile essentielle extraite.

Cette étude a PERMIS d'accéder aux résultats suivant :

L'extraction par hydrodistillation d'*O. vulgare* L. récolté de la région de Médéa, a donné un rendement de récupération de l'huile essentielle de 2.56%. Leur composition chimique été déterminée par GC/MS révèle la présence de 29 composés dont le carvacrol et γ -Terpinene comme composés majoritaires.

L'activité antioxydante de l'HE d'*O.vulgare* L. évaluée par le test de piégeage du radical DPPH a donné un IC50 égal à 1.8 ± 0.07 mg/ml. Ce résultat témoigne d'une capacité réductrice modeste, comparée à celle du BHT (28.5 ± 0.02 mg/ml).

L'activité antimicrobienne de cette HE réalisée sur 6 souches, a été très efficace sur la majorité des souches bactériennes, ainsi les diamètres des zones d'inhibitions chez les entérobactéries chez les bacilles à Gram négatif et les Gram positif, et *Candida albicans*, *aspergillus flavus* comme souches fongique.

La caractérisation du chitosane extraire à partir de la carapace a été réalisé par FTIR, DRX, afin de confirmer sa morphologie, sa taille et sa charge.

Les membranes composites ont été caractérisées par l'analyse infrarouge, L'IRTF a confirmé que les deux agent réticulé glutaraldehyde et l'acide maléique ont réticulés les membranes d'HE incorpore

Les réservoirs composites Agent réticulé /HE encapsulés dans le polymère chitosane ont modulé une libération continue d'HE pendant les périodes d'évaluation.

Les membranes composites ont montré un comportement antimicrobien important vis-à-vis de tous les microorganismes testés tels que *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*, *candida albicans*, et *aspergillus flavus* en raison de la diminution de la concentration de l'HE d'origan stocké (comportement dilué) dans les membranes, ce qui attribue une meilleure efficacité antibactérienne et antifongique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Alginate–Chitosan Membranes for the Encapsulation of Lavender Essential Oil and Development of Biomedical Applications Related to Wound Healing. *Molecules* 2023, 28, 3689. <https://doi.org/10.3390/molecules28093689>
- [2] Transdermal Patch A Novel Approach for Transdermal Drug Delivery, *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 2022; 12(6)179-188
DOI <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v12i6.5779>
- [3] Emma Fontaine. L'aromathérapie dans la prise en charge des pathologies dermatologiques les plus rencontrées à l'officine. *Sciences pharmaceutiques*. 2023. ffdumas-04405091ff
- [4] Preparation and Antimicrobial Activity of Oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by Cellulose nanocrystals Yan Zhou†, Shanshan Sun†, Weiya Bei, Mohamed Reda Zahi, Qipeng Yuan, Hao Liang
- [5] Matrix structure selection in the microparticles of essential oil oregano produced by spray dryer Article in *Journal of Microencapsulation* · March 2013
DOI 10.3109/02652048.2013.778909 · Source PubMed
- [6]. Microcapsules for Encapsulation and Controlled Release of Rosemary Essential Oil. *Polymers* 2023, 15, 823. <https://doi.org/10.3390/polym15040823>
- [7] Calpouzoz, L., “Botanical aspects of oregano”. *Econ. Bot.* vol 8, (1954), pp, 222–233.
- [8] Baser, K.H.C.; Buchbauer, G., “Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications” CRC Press Boca Raton, FL, USA, (2015), 975P. ISBN 978-1-4200-6315.
- [9] (2016), Flore médicale des signatures XVIIe –XVIIIe siècle, l'Harmaton ,640p
- [10] traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda plants, use and administration, *Journal of ethno pharmacology* 88(1), 19-44p.
- [12] **Ríos J-L.** Chapter 1 - Essential Oils What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In Preedy VR, editor. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. San Diego Academic Press; 2016. p. 3-10.
- [13] **Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W.** Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities A critical review. *Medicines*. 2016;3(4)25.
- [14] **Sunil Kumar Y.** Physiochemical Properties of Essential Oils and Applications. In Mozaniel Santana de O, Eloisa Helena de Aguiar A, editors. *Essential Oils*. Rijeka IntechOpen; 2022. p. Ch. 2.
- [15] **Aziz ZA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, et al.** Essential oils extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current drug metabolism*. 2018;19(13)1100-10. 102

- [16] Alagawany Mahmoud, M., Abd El-Hack, E., Mayada R. Farag, Hazem M., Mervat A. Abdel-Latif, K., Ahmed, E., "The applications of *Origanum vulgare* and its derivatives in human, ruminant and fish nutrition – a review" Vol. 20, No. 2 (2020), pp, 389–407
- [17] Bego, Ph., "Connaître l'essentiel sur les huiles essentielles" Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB Paris, (2001), pp.2-3
- [18] *Les techniques d'extraction*. Comité Français du Parfum.
- [19] **Leszczynska, D. (2007)**. Management de l'innovation dans l'industrie aromatique Cas des PME de la région de Grasse. Editions l'Harmattan, Paris, France.
- [20] Hromadkova, Z., Ebringerova, A., & Valachovič, P., 2002. Ultrasoundassisted extraction of water-soluble polysaccharides from the roots of valerian .
- [21] Gonzalez-Briongos, M., PuentePascual, L., & Saenz-Barrio, C., 2006. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from wine samples Optimization of the method. *Talanta*, 691123-1129.
- [22] Chemat, F., Huma Z., & Khan, M. K., 2011. Applications of ultrasound in food technology processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18 13-835.
- [23] **Mofijur M, Rasul MG, Hassan N, Nabi M**. Recent development in the production of third generation biodiesel from microalgae. *Energy Procedia*. 2019;15653-8.
- [24] Cicchetti, E., Merle, P., Chaintreau, A., "Quantitation in gas chromatography usual practices and performances of a response factor database." *Flavour Fragr J* (2008) 23450–9, pp, 240-245.
- [25] Kühnle, M., Kreidler, D., Holtin, K.; Czesla, H., Schuler, P., Schaal, W., Schurig, V., Albert, K., "Online coupling of gas chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy Method for the analysis of volatile stereoisomers". *Anal. Chem.*, (2008) 80, 5481- 5486, pp, 250-253.
- [26] Laouer, H., "Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaia, de Msila et de Djelfa, composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoides pusilla* et de *Magydaris pastinacea*". Thèse de Doctorat d'état, Département de Biologie, Faculté des sciences, UFA de Sétif. (2004), pp, 150-155.
- [27] NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS and TECHNOLOGY (NIST), (1996) PC version 1.5a of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, *Perkin Elmer Corporation*. 598 pages.
- [28] C. M. O. Simoes and V. Spitzer, "Oleos volateis. In *Farmacognosia da planta ao medicamento*," in Florianopolis Editora da UFSC and Editora da Universidade/UFRGS, C. M. O. Simoes et al., Ed., Chapter 18, 1999
- [29] Claudia Turek, Florian C. Stintzing Stability of Essential Oils A Review 03 January 2013

- [30] Andrija Smelcerovic^{1,*}, Aleksandra Djordjevic², Jelena Lazarevic¹ and Gordana Stojanovic Recent Advances in Analysis of Essential Oils Current Analytical Chemistry, 2013, 9, 61-70.
- [31] Wallner, K. Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie* 1999, 30, 235–248.
- [32] Frérot E, Decorzant E. 2004. Quantification of total furocoumarins in citrus oils by HPLC coupled with UV, fluorescence, and mass detection. *J Agric Food Chem* 52:6879-86.
- [33] Ogawa CA, Diagone CA, Lancas FM. 2002. Separation of monoterpenes in orange essential oil by capillary liquid chromatography and micellar electrokinetic chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 25:1651–9.
- [34] Snezana Agatonovic-Kustrin^{1,2,*}, Petar Ristivojevic³, Vladimir Gegechkori¹, Tatiana M. Litvinova⁴ and David W. Morton^{1,2} 19 October 2020 Article Essential Oil Quality and Purity Evaluation via FT-IR Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques.
- [35] Marquiss, J., “A History of Oil of Oregano Herbal roots”, (2019), URL <https://herbalrootssupplements.com/blogs/herbal-history/a-history-of-oil-of-oregano>.
- [36] Schuetz, B., “Oil of Oregano nature’s antiseptic and antioxidant” Library of congress cataloguing in publication data healthy living publication, USA, (2016), pp, 40-47 ISBN/978-1-57067-329-0.
- [37] Z. Xu, L. Chang, “Identification and Control of Common Weeds” Zhejiang University Press, Hangzhou and Springer Nature Singapore Pte Ltd. 181P vol 3, (2017) DOI 10.1007/978-981-10-5403-7_8.
- [38] Alagawany Mahmoud, M., Abd El-Hack, E., Mayada R. Farag, Hazem M., Mervat A. Abdel-Latif, K., Ahmed, E., “The applications of *Origanum vulgare* and its derivatives in human, ruminant and fish nutrition – a review” Vol. 20, No. 2 (2020), pp, 389–407
- [39] Nouvelle flore d’Algérie et des régions désertiques. Tome 2, CNRS, Paris. 1170 pages
- [40] IMDORF, A; BOGDANOV, 5; KILCHENMANN, V; MAQUELIN, C (1995) *Apilife* Var a new varroacide with thymol as the main ingredient. *Bee World* 76 77-83. Chapitre 1
- [41] A. El Asbahani^{a,e}, K. Miladi^c, W. Badri^c, M. Sala^c, E.H. Aït Addi^b, H. Casabianca^d, A. El Mousadik^e, D. Hartmann^a, A. Jilale^e, F.N.R. Renaud^a, A. Elaissari^c, “ Essential oils From extraction to encapsulation” / *International Journal of Pharmaceutics* 483 (2015) 220–243 13 /2/2015, 221-239
- [42] IMDORF, A; BOGDANOV, 5; KILCHENMANN, V; MAQUELIN, C (1995) *Apilife* Var a new varroacide with thymol as the main ingredient. *Bee World* 76 77-83.
- [43] Young RJ, Lovell PA. Introduction to polymers CRC press; 2011.

[44] BritannicaE. polymer Britannica; [Available from <https://www.britannica.com/science/polymer>.

[45] Angelova N, Hunkeler D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. Trends in biotechnology. 1999;17(10)409-21.

[46] Austarheim I , Christensen B. E, Hengnaa I. K, Petersen B. O, Duusc J. O, Bye R, Baxter A., Dillon M., Taylor K.D.A., Roberts G.A.F. (1992) Improved method for IR determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* , 14 , 166 – 169.

[47] Boual Z , Chouana Z, Kemassi A, Hamid A, Oudjan M. Daddi B, Michaud P, Ould El Hadj M.D ; 2015.Étude physicochimique et biologique des polysaccharides hydrosolubles de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae). *Phytothérapie* vol (13) 396-402

[48] Nugraha Edhi Suyatama, Développement de films biodégradables à base de chitosane Etudes du mélange chitosane/PLA, de la plastification et de la compatibilisation. Thèse de doctorat, Université de Reims, juin 2006.

[49] Holy Rabetalika, Michel Paquot, Philippe du bois « les polymères issus du végétal matériaux à propriété spécifiques pour des applications ciblées en industrie plastique », service des matériaux polymères et composites, université de Mons Hainant Belgique. Le 28 mars 2006.

[50] **Sahana D, Mittal G, Bhardwaj V, Kumar MR.** PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2008;97(4)1530-42.

[51] **Sheng Y, Yuan Y, Liu C, Tao X, Shan X, Xu F.** In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA–PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes effect of PEG content. *Journal of Materials Science Materials in Medicine*. 2009;201881-91.

[52] **Damge C, Maincent P, Ubrich N.** Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *Journal of controlled release*. 2007;117(2)163-70.

[53] **Bajpai A, Choubey J.** Release study of sulphamethoxazole controlled by swelling of gelatin nanoparticles and drug-biopolymer interaction. *Journal of Macromolecular Science, Part A Pure and Applied Chemistry*. 2005;42(3)253-75.

[54]. **Arias J, Gallardo V, Ruiz M, Delgado A.** Ftorafur loading and controlled release from poly (ethyl-2- cyanoacrylate) and poly (butylcyanoacrylate) nanospheres. *International journal of pharmaceutics*. 2007;337(1-2)282-90.

[55] Polymer-Based Wound Dressings Loaded with Essential Oil for the Treatment of Wounds A Review Bruna Michele A. de B. Buriti 1, Pablo Luis B. Figueiredo 2 , Marcele Fonseca Passos 2,3 and Joyce Kelly R. da Silva 1,3,*

[56] Rigby GW **Chemical Process and Chemical Compounds derived therefrom.** *United States Patent Office*. du Pont de Nemours & Company, Wilmington, a corporation of Delaware. United States 2047226; 1935 4

- [57] Shahidi F **Nutraceuticals and bioactives from seafood byproducts**. In *Advances in seafood byproducts, 2002 Conference proceedings*. Edited by Bechtel PJ. University of Alaska, Fairbanks Alaska Sea Grant Program; **2002** 247-263
- [58] Crini G, Badot PM, Guibal E **Chitine et Chitosane. Du polymère à l'application** Presses universitaires de Franche-Comté; **2009**
- [59] Ehrlich H, Maldonado M, Spindler KD, Eckert C, Hanke T, Born R, Goebel C, Simon P, Heinemann S, Worch H First evidence of chitin as a component of the skeletal fibers of marine sponges.I. Verongidae (Demospongia porifera). *Journal of experimental zoology part B - Molecular and developmental*, 2007, 308B(4)347-356.
- [60] Goycoolea FM, Arguelles-Monal W, Peniche C, Higuera-Ciajara I **Effect of chitosan on the gelation of kappa-carrageenan under various salt conditions**. Amsterdam Elsevier Science Bv; **1999**
- [61] Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ **Food applications of chitin and chitosans**. *Trends Food Sci Technol*, **1999**, 10(2)37-51
- [62] Kim S-K **Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives Biological Activities and Applications** CRC Press; **2010**
- [63] Nadarajah K, Kader J, Mazmira M, Paul DC **Production of Chitosan by Fungi**. *Pakistan Journal of Biological Sciences* **2001**, 4(3)261-265
- [64] Tokura S, Tamura H **Chitin and Chitosan**. In *Comprehensive Glycoscience*. Edited by Johannis PK. Oxford Elsevier; **2007** 449-475
- [65] Romano P, Fabritius H, Raabe D **The exoskeleton of the lobster Homarus americanus as an example of a smart anisotropic biological material**. *Acta Biomaterialia*, **2007**, 3(3)301-309
- [66] Zhou F, Wu ZW, Wang ML, Chen KM **Structure and mechanical properties of pincers of lobster (Procambarus clarkii) and crab (Eriocheir Sinensis)**. *Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **2010**, 3(6)454-463
- [67] Roberts GAF **Chitin chemistry**. London Macmillan; **1992**
- [68] Brugherotto, J., Goycoolea, F. M., Arguelles-Monal, W., Desbrière, J., & Rianudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterisation. *Polymer*, 42, (2001) 3569-3580.
- [69] Chen RH, Chang JR, Shyur JS **Effects of ultrasonic conditions and storage in acidic solutions on changes in molecular weight and polydispersity of treated chitosan**. *Carbohydr Res*, **1997**, 299(4)287-294
- [70] Yang BY, Montgomery R **Degree of acetylation of heteropolysaccharides**. *Carbohydr Res*, **2000**, 323(1-4)156-162
- [71] Cho YW, Jang J, Park CR, Ko SW **Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins**. *Biomacromolecules*, **2000**, 1(4)609-614

- [72] Li J, Du YM, Yang JH, Feng T, Li AH, Chen P **Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme.** *Polym Degrad Stabil*, **2005**, 87(3)441-448
- [73] Chen CS, Liao WY, Tsai GJ **Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation.** *J Food Prot*, **1998**, 61(9)1124-1128.
- [74] Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ **Food applications of chitin and chitosans.** *Trends Food Sci Technol*, **1999**, 10(2)37-51
- [75] Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HI, Wu JCG, Lin JG **Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall.** *Acta Pharmacol Sin*, **2004**, 25(7)932-936.
- [76] Howling GI, Dettmar PW, Goddard PA, Hampson FC, Dornish M, Wood EJ **The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro.** *Biomaterials*, **2001**, 22(22)2959-2966.
- [77] Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG **Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes.** *J Biomed Mater Res*, **2000**, 51(4)586-595
- [78] Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, Silva JC, Borges JP, Pires E, Chaves P *et al* **Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing.** *Wound Repair Regen*, **2009**, 17(6)817-824
- [79] Minagawa T, Okamura Y, Shigemasa Y, Minami S, Okamoto Y **Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing.** *Carbohydr Polym* **2007**, 67(4)640-644
- [80] AUGUSTIN M.A., SANGUANSRI L., MARGETTS C., YOUNG B., 2001. Microencapsulation of food ingredients, *food Australia*, 53,220-223.
- [81] Kerdudo, A., Antipolis N.S. & Directeur C., “Optimisation de la conservation des cosmétiques impact de la formulation”, recherche de nouveaux conservateurs naturels, (2015), pp, 36-41.
- [82] Hamid Majeeda, Yuan-Yuan Biana, Barkat Alia, Anjum Jamilb, Usman Majeedb, Qaiser Farid Khanc, Khalid Javed Iqbald, Charles F Shoemaker and Zhong Fanga, *Essential Oil Encapsulations Uses, Procedures, and Trends*.
- [83] A. El Asbahani, K. Miladi, W. Badri, M. Sala, E.H. Aït Addi, H.Casabianca, A. El Mousadik, D. Hartmann, A. Jilale, F.N.R. Renaud, A. Elaissari , *Essential oils From extraction to encapsulation*.
- [84] Adrien Faure, *L’encapsulation chimique et physico-chimique d’actifs*, publication 03-03-2023.

- [85] Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. and Desobry, S. (2006) Flavour Encapsulation and Controlled Release A Review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 1-21.
- [86] Chanchal Tiwari, Mahima Choudhary, Princy Malik, Pankaj Kumar Jaiswal, Reetu Chauhan, Transdermal Patch A Novel Approach for Transdermal Drug Delivery, *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 2022; 12(6)179-188
- [87] Md. Intakhab Alam, Nawazish Alam, Vikramjit Singh, Md. Sarfaraz Alam, Md. Sajid Ali, Tarique Anwer, Mohammed M. Safhi, TYPE, PREPARATION AND EVALUATION OF TRANSDERMAL PATCH A REVIEW, Accepted on 30 July 2013.
- [88] Euzeby JP.,(2007). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
- [89] (UE, 2005) .Union Européenne, règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal Officiel de l'Union Européenne*, L 338/24.
- [90] Prescott L., Harley J., Klein D., (2010). *Microbiologie 3ème Ed.*, De Boeck. 520-582.
- [91] Euzeby JP., (2007). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
- [92] <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2796791-enterococcus-faecalis-causes-symptomes-traitement-infection/>
- [93] **Berman J.** *Candida albicans*. *Current biology*. 2012;22(16)R620-R2.
- [94] **Fidel Jr PL, Vazquez JA, Sobel JD.** *Candida glabrata* review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(1)80-96.
- [95] *Mousavi B Aspergillus* species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards 2016 Mar; 2(1)36–42.
- [96] Extraction, characterization and bioactivity of chitosan from farms shrimps of Basra province by chemical method, To cite this article Israa Abd Al-Hasan Hamdan et al 2020 *J. Phys. Conf. Ser.* 1660 012023.
- [97] **Margurite Rinaudo**, Michel Milas and Pham Le Dung Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *Int. J. Biol. Macromol* , Vol. 15, (1993) october.
- [98] **Kurita K.** (2001) Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Prog. Polym. Sci.*, 26, 1921 – 1971.
- [99] Okamoto K, Brinker A, Paschen SA, Moarefi I, Hayer-Hartl M, Neupert W, Brunner M. (2002) Journal Article | Research Support.

[100] <https://hal.science/hal-01908481>.

[101] Raval N, Maheshwari R, Kalyane D, Youngren-Ortiz SR, Chougule MB, Tekade RK. Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. Basic fundamentals of drug delivery Elsevier; 2019. p. 369-400.

[102] Djeddi S, Bouchenah N, Settar I, Skaltsa HD. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. Chemistry of Natural Compounds. 2007;43:487-90.

[103] Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F., et Chefrour, A., « Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie) » août, 2016, pp, 56-58.

[104] : Khebichat, A., « évaluation de l'activité antimicrobienne de cendre de bois » (2013), pp, 68-70.

[105]: Khan, T. A., Peh ? K? K? & C'ing. Mechanical bioadhesive strength and biological evaluation of chitosan films for wound dressing. Journal of Pharmaceutical and Pharmaceutical Science, 3(3), H.S. (2000) 3003-3371

[106]: Fernandez-Kim S. O. (2004) Physicochemical and functional properties of crawfish chitosan as affected by different processing protocols, Thesis, Louisiana State University

[107]: Mesfin M. Mekonnen 1, Markus Pahlow 1 , Maite M. Aldaya 2 , Erika Zarate 3 and Arjen Y. Hoekstra.(2013) Sustainability, Efficiency and Equitability of Water Consumption and Pollution in Latin America and the Caribbean.

ANNEXES

Extraction de chitosane :

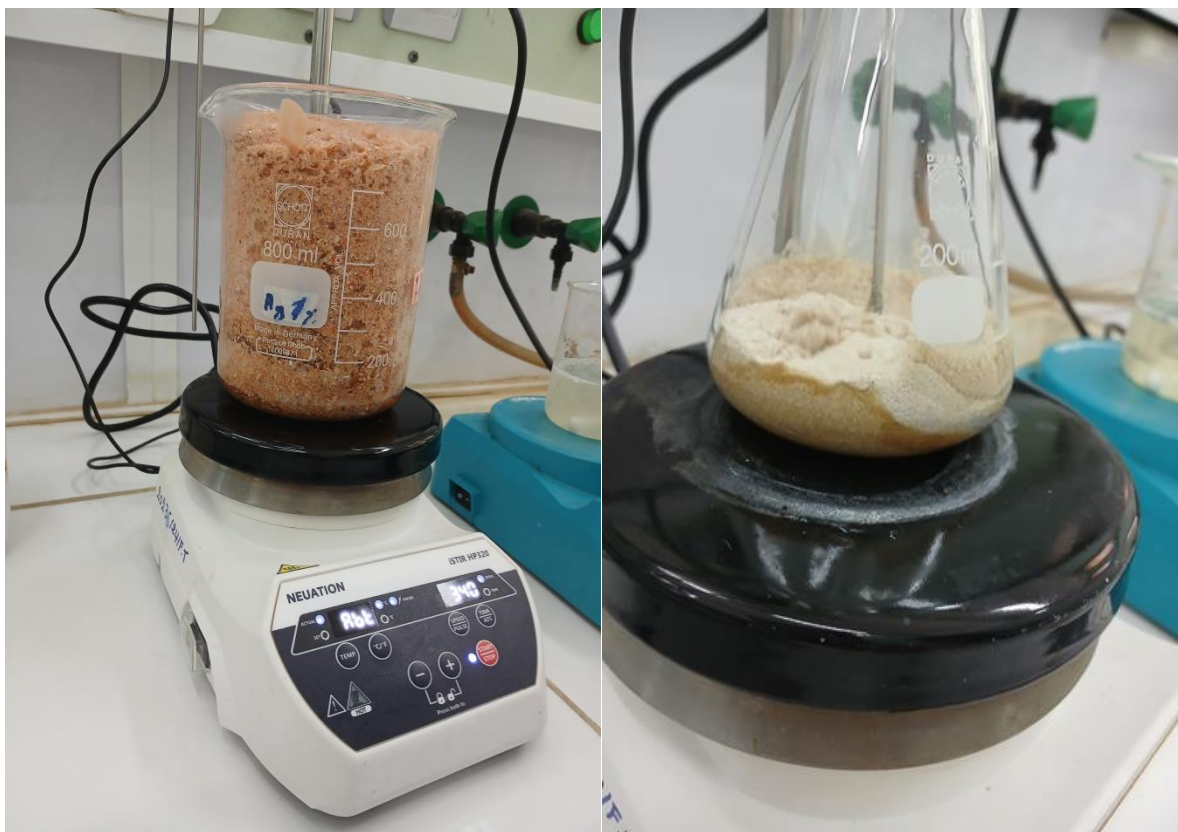


Figure : Etape de déminéralisation et deprotinisation de chitosane

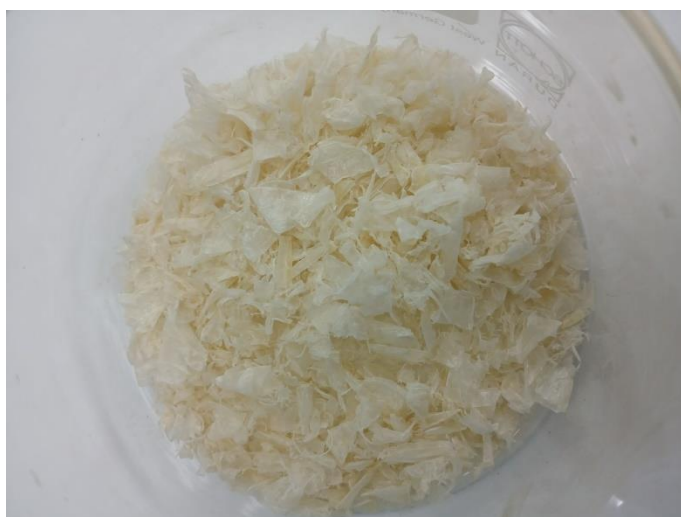


Figure : Granuler du chitosane de crevette.

Activite antioxydant



Figure : Activité antioxydant de HEO

Souches bactériennes identifiées



Enterobacter



Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli (E.coli)



Staphylococcus aureus

Les membranes de chitosane du crevette et Fisher scientifique

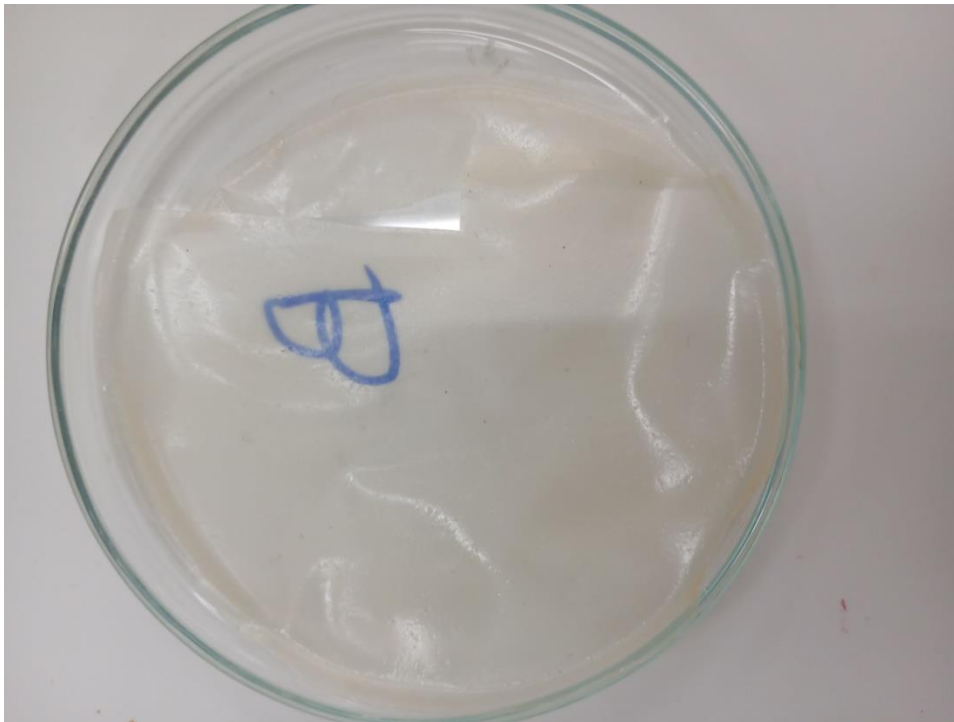


Figure :Mebrane réticuler avec l'acide maléique

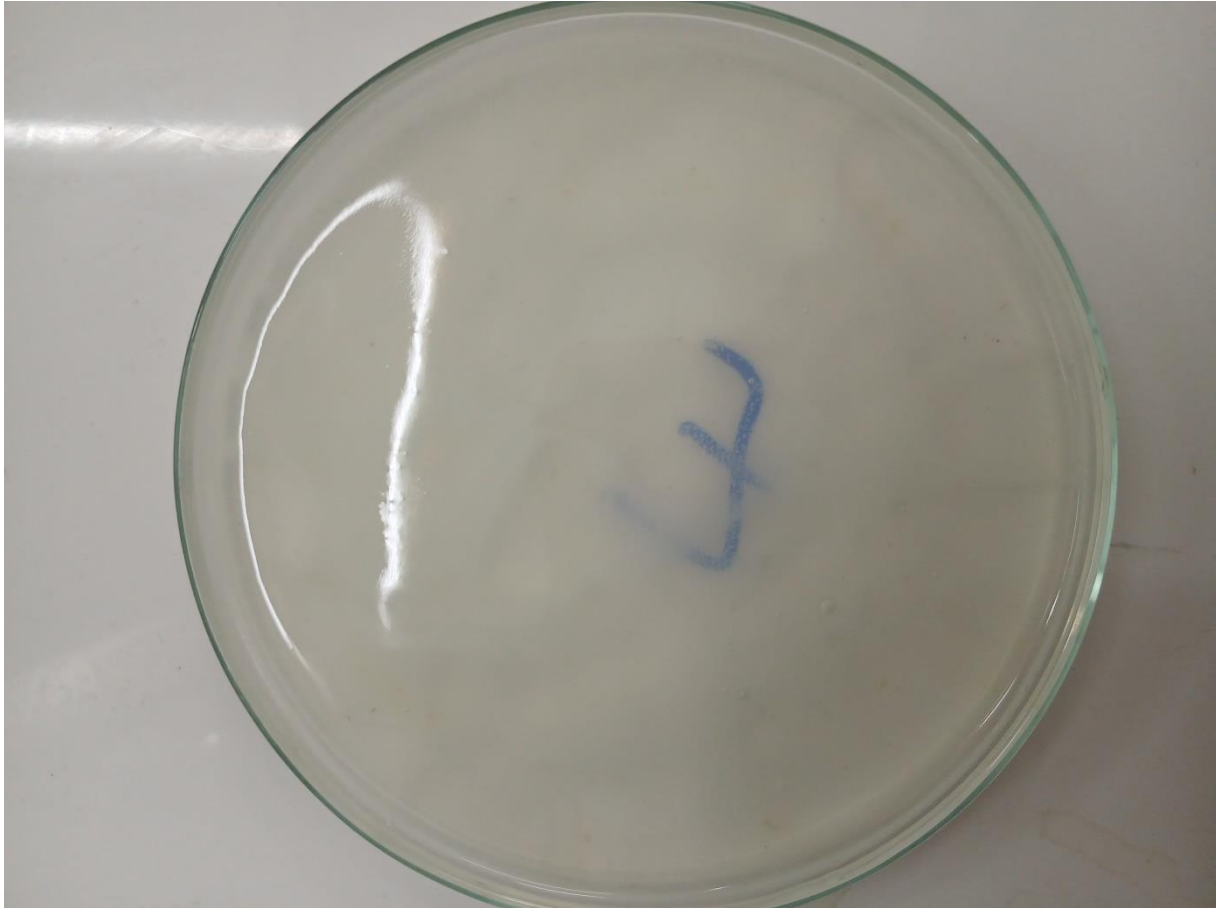


Figure : Membrane du chitosane de crevette avec glutaraldehyde



Figure : Membrane du chitosane et d HEO avec glutaraldehyde



Figure :Membrane du chitosane reticuler avec glutaraldehyde