

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahleb Blida 1



Faculté des Sciences
Département de chimie

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master en :
Chimie des produits naturels

Titre
Systemes nanoparticulaires à base de biopolymères
pour l'encapsulation des huiles essentielles

Présenté Par
KsentiniWarda
Et
Chaabane Nacera

Soutenu le 23/09/2024 à Blida, devant le jury composé de :

S. Brahimi	MCB, Université Blida1	Présidente
Z. Zeffouni	MCB, Université Blida1	Examinatrice
F. M'zyene	MCB, Université Blida1	Promotrice

Promotion 2023/2024

ملخص

- الهدف من هذه الدراسة هو تغليف الزيوت العطرية بجسيمات الشيتوزان النانوية وتقييم بعض الأنشطة البيولوجية على الزيت العطري للزنجبيل. يتم الحصول على زيت الزنجبيل الأساسي عن طريق التقطير المائي من الجذور المجففة.
- تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة باستخدام تقنية كسح الجذور الحرة ثنائي فينيل-1-بيكريليهيدرازيل (DPPH).
- ✓ تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لزيوت الزنجبيل العطرية والزيوت العطرية المغلفة على 03 سلالات بكتيرية: الإشريكية القولونية، *Bacillus subtilis*، المكورات العنقودية، بطريقة الانتشار على وسط أجار صلب.
- ✓ الزيت العطري الذي يتم الحصول عليه يكون لونه أصفر إلى بني مع عائد 0.45%.
- ✓ أثبت تقييم نشاط مضادات الأكسدة أن قوة مضادات الأكسدة للزنجبيل كانت أقل من قوة حمض الأسكوربيك ($IC_{50} = 0,21$ ملليغرام/مل، 0,4 ملليغرام/مل على التوالي).
- ✓ تشير نتائج النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات إلى أن الزيت العطري له نشاط مثبت ملحوظ على جميع السلالات التي تم اختبارها تقريباً ويختلف تثبيط نمو السلالة حسب النوع وبالنسبة للزيوت العطرية المغلفة نظراً للنشاط المنخفض.

الكلمات المفتاحية: الشيتوزان، جسيمات النانوية، الزيوت العطرية.

ABSTRACT

The objective of this study is to encapsulate ginger essential oil in chitosan nanoparticles and evaluate its biological activities. The essential oil was obtained by hydrodistillation from dried rhizomes of ginger.

- **Antioxidant activity** was assessed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging method.
- **Antibacterial activities** of both the ginger essential oil and encapsulated essential oil were tested against three bacterial strains: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*, using the disk diffusion method on solid agar medium.

The essential oil obtained was yellow to brown with a yield of 0.45%. The antioxidant activity evaluation indicated that the antioxidant power of ginger essential oil was lower than that of ascorbic acid (IC₅₀ = 0.4 mg/ml compared to 0.21 mg/ml for ascorbic acid). The antibacterial results showed that the essential oil exhibited significant inhibitory activity against almost all tested strains, although the encapsulated essential oil demonstrated reduced activity depending on the bacterial species.

Keywords: nanoparticles, chitosan, essential oil

RÉSUMÉ

L'objectif de cette étude est d'encapsuler l'huile essentielle de gingembre dans des nanoparticules de chitosane et d'évaluer ses activités biologiques. L'huile essentielle a été obtenue par hydrodistillation à partir de rhizomes de gingembre séchés.

- **L'activité antioxydante** a été évaluée en utilisant la méthode de piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).
- **Les activités antibactériennes** des huiles essentielles de gingembre et des huiles essentielles encapsulées ont été testées sur trois souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, en utilisant la méthode de diffusion sur milieu solide de gélose.

L'huile essentielle obtenue est de couleur jaune à brune avec un rendement de 0,45 %. L'évaluation de l'activité antioxydante a montré que le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle de gingembre était inférieur à celui de l'acide ascorbique (IC₅₀ = 0,4 mg/ml contre 0,21 mg/ml pour l'acide ascorbique). Les résultats antibactériens ont montré que l'huile essentielle possédait une activité inhibitrice significative contre presque toutes les souches testées, bien que l'huile essentielle encapsulée ait montré une activité réduite en fonction des espèces bactériennes.

Mots clés : Chitosane, nanoparticules, huile essentielle

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, Tout-Puissant et Miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail et nous a permis d'être ce que nous sommes aujourd'hui.

Nous adressons nos sincères remerciements à **Dr. M'ZYENE FATIMA** pour avoir accepté d'encadrer ce travail. Sa rigueur scientifique, sa disponibilité, ses précieux conseils et sa patience nous ont accompagnés tout au long de cette aventure.

Nous exprimons notre profonde gratitude aux membres du jury, **Dr. Zeffouni** et **Dr. Brahim**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Nos remerciements chaleureux vont également à toute l'équipe du laboratoire pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Enfin, nous souhaitons remercier toutes les personnes qui nous ont aidés et soutenus, de près ou de loin, dans la réalisation de ce projet.

DÉDICACES

C'est un grand honneur pour moi de dédier ce modeste travail à :

Mes merveilleux parents, **Mohamed** et **Hamama**. Je remercie Dieu chaque jour de vous avoir comme parents.

Ma sœur **Chahira**, merci pour ton soutien indéfectible et ton aide, ainsi qu'à toute ma famille.

Mon cher époux **Oussama**, merci infiniment pour ton soutien inébranlable. Ta présence constante a été la clé de la réalisation de mes rêves et de mon succès.

Mon binôme **Nacera**, merci du fond du cœur.

Warda Kesentini

DÉDICACES

Je dédie ce mémoire à :

À la douce mémoire de mes chers parents, que Dieu leur accorde le paradis. Vous êtes à jamais dans mon cœur, et ce travail est le fruit de votre amour et de vos sacrifices.

À mes frères et sœurs, pour leur encouragement et leur soutien infaillibles.

À mes belles-sœurs, mes nièces et neveux.

À mes nièce **melissa** et **Sihem**, merci pour votre soutien et encouragements.

À toute ma famille, à mes amies **Imène** et **Nadia**.

À mon binôme, **Warda Kesentini**.

Nacera Chabane

TABLE DES MATIÈRES

ملخص

ABSTRACT

RESUME

REMERCIEMENTS

DEDICACES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATION

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE.....1

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE2

I.1 Généralité sur les huiles essentielles.....2

I.1.1 Définition.....2

I.1.2 Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....2

I.1.2.1 Hydro distillation.....2

I.1.3 Propriétés physico-chimique des huiles essentielles.....3

I.1.4 Composition chimique des huiles essentielles.....3

I.1.5 Utilisation des huiles essentielles.....3

I.1.6 Conservation des huiles essentielles.....4

I.1.7 Toxicité des huiles essentielles.....4

I.1.8 Propriétés biologiques des huiles essentielles.....4

I.1.9 Stabilité des huiles essentielles5

I.2 Huile essentielle de gingembre6

I.2.1 Généralité sur le gingembre6

I.2.2 Composition chimique de l'huile essentielle de gingembre.....7

I.3 nanoparticules polymères.....8

I.3.1 Définition des nanoparticules polymères.....8

I.3.2 Méthodes de préparation des nanoparticules polymères.....8

I.3.3 Nanoparticules de chitosane.....11

I.4. Avantage de l'encapsulation des huiles essentielles par les nanoparticules de chitosane. 12

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel végétal	14
II.1.1 Protocole expérimental d'extraction des huiles essentielles	14
II.1.2 Rendement d'extraction des huiles essentielles	15
II.2 Encapsulation de l'Huile Essentielle de Gingembre sous Forme de Nanoparticules..	16
II.2. 1 Réaction du TPP avec le Chitosane	19
II.2. 3. Encapsulation de l'huile essentielle de gingembre	20
1. Préparation des Ingrédients	20
2. Préparation du Mélange	20
II.3 Évaluation du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle du gingembre	22
II.3.1 Principe	22
II.3.2 Procédure expérimentale pour évaluer l'activité anti-radicalaire d'une huile essentielle .23	
II.3.3 Détermination de la concentration inhibitrice CI	24
II.3.4 Évaluation de l'activité antioxydant d'une substance en mesurant sa capacité à neutraliser.les .radicaux .libres	26
II.4 Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de gingembre	27
II.4.1 Matériel, produits et milieux de culture	27
II.4.2Méthodologie	28
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	
III Étude phytochimique	32
III.1 Détermination du rendement d'extraction de l'huile essentielle de gingembre par hydrodistillation	32
III.2 Activités biologiques	33
II.2.1 Activité antioxydante	33
III. 3 L'activité antibiotique	37
III. 3.1 L'activité antibactérienne	37
CONCLUSION	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	42

LISTE DES ABREVIATIONS

Cs	: Chatoyante
DMSO	: Dimethylsulfoxyde
DPPH	: 2, 2-diphényl-1- picrylhydrazyl
HE	: Huile essentielle
IC50	: Concentration inhibitrice de 50% des radicaux libres
MH	: Mueller Hinton
TPP	: Tripolyphosphate

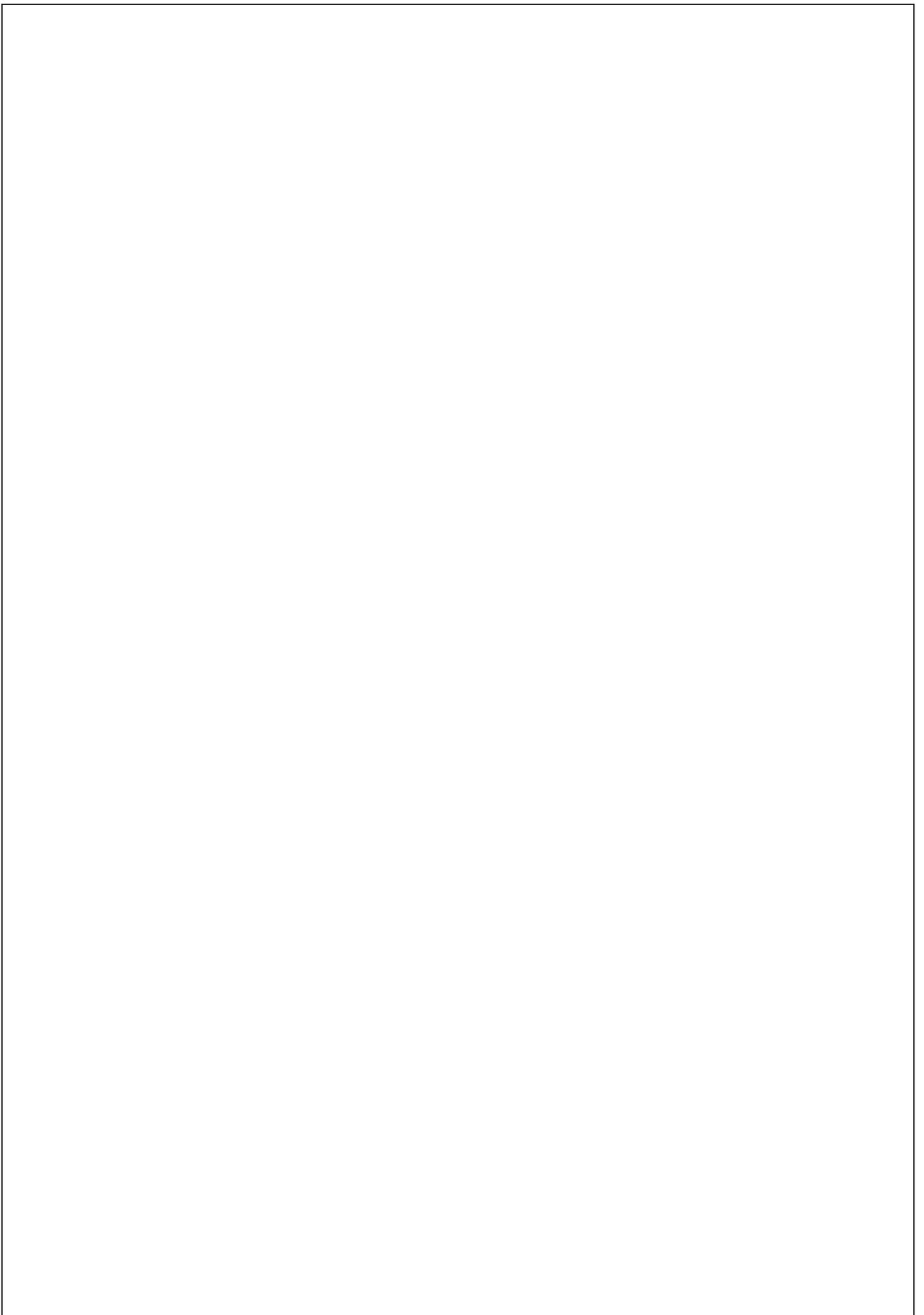
LISTE DES FIGURES

Figure I.1	Diapositif expérimental de l'hydrodistillation (type clevenger).	14
Figure I.2	Gingembre	6
Figure I. 3	Les deux principaux types de nanoparticules polymères ...	8
Figure I.4	Structure chimique de chitine et chatoyante	12
Figure II.1	Dispositif d'extraction Clevenger.....	14
Figure II.2	Préparation de la Solution de Chitosane.....	18
Figure II.3	Préparation de la Solution de TPP + CS	
Figure II.4	Mélange TPP avec chitosane	
Figure II.5	Résultats de la neutralisation de chitosane +TPP	20
Figure II.6	Encapsulations les HE de Zingiber officinale	21
Figure II.7	Séparations les nanoparticules par centrifugeuse	21
Figure II.8	Les nanoparticules et les dépôts sont étalés	22
Figure II.9	Protocole expérimental du dosage de l'activité antioxydant	25
Figure II.10	Ecoulement de milieu de culture (MH)	29
	
Figure II.11	Une suspension bactérienne	29
Figure II.12	Ensemencementdes souches bactériennes	30

Figure II.13	Déposition des disques	31
Figure III.1	Activité anti radicalaire (DPPH)	33
Figure III.2	Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique en fonction de la concentration	35
Figure III.3	Pourcentage d'inhibition de l'HE Z.officinale en fonction de la concentration	36
Figure III.4	Les résultats de l'activité antibactérienne	38

LISTE DES TABLEAUX

Tableau II.1	Résultats de neutralisation du TPP avec le Chitosane	19
Tableau II.2	Matériaux et produits utilisés dans l'étude de l'activité antioxydants	23
Tableau II.3	Matériaux et produits utilisés dans l'étude de l'activité antibactérienne	27
Tableau II.4	Matériaux et produits utilisés dans l'étude de l'activité: Souches bactériennes utilisées dans l'étude.	28
Tableau III.1	Rendement d'extraction d'HE	32
Tableau III.2	Résultats de l'absorbance et l'inhibition de l'acide ascorbique	34
Tableau III.3	Résultats de l'absorbance et l'inhibition de l'huile... essentielle deZ. officinale	35



INTRODUCTION GENERALE

Depuis des siècles, l'homme exploite les plantes, en particulier les plantes aromatiques, dans divers domaines tels que la parfumerie, la pharmacologie et l'agroalimentaire, en s'appuyant sur des propriétés souvent découvertes par hasard [1]. Dans la nature, en particulier dans le règne végétal, les plantes contiennent de nombreuses substances biologiquement actives qui peuvent fournir des sources naturelles et nouvelles d'agents antibactériens [2].

Le gingembre, une plante aromatique et médicinale très prisée, est originaire d'Asie et est reconnu pour ses nombreuses vertus, notamment anti-inflammatoires, digestives et tonifiantes. L'huile essentielle de gingembre, extraite de ses rhizomes, est particulièrement appréciée pour ses effets bénéfiques sur la santé. Son parfum chaleureux et épicé en fait un ingrédient recherché en aromathérapie et en cosmétique, où elle contribue à des formulations destinées à revitaliser et apaiser le corps et l'esprit.

Récemment, la recherche s'est également intéressée à l'encapsulation des huiles essentielles de gingembre dans des nanoparticules de chitosane. Cette technique innovante permet de protéger les composés actifs de l'huile essentielle, d'améliorer leur stabilité et de contrôler leur libération [2]. Les nanoparticules de chitosane, dérivées de la chitine présente dans les exosquelettes de crustacés, offrent une biocompatibilité et une biodégradabilité remarquables. L'encapsulation dans ces nanoparticules permet non seulement de maximiser les bienfaits thérapeutiques de l'huile essentielle de gingembre, mais aussi de prolonger son efficacité et de réduire sa volatilité, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans les domaines de la médecine et de la cosmétique.

Comment l'utilisation de nanoparticule bio polymérique peut –elle améliorer l'encapsulation ,la stabilité et la libération contrôlé des huiles essentielles ,tout en garantissant leur biodégradabilité pour l'environnement

Ce travail se divise en deux parties principales : d'une part, une mise au point bibliographique qui regroupe une synthèse des travaux sur les huiles essentielles de gingembre et sur l'encapsulation par chitosane ; d'autre part, une partie expérimentale décrivant les protocoles d'extraction, l'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de gingembre, l'activité antioxydante, ainsi que les résultats obtenus et leur discussion.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Généralité sur les huiles essentielles

I.1.1 Définition

Les huiles essentielles, dérivées du mot latin *essentia* qui signifie « nature d'une chose », sont constituées de molécules volatiles, hydrophobes et odorantes.

Leur consistance peut varier de fluide à épais et leur couleur dépend des plantes d'origine.

Elles sont obtenues à partir des racines, de l'écorce, des feuilles, des fleurs ou des tubercules de diverses plantes, qu'elles soient terrestres ou marines [3].

En moyenne, une goutte d'huile essentielle contient environ 150 molécules différentes, principalement des terpènes (hydrocarbures aromatiques) et des composés oxygénés comme les alcools, les aldéhydes, les cétones et les esters [3].

I.1.2 Méthodes d'extraction des huiles essentielles

I.1.2.1 Hydro distillation

C'est la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Pour extraire les huiles essentielles, on commence par plonger la matière première dans de l'eau et la porter à ébullition, c'est ce qu'on appelle l'hydro distillation. Ensuite, on sépare l'eau et la matière première : soit on place l'eau au fond de la cuve et on la chauffe à ébullition pour que la vapeur traverse la matière (vapo-hydro distillation), soit on génère la vapeur d'eau dans une chaudière extérieure (vapo-distillation). Dans les deux cas, la vapeur d'eau contenant l'huile essentielle est dirigée vers un condenseur où elle se refroidit. L'eau et l'huile se condensent et se séparent ensuite dans un essencier, où elles se divisent naturellement en eau aromatisée et huile essentielle [4].

I.1.3 Propriétés physico-chimique des huiles essentielles

Les propriétés physiques des huiles essentielles incluent divers indices, pouvoir rotatoire, viscosité, densité, solubilité dans l'alcool, ainsi que leurs points d'ébullition et de congélation.

Généralement, les huiles essentielles sont incolores ou d'une teinte jaune pâle et restent liquides à température ambiante. Leur nature huileuse les rend liposolubles, ce qui les rend peu solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques apolaires, les huiles grasses, et les alcools [5].

Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau, à l'exception de quelques huiles essentielles comme celles de saffran (*Saffron albidum*), de girofle (*Eugenia caryophyllata*), et de cannelle (*Cinnamomum zeylanicum*) [5].

Les huiles essentielles sont hautement volatiles et sensibles à l'oxydation en raison de la structure de leurs molécules, qui comprennent des doubles liaisons et des groupes fonctionnels tels que les groupes hydroxyle, aldéhyde, et ester. Elles s'oxydent facilement sous l'effet de la lumière, de la chaleur, et de l'air [6]

I.1.4 Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles se composent principalement de terpénoïdes, qui sont des molécules volatiles de petite taille. Ces terpénoïdes sont produits à partir d'isoprène et de composés aromatiques dérivés du phénylpropane. [7]

Les terpénoïdes, notamment les monoterpènes en C10 et les sesquiterpènes en C15, sont les constituants principaux des huiles essentielles, tandis que d'autres types de terpénoïdes, comme les diterpènes et les triterpènes, ne sont pas extraits par distillation. Les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, tels que l'acide cinnamique et l'aldéhyde cinnamique, sont moins fréquents dans les huiles essentielles que les terpénoïdes[8].

I.1.5 Utilisation des huiles essentielles

- Dans aromathérapie

Aromathérapie vient du grec aroma « odeur » et thérapie « soins ». Il s'agit donc de soigner à l'aide de principes odoriférants. L'aromathérapie fait partie intégrante de la phytothérapie (Phyto « plante ») [9].

- Dans industrie agroalimentaire

Les huiles essentielles sont utilisées en industrie alimentaire comme agents naturels de conservation [10]. Leur utilisation est due à la présence de composés ayant des propriétés antimicrobiennes et anti oxydantes [11]. Les huiles essentielles peuvent être utilisées également pour apporter de la saveur et un arôme raffiné aux cafés, thés, boissons, pâtisseries et différents mets[11].

- Dans industries pharmaceutiques et cosmétiques

Les huiles essentielles entrent dans la fabrication des produits pharmaceutiques, en raison de leurs propriétés thérapeutiques et dans celle des parfums, des produits de toilette, des cosmétiques, des savons, en raison de leurs propriétés aromatiques [12].

I.1.6 Conservation des huiles essentielles

Pour préserver les huiles essentielles de l'oxydation et de la dépolymérisation, il est crucial de prendre certaines précautions. Il est recommandé de les conserver dans des flacons en verre coloré ou opaque, équipés de bouchons hermétiques, afin de les protéger de l'air et de la lumière, qui sont les principaux facteurs de leur dégradation [13].

Si elles sont correctement stockées, les huiles essentielles peuvent se conserver environ trois ans. Cependant, les huiles essentielles d'agrumes, qui sont plus sensibles, doivent être renouvelées chaque année [14].

I.1.7 Toxicité des huiles essentielles

La toxicité des huiles essentielles varie en fonction de leur composition chimique [15].

Bien que connue depuis longtemps, c n'est que récemment que leur mécanisme d'action sur des organes tels que le foie et le système nerveux a été clarifié. Contrairement aux idées reçues, l'aromathérapie n'est pas une « médecine douce ». Comme toute thérapie efficace, elle comporte des risques [15].

Cette toxicité peut se manifester de diverses manières, notamment par des réactions allergiques, une action dermo-caustique, et une néphrotoxicité, ainsi que des irritations des muqueuses et des voies respiratoires. Lors de l'utilisation des huiles essentielles, elles ne doivent jamais être ingérées pures, mais diluées entre 5 et 15 % [16].

I.1.8 Propriétés biologiques des huiles essentielles

Les propriétés biologiques des huiles essentielles sont étroitement liées à leur composition chimique et aux éventuels effets synergiques entre leurs différents composants [17]. De nombreuses publications ont mis en lumière les effets biologiques des terpènes, mettant en avant leurs propriétés anti-inflammatoires, décongestionnantes, antiseptiques, antivirales,

antifongiques, antiparasitaires, mucolytiques, cholagogues et cicatrisantes. Ces effets biologiques des huiles essentielles ont été confirmés par de nombreuses études scientifiques rigoureuses [17].

I.1.9 Stabilité des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont sensibles à divers facteurs physico-chimiques tels que l'oxygène, la lumière, la température et le pH.

- Effet de la lumière : La lumière, notamment les rayons ultraviolets, peut dégrader certains composants des huiles essentielles [18].
- Effet de température: Des températures élevées peuvent provoquer la perte de composés volatils présents dans les huiles essentielles [18].
- Effet de l'oxygène: L'exposition à l'oxygène, surtout en présence de lumière, peut provoquer l'oxydation des composés insaturés [18].
- Effet de contaminants : La présence de micro-organismes peut contaminer les huiles essentielles, modifiant leur composition chimique [18].

I.2 Huile essentielle de gingembre

I.2.1 Généralité sur le gingembre

Le gingembre, connu scientifiquement sous le nom de *Zingiber officinale*, est une plante herbacée originaire d'Asie, appartenant à la famille des Zingibéracées. [19]

La partie utilisée est le rhizome, caractérisé par son aspect noueux, sa couleur beige à l'extérieur et jaune à l'intérieur. En cuisine, le gingembre est très prisé pour sa saveur piquante et aromatique, il est utilisé frais, séché, en poudre ou mariné, notamment dans les cuisines asiatiques et indiennes. Sur le plan médicinal, il est reconnu pour ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, souvent utilisé pour soulager les nausées, les troubles digestifs et les douleurs musculaires, ainsi que pour renforcer le système immunitaire [20].

Le gingembre contient des composants actifs comme les gingérols et les shogaols, ainsi que des vitamines B6 et C, et des minéraux tels que le magnésium, le potassium et le manganèse. Ses bienfaits pour la santé incluent l'amélioration de la digestion, la réduction des ballonnements et des gaz, ainsi que des propriétés antibactériennes et antivirales. Toutefois, une consommation excessive peut entraîner des brûlures d'estomac ou des irritations de la bouche, et il peut interagir avec certains médicaments anticoagulants. Le gingembre demeure une plante polyvalente, utilisée depuis des millénaires pour ses multiples bienfaits culinaires et médicaux [21].



Figure I.2 gingembre

I.2.2 Composition chimique de l'huile essentielle de gingembre

L'huile essentielle de gingembre (*Zingiber officinale*) est riche en composés bioactifs, principalement le gingerol, qui lui confère son goût piquant et ses propriétés antioxydantes. Parmi les autres constituants, on trouve le zingibérène, un sesquiterpène majoritaire, ainsi que le bêta-sesquiphellandrène et le shogaol, un dérivé du gingerol. Ces composés contribuent non seulement aux caractéristiques aromatiques de l'huile, mais aussi à ses effets anti-inflammatoires et médicinaux. L'utilisation de l'huile essentielle de gingembre s'étend à l'aromathérapie, à la cuisine et à diverses applications thérapeutiques [22].

I.2.3 Taxonomie et classification botanique

Le tableau explique la classification taxonomique de *Gingembre* qui appartient à la famille des *zingibéracées* du genre *Zingiber* [22].

Règne	Végétal
Sous-règne	<i>Trachéobionta</i>
Division	<i>Angiospermes ou Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida (ou Monocotylédones)</i>
Sous-classe	<i>Zingibéridées</i>
Ordre	<i>Zingibérales (ou Scitaminales)</i>
Famille	<i>Zingibéracées</i>
Sous famille	<i>Zingibéroïdées</i>
Genre	<i>Zingiber</i>
Espèce	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>

I.3 Les nanoparticules polymères

I.3.1 Définition des nanoparticules polymères

Les nanoparticules polymères sont des particules solides colloïdales de taille submicronique, généralement entre 10 et 1000 nm de diamètre [23]. Elles se divisent en deux catégories distinctes selon leur structure (voir Figure) : les nanosphères, qui sont des matrices polymériques contenant la molécule active, et les nanocapsules, qui sont des vésicules enveloppées par une couche polymérique où le principe actif est confiné dans un réservoir liquide ou solide [24].

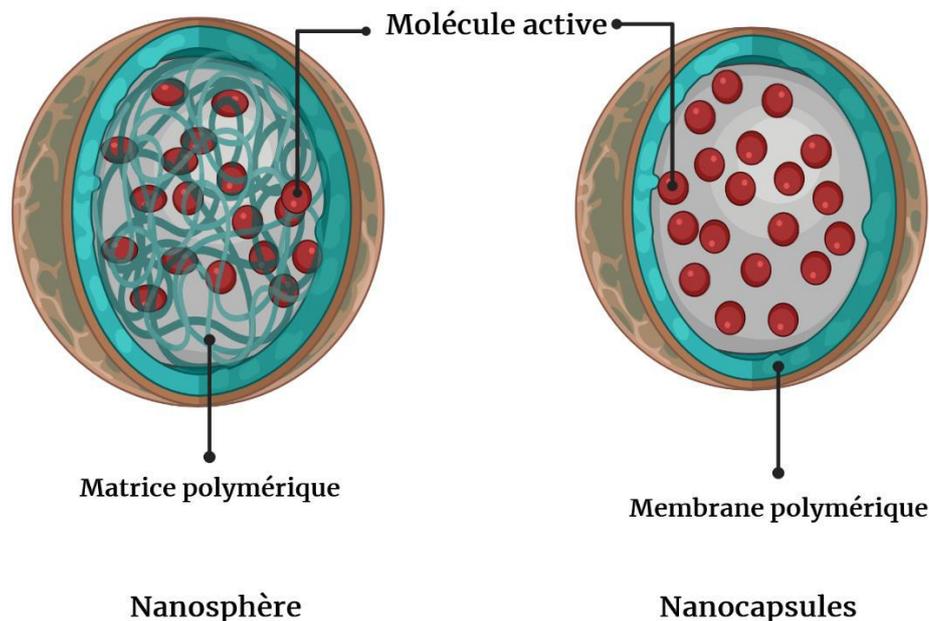


Figure I.3: Les deux principaux types de nanoparticules polymères [25]

I.3.2 Méthodes de préparation des nanoparticules polymères

Les méthodes de préparation des nanoparticules polymères peuvent être classées en deux catégories principales.

La première repose sur le mécanisme de polymérisation des monomères, tandis que la seconde utilise des polymères déjà formés. La méthode préférée est souvent celle utilisant des polymères préformés, car elle évite les défis associés à la polymérisation in situ, tels que les interactions potentielles avec les impuretés pendant la préparation des nanoparticules, la gestion de la cinétique de polymérisation, ainsi que l'élimination des monomères résiduels et des réactifs. De plus, les polymères préformés offrent des propriétés physico-chimiques bien définies.

Les méthodes courantes incluent la précipitation ou la gélification d'un polymère déjà dissous dans un solvant pour former des nanoparticules solides [26].

I.3.2.1 Émulsion-évaporation du solvant

La technique de l'émulsion-évaporation du solvant repose sur la préparation d'une phase organique non miscible à l'eau, composée de polymère, d'un principe actif, et d'un solvant organique volatil comme le chloroforme ou le dichlorométhane [27].

Cette phase organique est ensuite dispersée dans une phase aqueuse contenant un agent stabilisant, ce qui permet de former une émulsion fine et stable grâce à un cisaillement intense ou à une ultrasonication [28]. L'élimination du solvant organique s'effectue soit par élévation de la température, sous vide, par une combinaison des deux méthodes, ou simplement par agitation à température ambiante. Ce processus aboutit à la formation de nanoparticules. Cette méthode est spécifiquement adaptée pour l'encapsulation des principes actifs lipophiles [29].

I.3.2.2 Émulsion-diffusion du solvant

La méthode de l'émulsion-diffusion du solvant utilise un solvant organique partiellement miscible avec l'eau, comme l'alcool benzylique, le carbonate de propylène ou le lactate de butyle [30]. Avant d'ajouter le polymère, il est nécessaire que le solvant organique et l'eau soient saturés mutuellement. La phase organique, contenant le polymère et l'agent actif, est ensuite émulsifiée dans une phase aqueuse qui contient un stabilisant (tel que le Pluronic F-68 ou l'alcool polyvinylique (PVA)), sous une forte agitation mécanique. La dilution de cette émulsion entraîne la diffusion du solvant vers la phase aqueuse externe, ce qui provoque la précipitation du polymère et la formation de nanoparticules (NPs) [31]. On peut également créer des nanocapsules à cœur lipidique en ajoutant une huile à la phase organique. Enfin, le solvant organique peut être éliminé par filtration ou évaporation [32].

I.3.2.3 La nanoprécipitation

La nanoprécipitation, également connue sous le nom de « déplacement de solvant », repose sur trois composants principaux : le polymère, son solvant, et un non-solvant. Le solvant doit être miscible au non-solvant en toutes proportions et doit pouvoir s'évaporer facilement, comme l'acétone ou l'éthanol. Cependant, le polymère et l'agent actif (PA) doivent être insolubles dans le non-solvant. La solution organique du polymère contenant le PA est injectée à débit contrôlé dans la solution de non-solvant, qui peut contenir un surfactant hydrophile. La diffusion spontanée du solvant dans la phase aqueuse provoque la précipitation du polymère, insoluble dans le mélange solvant/non-solvant, sous forme de nanoparticules encapsulant le PA. Pour obtenir des nanocapsules, une huile est ajoutée à la phase organique, permettant au polymère de former une coque, à condition que l'huile soit insoluble dans la phase aqueuse [33].

I.3.2.4 Émulsion-salting out

L'émulsion-salting out est une méthode similaire à l'émulsion-diffusion de solvant, mais elle se distingue par le choix du solvant organique utilisé pour préparer la phase organique. Cette technique consiste à préparer une phase aqueuse en dissolvant une grande quantité de sels (plusieurs moles par litre) dans l'eau, les sels couramment utilisés étant le chlorure de magnésium et le chlorure de calcium. La phase organique, composée de polymère et de principe actif dissous dans un solvant organique entièrement miscible à l'eau, tel que l'acétone, est ensuite introduite dans la phase aqueuse. La saturation en sel de cette phase aqueuse permet de former une émulsion sous une agitation mécanique intense. L'émulsion est ensuite diluée avec une grande quantité d'eau, ce qui rétablit la miscibilité entre l'acétone et l'eau. L'acétone diffuse alors dans la phase aqueuse externe, provoquant la précipitation du polymère sous forme de nanoparticules. Enfin, le solvant et le sel sont éliminés par filtration ou par des cycles de centrifugation et de lavages [34].

I.3.2.5 La gélation ionique

La gélation ionique Parmi les rares méthodes n'utilisant pas de solvant organique, la gélation ionique permet la synthèse de nanoparticules dans un milieu entièrement aqueux. Les nanogels ioniques se forment à partir d'une solution aqueuse de polysaccharides chargés qui se gélifient en présence d'ions de charge opposée. Pour obtenir des nanoparticules, la gélation doit être réalisée à des concentrations diluées pour éviter la formation de gels macroscopiques. Cela correspond à une phase de pré-gel où les chaînes

polymères interagissent avec l'agent gélifiant via des interactions électrostatiques, formant ainsi des agrégats nanométriques.

Le procédé consiste à extruder une solution aqueuse de polymère à travers une aiguille de seringue dans une solution contenant des ions de charge opposée, sous une homogénéisation à haute vitesse. Les gouttelettes formées se transforment en nanogels après interaction ionique. La formation des particules est spontanée et instantanée. La gélation ionique est une technique simple, économique et facile à mettre en œuvre. Elle permet d'obtenir des nanoparticules de taille bien définie et de distribution homogène, avec une grande quantité de principe actif (PA) incorporée.

Les polymères les plus couramment utilisés pour cette technique sont l'alginate de sodium et le chitosane.

La principale propriété de ces deux polymères est leur capacité à se gélifier en présence d'ions multivalents, ce qui conduit à la création de liaisons ioniques et à la formation de réseaux tridimensionnels rigides emprisonnant le PA [35].

I.3.3 Nanoparticules de chitosane

Le chitosane (CS) est un polysaccharide biodégradable dérivé de la chitine. La chitine, un copolymère de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et de N-D-glucosamine (GlcN) liés par des liaisons β -(1→4), provient des exosquelettes de crustacés, de certaines familles de champignons et d'insectes. Il s'agit du deuxième polymère naturel le plus abondant sur Terre après la cellulose. Contrairement à la chitine, le chitosane est rarement trouvé à l'état naturel, présent uniquement chez les zygomycètes, quelques insectes et une classe spécifique de champignons [36]. Néanmoins, la chitine reste la principale source de chitosane [36].

Le chitosane, un biopolymère de structure linéaire semblable à celle de la chitine, est obtenu par désacétylation alcaline de la chitine (Figure I.4) ou par hydrolyse enzymatique (chitine désacétylase) [37].

Il se caractérise par une prédominance d'unités D-glucosamine (unités désacétylées) avec des fractions molaires de N-acétyl-D-glucosamine (unités acétylées), ce qui lui confère un caractère cationique et une hydrophilie relative par rapport à la chitine. Le chitosane possède un pKa de 6,5 et est soluble dans des solutions d'acides dilués (acide acétique, acide formique et acide lactique), où les groupes amine se protonent pour former un polyélectrolyte cationique [38].

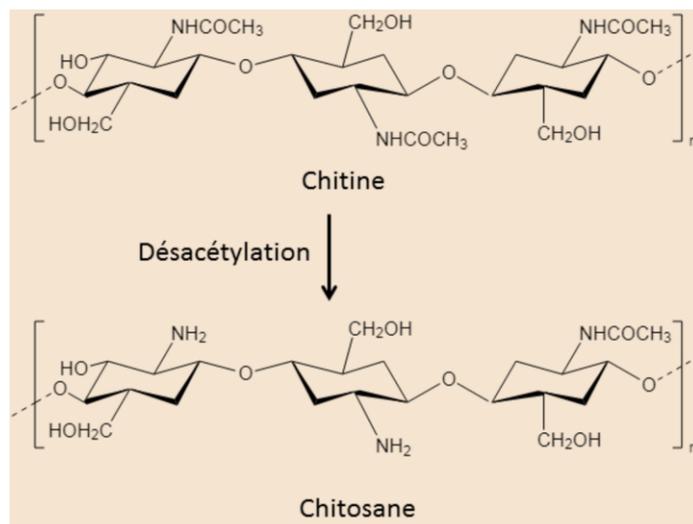


Figure I.4: Structure chimique de chitine et chitosane[39].

Les nanoparticules de chitosane peuvent être produites par diverses méthodes, mais la plus courante est la gélation ionique. Ce processus implique l'interaction des groupes NH^{3+} du chitosane (la forme protonée de la glucosamine à un pH entre 4,0 et 6,5) avec des ions polyvalents tels que le sulfate, le citrate, ou des molécules anioniques contenant des groupes phosphate comme le polyphosphate, le β -glycerophosphate et le tripolyphosphate de sodium (TPP) [40].

Le TPP est largement utilisé comme agent de réticulation ionique pour former des nanoparticules à base de chitosane. Il est un sel non toxique produit par la triple condensation des groupes $-\text{PO}_4$ [40].

Après l'addition d'une solution de TPP à une solution de chitosane, la formation des nanoparticules de chitosane est instantanée.

Les nanoparticules de chitosane réticulées avec du TPP offrent l'avantage d'être stables et non toxiques [40].

I.4. Avantage de l'encapsulation des huiles essentielles par les nanoparticules de chitosane

- **Augmentation de la stabilité**

Le principal avantage de l'encapsulation des huiles essentielles dans des nanoparticules de chitosane est d'augmenter leur stabilité. Cela se traduit par une protection efficace contre l'oxydation, la dégradation causée par la lumière et la chaleur [41].

- **Réduction de la volatilisation**

Cette réduction de la volatilisation présente plusieurs avantages pratiques. Elle prolonge la durée de conservation des huiles essentielles encapsulées, assurant ainsi leur efficacité et leurs propriétés thérapeutiques à long terme. De plus, cela facilite leur manipulation et leur utilisation dans divers produits comme les cosmétiques, les parfums, les produits pharmaceutiques et même les produits alimentaires. En minimisant la perte de composés volatils, l'encapsulation contribue également à améliorer la stabilité des formulations, offrant ainsi une meilleure expérience utilisateur et des résultats cohérents dans différentes applications industrielles et commerciales [42].

- **Libération Contrôlée**

La technique d'encapsulation des huiles essentielles par les nanoparticules de chitosane permet une libération contrôlée des principes actifs. Cette méthode assure une diffusion progressive des huiles essentielles dans le temps et l'espace, prolongeant ainsi leur efficacité. En minimisant la dégradation prématurée et en évitant une libération rapide, elle contribue à améliorer la stabilité et l'efficacité des formulations cosmétiques et pharmaceutiques. Cette approche offre également des avantages en termes de réduction des effets secondaires potentiels et de meilleure tolérance cutanée, ouvrant ainsi de nouvelles possibilités pour des produits plus sûrs et plus efficaces [43].

- **Protection contre la dégradation chimique**

L'encapsulation des huiles essentielles par les nanoparticules de chitosane est une méthode efficace pour protéger ces composés contre la dégradation chimique. Les nanoparticules agissent comme une barrière physique qui prévient l'oxydation des huiles essentielles en limitant leur exposition à l'oxygène et à l'humidité. Elles contribuent également à stabiliser thermiquement les huiles essentielles, préservant ainsi leur intégrité chimique face aux variations de température. En résumé, cette technique offre une conservation prolongée et une meilleure stabilité des huiles essentielles, ce qui est crucial pour leur utilisation efficace dans divers produits cosmétiques et médicaux [44].

- **Amélioration de la solubilité**

L'encapsulation des huiles essentielles dans des nanoparticules de chitosane améliore leur solubilité dans l'eau et les protège contre la dégradation. Le chitosane, un polymère naturel, est utilisé pour former des nanoparticules qui permettent une dispersion efficace des huiles essentielles dans des formulations aqueuses comme les cosmétiques et les produits pharmaceutiques [45].

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II.1 Matériel végétal

Ce travail a été réalisé à partir des rhizomes de *Zingiber officinale* (gingembre), achetés auprès d'un herboriste à Boufarik. Sa taxonomie a été décrite en détail précédemment.

II.1.1 Protocole expérimental d'extraction des huiles essentielles

L'extraction de l'huile essentielle des rhizomes a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (**Figure II.1**). Cet appareil comprend un ballon à fond rond avec un col rodé, placé dans un chauffe-ballon, et un dispositif de condensation équipé d'un réfrigérant permettant la décantation de l'huile essentielle, avec un robinet pour recueillir le distillat.



Figure II.1.Dispositif d'extraction Clevenger

Dans un ballon, on immerge 241 g de matière végétale (gingembre sec) dans 1000 ml d'eau distillée. Le tout est ensuite porté à ébullition pendant environ 3 heures. Le distillat obtenu se compose d'huile essentielle et d'eau. Après une décantation, deux phases distinctes apparaissent : une phase organique, correspondant à l'huile essentielle, et une phase aqueuse. L'huile essentielle est prélevée à l'aide d'une seringue stérile, puis pesée pour en déterminer le rendement. Elle est ensuite conservée à une température de 4°C dans un flacon en verre brun hermétiquement scellé.

- Effectuer deux extractions supplémentaires en appliquant le même procédé ci-dessus, avec des quantités différentes de gingembre : 127,27 g pour la première extraction et 238,07 g pour la deuxième.
- Peser l'huile essentielle recueillie pour déterminer le rendement.

Remarque :

- Utiliser du matériel propre et stérile pour éviter toute contamination.
- Contrôler attentivement les températures et les durées de distillation pour optimiser les résultats d'extraction.
- Le stockage dans un flacon en verre brun et à basse température permet de préserver la qualité de l'huile essentielle.

II.1.2 Rendement d'extraction des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle (**Rdt (%)**), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (**M(HE)**) et la masse de la matière végétale utilisée (**M(MV)**).

Il est donné par la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = (M(HE)/M(MV) \times 100)$$

Rdt (%) : Rendement en huile essentielle (en g) pour 100g de matière sèche.

M(HE) : Masse de l'huile essentielle obtenue (g).

M(MV) : Masse de matière sèche utilisée en (g).

II.2 Encapsulation de l'Huile Essentielle de Gingembre sous Forme de Nanoparticules

Dans ce processus, l'huile essentielle est encapsulée dans des structures extrêmement petites, appelées nanoparticules.

➤ Matériel

- Spatule
- Verre de montre
- Plaque agitatrice
- Barreau aimanté
- Erlenmeyer à bouchon ou bécher de 200 ml
- Entonnoir
- Erlenmeyer
- Papier filtre
- Pipette
- Éprouvettes de 5 ml et 100 ml
- Fioles de 100 ml et 10 ml
- Pissette

➤ Mode Opérateur

1. Préparation du Matériel : Laver toute la verrerie avec de l'acétone pour garantir une propreté optimale.
2. Préparation de la Solution de Chitosane
 - Peser 1,1g de chitosane.
 - Dans un autre récipient, préparer une solution d'acide acétique en mélangeant 1,2 ml d'acide acétique avec 100 ml d'eau distillée.
 - Dissoudre le chitosane dans 110 ml de la solution d'acide acétique obtenue .
 - Filtration : Après la préparation de la solution de chitosane, procéder à une filtration pour éliminer les éventuelles impuretés.
3. Préparation de la Solution Mère de TPP (Tri polyphosphate de Potassium)
 - Peser précisément 1 g de TPP.
 - Dans un bécher ou un erlenmeyer de 50 ml, ajouter le TPP à de l'eau distillée et mélanger à l'aide d'un agitateur jusqu'à dissolution complète.
 - Transférer le mélange dans une fiole de 100 ml, puis compléter avec de l'eau jusqu'au trait de jauge.

- Préparation des Solutions Filles à partir de la Solution Mère de TPP
Pour obtenir la concentration désirée, utiliser la formule de dilution suivante

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Où :

C1 est la concentration de la solution mère.

V1 est le volume de la solution mère à utiliser.

C2 est la concentration désirée pour la solution fille.

V2 est le volume final souhaité pour la solution fille.

- Application au Chitosane : Appliquer la même méthode de dilution pour préparer les solutions de chitosane en utilisant la concentration et le volume souhaités.



Solution (Acide acétique+eau)Chitosane

Agitation



Filtration CS

Solution fille de CS

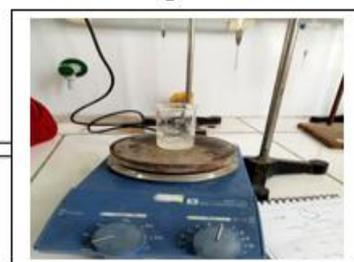


Figure II.2. Préparation de la Solution de Chitosane

II.2.1 Réaction du TPP avec le Chitosane

Lors du mélange du TPP (tri polyphosphate de potassium) avec le chitosane, une réaction chimique peut se produire, entraînant la formation d'un précipité. Les résultats de cette réaction sont présentés dans le tableau suivant.

➤ Procédure

- Remplir une éprouvette de la solution de TPP à différente concentration.
- Ajouter ensuite 3ml de la solution de TPP sur 5ml de la solution de chitosane à différente concentration (**voir Figure II.3**).
- Agiter vigoureusement pour assurer une bonne dissolution du chitosane.

➤ Observations

Une fois la neutralisation terminée, les observations sont consignées dans le tableau II.1.

Tableau II.1. Résultats de neutralisation du TPP avec le Chitosane

	TPP				
		0,01	0,05	0,5	1
chitosane	0,01	Claire	Claire	NP 1/3	NP 1/3
	0,05	Claire	Claire	NP 1/3	NP 1/3
	0,5	Claire	Claire	NP 3/3	Agrégat
	1	Claire	Claire	Trace de NP	Agrégat



Pesé
TPP



Solution mère
de TPP



Solutions
filles de TPP

Figure II.3. Préparation de la Solution de TPP + CS



Figure II.4.Mélange TPP avec chitosane



Figure II.5.Résultats de la neutralisation de chitosane +TPP

II.2. 3. Encapsulation de l'huile essentielle de gingembre

1. Préparation des Ingrédients

- 5 ml de chitosane : dissous préalablement dans une solution dans l'acide acétique.
- 3 ml de TPP : Solution mère préparée antérieurement.
- 0,5 ml d'huile essentielle de gingembre

2. Préparation du Mélange

- Dans un bécher, verser 5 ml de solution de chitosane (CS) et ajouter 0,5 ml d'huile essentielle (HE).
- Agiter le mélange pour assurer une bonne incorporation de l'huile essentielle.
- Verser le TPP, dans le bécher contenant le mélange chitosane/huile essentielle.

- Agiter vigoureusement le mélange pour garantir une bonne dispersion de l'huile essentielle dans la solution de chitosane et de TPP.
- Utiliser un agitateur magnétique pour obtenir une émulsion homogène.

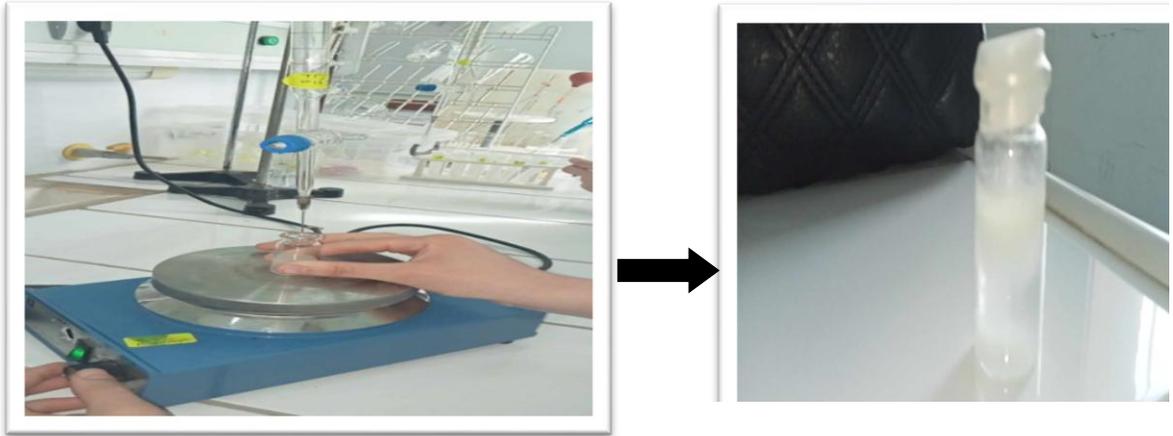


Figure II.6. Encapsulation de l'HE de Zingiber officinale

➤ **Séparation des nanoparticules par centrifugation**

- Transférez le mélange contenant les nanoparticules dans des tubes de centrifugation. Effectuez la centrifugation à une vitesse de 50 tours par minute pendant 30 minutes pour séparer les nanoparticules du liquide.



Figure II.7. Séparation des nanoparticules par centrifugeuse

- Récupérez les nanoparticules et déposez-les de manière dispersée sur des lamelles. Utilisez une pipette propre pour étaler uniformément les nanoparticules sur la surface de la lamelle, puis laissez les lamelles sécher à l'air libre. Les nanoparticules peuvent ensuite être analysées.



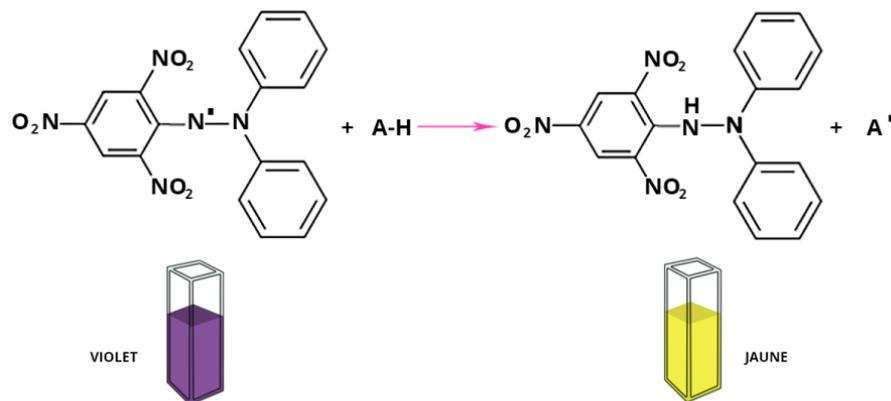
Figure II.8. Les nanoparticules et les dépôts sont étalés

II.3 Évaluation du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle du gingembre

Le test du DPPH (1,1-Diphényl Picrylhydrazyl) est une méthode couramment utilisée pour évaluer le pouvoir antioxydant des substances.

II.3.1 Principe

La réduction du radical libre DPPH• par un antioxydant peut être évaluée en utilisant la spectrophotométrie UV-visible, en observant la diminution de l'absorbance à 517 nm. Initialement de couleur violette, le DPPH se décolore lorsque son électron libre se stabilise. Cette décoloration reflète la capacité des composés phénoliques à neutraliser les radicaux libres, indépendamment de toute activité enzymatique [46]. L'intensité de la décoloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à céder des protons [47].



DPPH (violet)

DPPH (jaune)

II.3.2 Procédure expérimentale pour évaluer l'activité anti-radicalaire d'une huile essentielle

➤ Matériel et produits utilisés

Le matériel et produits employés pour l'évaluation de l'activité antioxydante dans cette étude sont résumés dans le Tableau.

Tableau II.2. Matériel et produits utilisés dans l'étude de l'activité antioxydants

Appareillages	Verreries et Autres	Matériel végétal	Produit et solvant
Spectrophotomètre UV-visible	Erlen-Mayer 250 ml	L'huile essentielle	DPPH(2,2 Diphényl1-picrylhydrazyl)
Agitateur magnétique	Becher 100 ml		Ethanol
Micropipette 10-100 ul, 100-1000 ul	Tubes à hémolyse		Acide ascorbique
Spatule			Eau distillée

➤ Procédure

- Mélangez 50 µl de l'huile essentielle à différentes concentrations avec 1950 µl de solution de DPPH.
- Incubez le mélange à l'obscurité, à température ambiante, pendant 30 minutes.
- Mesurez l'absorbance à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.
- Préparez un contrôle négatif en mélangeant 50 µl d'éthanol avec 1950 µl de solution de DPPH.
- Préparez un contrôle positif en utilisant une solution d'acide ascorbique à une concentration connue. Mesurez son absorbance dans les mêmes conditions que les échantillons.
- Répétez chaque essai en triplicat pour assurer la précision des résultats.
- Calculez le pourcentage d'inhibition (I%) en utilisant la formule suivante

$$I\% = \frac{(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}})}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

Où :

A_{blanc} : absorbance de la solution de DPPH en l'absence de l'extrait ou de l'huile essentielle.

A_{échantillon}: absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait ou de l'huile essentielle.

II.3.3 Détermination de la concentration inhibitrice CI

La concentration inhibitrice à 50% (CI50) est la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire de 50% la concentration initiale de DPPH. Les CI50 sont déterminées graphiquement par régression linéaire ou logarithmique des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations des composés testés [48].

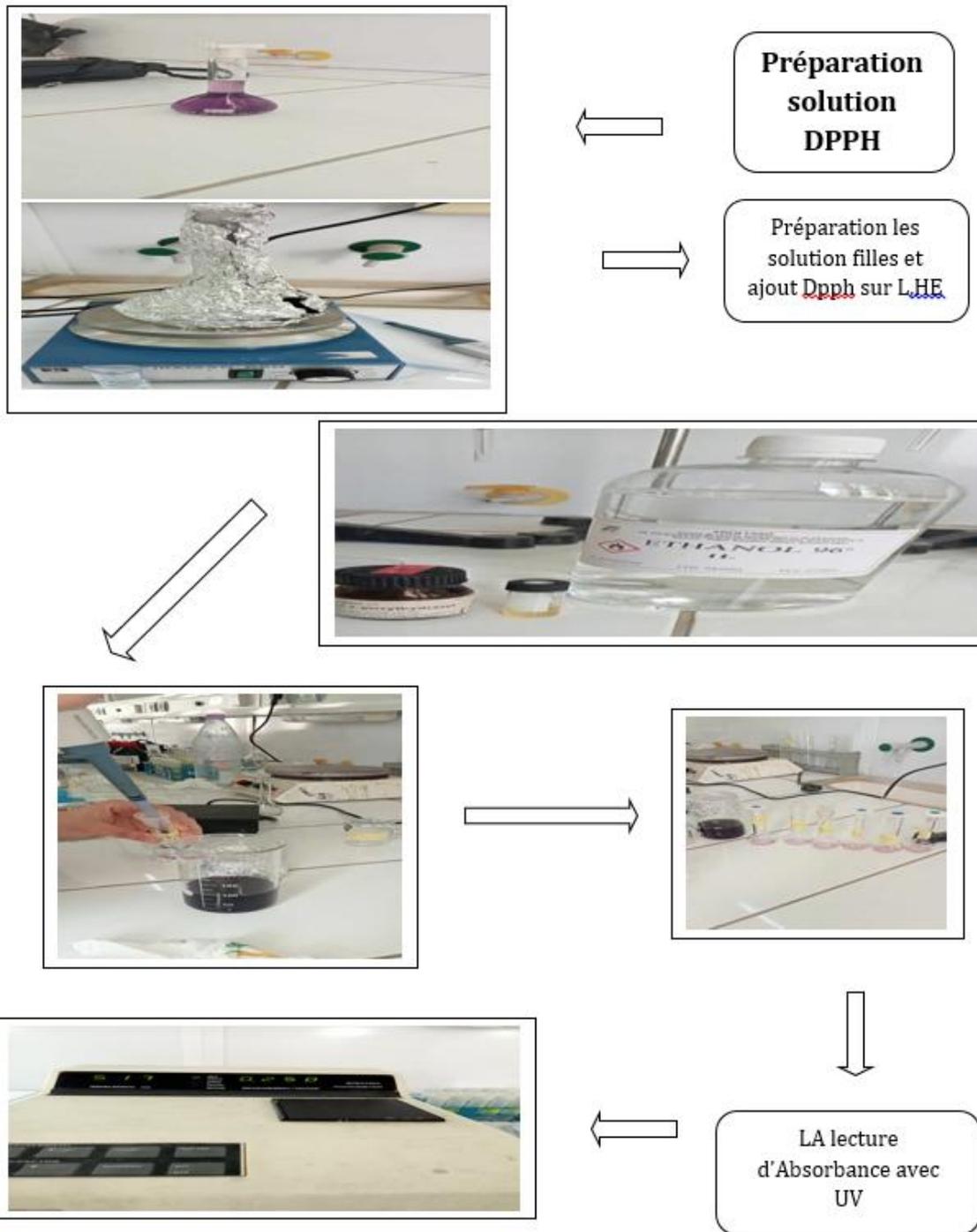


Figure II.9. Protocole expérimental du dosage de l'activité antioxydante

II.3.4 Évaluation de l'activité antioxydante d'une substance en mesurant sa capacité à neutraliser les radicaux libres

Nous allons préparer des solutions diluées à partir de la solution mère de DPPH à différents volumes : 10, 30, 40, 70, 150, et 200 microlitres. Ces volumes seront complétés par de l'éthanol jusqu'à un volume total de 1500 microlitres, puis nous ajouterons 1500 microlitres de solution de DPPH à chaque préparation.

➤ Préparation des solutions diluées

- Pour chaque volume cible (10, 30, 40, 70, 150, 200 µl) de la solution mère de DPPH: Complétez le volume total à 1500 µl avec de l'éthanol.

➤ Calcul des volumes d'éthanol nécessaires

- Pour chaque volume cible de la solution mère de DPPH : Soustrayez le volume de la solution mère de 1500 µl pour obtenir le volume d'éthanol nécessaire.
- Exemple : Pour 10 µl de la solution mère de DPPH, le volume d'éthanol nécessaire est $1500 - 10 = 1490$ µl.

➤ Préparation des solutions diluées

- Prélevez le volume approprié de la solution mère de DPPH et placez-le dans un tube à essai.
- Complétez le volume à 1500 µl en ajoutant la quantité d'éthanol calculée.
- Mélangez bien chaque solution pour obtenir une homogénéité.

➤ Ajout de la solution de DPPH

- Ajoutez 1500 µl de la solution de DPPH à chaque solution diluée préparée.

➤ Calcul des concentrations finales

- Utilisez la formule suivante pour déterminer les concentrations finales des solutions diluées après l'ajout d'éthanol

$$C_f = \frac{C_i \times V_i}{V_f}$$

Où :

C_f est la concentration finale recherchée,

C_i est la concentration initiale de la solution mère de DPPH (30 000 µg/ml, puisque vous avez 4 mg dans 100 ml d'éthanol).

Vi est le volume de la solution mère de DPPH utilisé pour préparer la solution diluée,

Vf est le volume total de la solution diluée après ajout d'éthanol (1500 µl).

- Répétez ce calcul pour chaque volume de solution mère utilisé pour obtenir les concentrations finales correspondantes.
- Une fois que vous avez calculé toutes les concentrations finales, vous pourrez ajouter la solution de DPPH comme prévu.

II.4 Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de gingembre

II.4.1 Matériel, produits et milieux de culture

Pour la culture des bactéries, les milieux suivants ont été utilisés :

- Gélose Mueller Hinton (MH)
- Gélose nutritive (GN)

Tableau II. 3. Matériel, produits et milieux de culture utilisés dans l'étude de l'activité antibactérienne.

Matériels	Milieu de culture	Solution préparées	Verreries consommable
Autoclave	Milieu gélosé Muller Hinton (MH)	Eau physiologique stérile	Tube a essai stériles
Etuvememmert	Milieu gélosé sabouraud	Eau distillée stérile	Portoir pour tube a essai
Balance Agitateur magnétique	Gélose nutritive	Eau javel	Ecouvillon stériles
Micropipette 500ul Anse de platine			Disque sterilles
Bec benzène			Boite de pétris
Perforateur de trou rond à trou un			Cône pour micropipette stériles
Pince fine stérile			Papier aluminium

II.4.2 Méthodologie

Les souches bactériennes sélectionnées pour cette étude sont des souches de référence ATCC, choisies pour leur homogénéité et leur origine des souches de laboratoire. Le choix des souches à tester s'est basé sur leur caractère pathogénique, les études antérieures, et leur disponibilité au laboratoire. Les souches étudiées sont présentées dans le tableau II.4.

Tableau II.4. Matériaux et produits utilisés dans l'étude de l'activité : Souches bactériennes utilisées dans l'étude.

	Classification	Souche	Référence
Souche bactérienne	Gram positive	Bacillus	ATCC6633
	Gram positive	Staphylococcus aureuse	
	Gram négative	Escherichia coli	

Pour l'évaluation des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de gingembre, nous avons utilisé la méthode de diffusion sur disque. Cette méthode, similaire à celle de l'antibiogramme, repose sur la diffusion de produits antimicrobiens dans un milieu gélosé spécifique (MH) pour déterminer la sensibilité des souches bactériennes. Elle permet de détecter la présence d'une substance inhibitrice par l'apparition d'une zone d'inhibition translucide autour du disque contenant le composé antimicrobien. La procédure suivie est décrite ci-dessous :

➤ Repiquage des souches bactériennes

- Les souches bactériennes ont été repiquées en utilisant la méthode des stries pour obtenir des colonies isolées.
- Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures pour permettre le développement des colonies jeunes.
- Les colonies isolées ont été utilisées pour préparer l'inoculum.

➤ Préparation des boîtes de Pétri

- Les boîtes de Pétri ont été préparées à partir du milieu de culture Mueller Hinton (MH), autoclave au laboratoire de microbiologie.
- La gélose a été versée dans des boîtes de Pétri stériles et laissée à se solidifier à température ambiante, près d'une zone stérile, pendant 15 à 20 minutes (voir Figure 24).

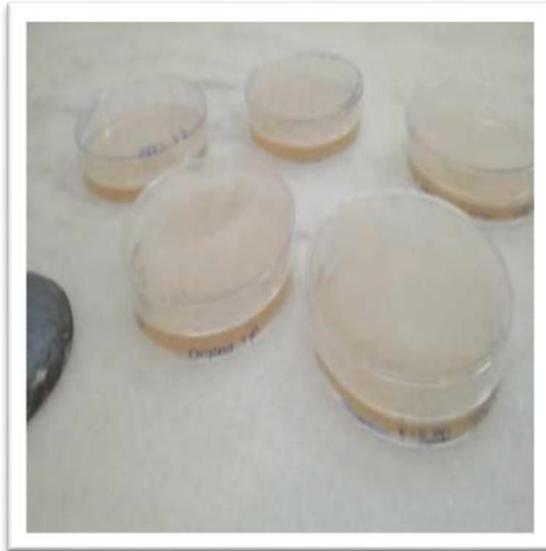


Figure II.10. Écoulement de milieu de culture (MH)

➤ **Préparation d'une suspension bactérienne**

Après 24 heures d'incubation à 37°C, trois à quatre colonies bien isolées sont prélevées et émulsionnées dans 1 ml d'eau physiologique stérile. La suspension bactérienne est ensuite diluée pour standardiser la concentration finale des bactéries.



Figure II.11. Suspension bactérienne

➤ **Ensemencement**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à partir de la suspension bactérienne fraîchement préparée. Pour ce faire, un écouvillon en coton stérile est trempé dans la suspension, puis essoré dans le tube. L'écouvillon est ensuite utilisé pour frotter la surface

gélifiée de la boîte de Pétri en formant des stries serrées. L'écouvillon est passé sur toute la surface de la gélose à trois reprises, en tournant la boîte d'environ 60° après chaque application, afin d'assurer une distribution uniforme de l'inoculum. Pour chaque souche testée, une boîte de Pétri est ensemencée avec un écouvillon distinct, rechargé pour chaque application.



Figure II.12. Ensemencement des souches bactériennes

➤ **Déposition des disques**

Des disques de papier filtrent de 6 mm de diamètre, préalablement stérilisés, sont placés sur la surface de la gélose ensemencée après avoir été imprégnés de 400 µl d'huile essentielle pure. Des disques témoins, sans extrait, sont également utilisés pour servir de contrôle. Trois disques imprégnés de l'huile essentielle à la même concentration sont placés dans chaque boîte de Pétri. Les disques sont trempés dans les différentes dilutions de l'huile essentielle de gingembre préparées, puis déposés sur les boîtes de Pétri.

Préparation des dilutions :

- Solution à 100% : Utiliser 400 µl d'huile essentielle pure (100%).
- Solution à 50% : Mélanger 100 µl d'huile essentielle avec 100 µl de DMSO (diméthylesulfoxyde).
- Solution à 25% : Mélanger 50 µl d'huile essentielle avec 50 µl de DMSO pour obtenir 100 µl de solution à 25%.

Les disques sont trempés dans les différentes solutions d'huile essentielle et disposés sur les boîtes de Pétri contenant les souches bactériennes. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.



Figure II.13. Déposition des disques

➤ **Application de l'huile essentielle de *Z. officinale***

Après avoir déposé les disques imprégnés de l'huile essentielle, celle-ci est appliquée sur les disques. Les boîtes de Pétri sont ensuite placées à proximité du bec Bunsen pendant quelques secondes pour favoriser une diffusion uniforme de l'huile dans le milieu gélosé.

Les boîtes sont ensuite incubées à 30°C et 37°C pendant 24 heures.

Figure 21 : Effet de l'huile essentielle de gingembre sur *S. aureus* avec des concentrations de 100%, 50%, 25%, et effet des nanoparticules d'huile de gingembre sur *S. aureus*.

➤ **Lecture**

À la fin de la période d'incubation, les activités biologiques (antibactériennes, antifongiques) sont évaluées en mesurant précisément les diamètres des zones d'inhibition autour de chaque disque. La mesure est effectuée à l'aide d'un pied à coulisse, sur un fond sombre, sans retirer le couvercle des boîtes. Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. Un extrait est considéré comme actif si la zone d'inhibition autour de chaque disque mesure plus de 8 mm de diamètre. Les bactéries sont classées selon le diamètre de l'inhibition dans l'une des catégories suivantes : non sensible, sensible, très sensible, extrêmement sensible, conformément au [49].

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III Étude phytochimique

III.1 Détermination du rendement d'extraction de l'huile essentielle de gingembre par hydrodistillation

L'extraction des huiles essentielles de *Zingiber officinale* a été réalisée par hydrodistillation, une méthode couramment utilisée pour extraire les composés volatils des plantes. La durée d'extraction représente le temps nécessaire à la récupération complète de l'huile contenue dans la matière végétale.

La teneur totale en huile essentielle de *Z. officinale* obtenue est relativement faible, avec un rendement de 0,45 %. L'huile se caractérise par une couleur allant du jaune au brun, typique des huiles essentielles extraites de cette plante. Le rendement d'extraction, exprimé en grammes d'huile par rapport à la masse de matière végétale sèche, est présenté dans le Tableau III.1.

Tableau III.1. Rendement d'extraction d'HE

La matière végétale (g)	Masse totale	PoidsHE(g)	Le rendement (%)
1^{ière} extraction (127,27g)	365 ,34	1,65 g	0,45%
2^{ème} extraction (238,07g)			

III.2 Activités biologiques

II.2.1 Activité antioxydante

L'évaluation du pouvoir antiradicalaire des huiles essentielles (HE) de *Zingiber officinale* a été réalisée à l'aide du test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Les activités antiradicalaires ont été comparées à celles du témoin positif, l'acide ascorbique (vitamine C), en utilisant la méthode DPPH.

Un changement de couleur, allant du violet au jaune, a été observé pour tous les tubes à mesure que la concentration augmentait, indiquant que le DPPH est réduit en présence de substances réductrices présentes dans les HE de *Z. officinale* (Figure III.1). Ce changement de couleur reflète la capacité antioxydante des composés testés.

Les mesures ont été effectuées à une longueur d'onde de 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. L'analyse de l'activité antioxydante a été réalisée en comparant les résultats obtenus pour l'huile essentielle et pour l'acide ascorbique, en se basant sur les valeurs d'IC50. Une courbe dose-réponse a été construite, avec les concentrations des différents échantillons en abscisse et les pourcentages d'inhibition en ordonnée.

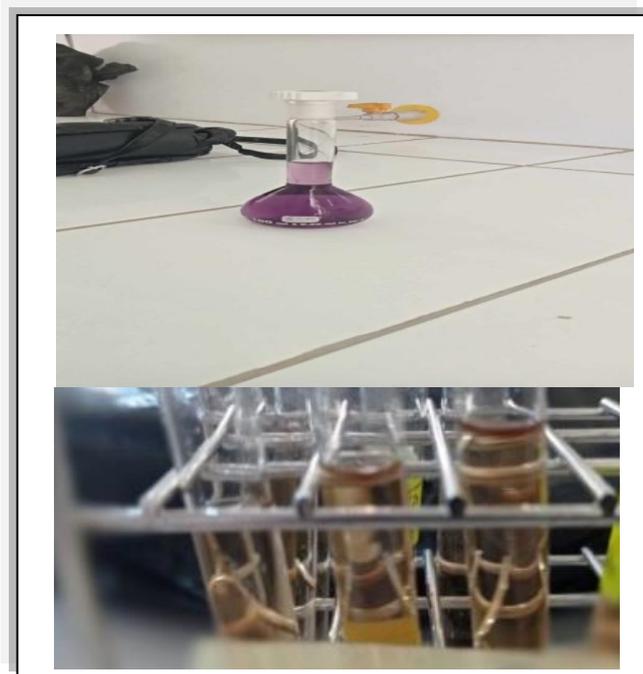


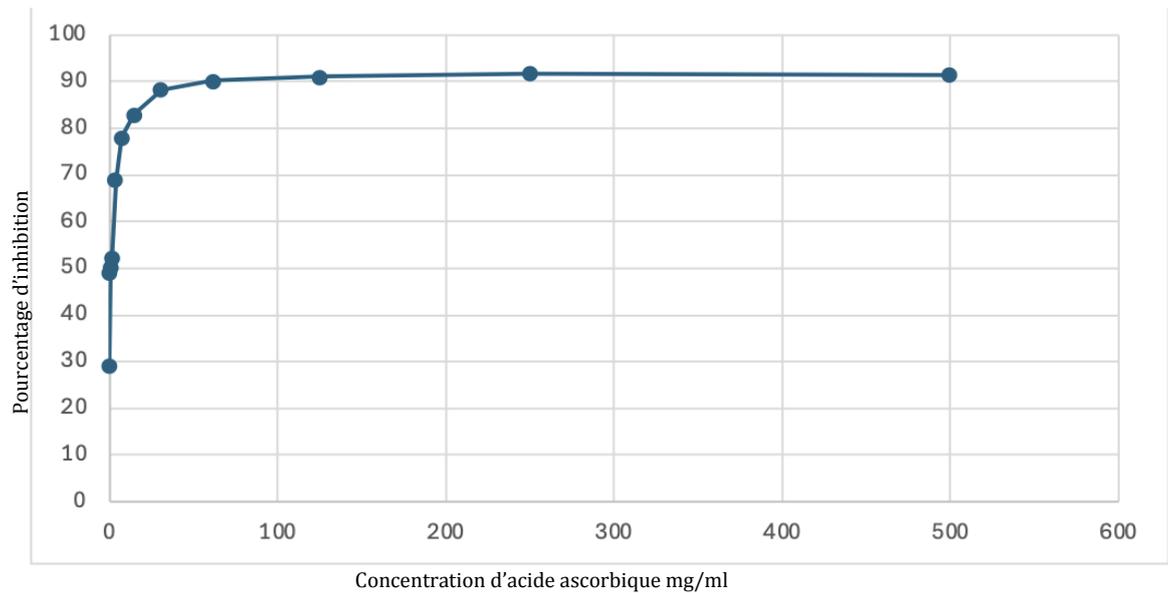
Figure III.1.Activité anti radicalaire (DPPH)

Tableau III.2. Résultats de l'absorbance et l'inhibition de l'acide ascorbique

	Tube	Absorbance	Pourcentage d'inhibition
Acide ascorbique	T1	0,403	29,29
	T2	0 ,29	49,12
	T3	0,284	50,17
	T4	0,272	52,28
	T5	0,174	69
	T6	0,122	78
	T7	0,099	82,93
	T8	0,068	88,27
	T9	0,057	90 ,17
	T10	0,052	91,03
	T11	0,048	91,76
	T12	0 ,047	91,45

TableauIII.3. Résultats de l'absorbance et l'inhibition de l'huile essentielle de *Z. officinale*

Tube	Absorbance	Pourcentage d'inhibition
T1	0,174	69 ,47
T2	0,198	65,26
T3	0,220	61,4
T4	0,243	57,36
T5	0,245	57,01
T6	0,250	56,14
T7	0,285	50,87



FigureIII.2. Pourcentage d'inhibition de l'acide ascorbique en fonction de la concentration d'acide ascorbique

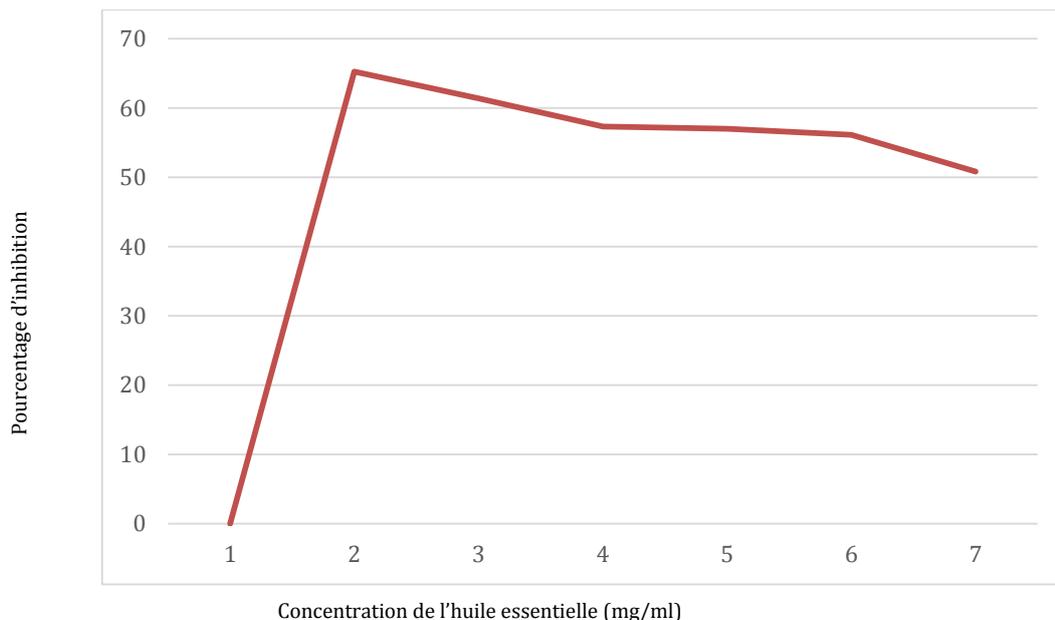


Figure III.3. Pourcentage d'inhibition de l'HE *Z. officinale* en fonction de la concentration de l'huile essentielle.

L'IC50, correspondant à la concentration nécessaire pour réduire de 50 % l'activité du DPPH, a été calculé pour chaque échantillon à partir de la courbe obtenue avec le logiciel Excel (Figure III.2 et Figure III.3). Les résultats montrent que l'IC50 de l'huile essentielle de *Z. officinale* (0,21 mg/mL) est inférieur à celui de l'acide ascorbique (0,4 mg/mL), indiquant une activité antioxydante plus prononcée de l'huile essentielle par rapport à l'acide ascorbique. Ces observations suggèrent que l'huile essentielle de gingembre présente une capacité antioxydante notable, nécessitant une concentration plus faible pour atteindre une inhibition de 50 % de l'activité du DPPH.

En conclusion, l'huile essentielle de *Z. officinale* possède une activité antioxydante significative, comme en témoigne son IC50 inférieur. Ces résultats mettent en lumière son potentiel en tant qu'antioxydant naturel.

III. 3L'activité antibiotique

III. 3.1 L'activité antibactérienne

Après une incubation de 24h à 37°C, les boîtes de Pétri ont été récupérées pour mesurer les diamètres des zones d'inhibition des huiles essentielles (HE) sur les cinq souches bactériennes testées. De plus, après une incubation de 48 à 72 heures à 25°C, les boîtes ont également été analysées pour mesurer les diamètres d'inhibition. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau III.4.

Tableau.III.4.Résultats de l'antibiogramme d'HE *Z. officinale*

HE dilué		E ₁ HE pur 100%		E ₂ 50%		E ₃ 25%		Témoin (+)		Témoin (-)		HE encap		Chatoyante	
		D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S
MH	<i>Escherichia coli</i>	15 mm	+ +	10 mm	+ +	5m m	-	20mm	+ +	10m m	+ +	/	-	/	-
	<i>Bacilles subtilisa</i>	10mm	+ /	/	- /	/	-	20mm	+ +	10m m	+ +	/	-	15 m m	++
	Staphylococcus	15mm	+ +	10 mm	+ /	/	-	20mm	+ +	10m m	+ +	/	-	/	-

DMSO : Contrôle négatif ; **C** : concentration ; **D** : diamètre de la zone d'inhibition ; **S**: Sensibilité ; - : Résistante ; + : Sensible ; ++ : Très Sensible.

- ✓ Les résultats de l'activité antibactérienne (Tableau III.4) montrent des variations considérables selon la souche testée, le type d'huile essentielle étudié et la concentration utilisée. Les diamètres des zones d'inhibition, exprimés en millimètres, ont été mesurés à l'aide d'une règle ou d'un pied à coulisse pour différentes concentrations d'HE autour des disques. La sensibilité d'un germe est définie comme [50].
- Insensible pour un diamètre ≤ 8 mm,
- Sensibilité limitée pour un diamètre entre 8 et 14 mm,
- Sensibilité moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm,
- Très sensible pour un diamètre ≥ 20 mm.

- **HE pure (E1)** : Une activité antibactérienne significative est observée avec un diamètre d'inhibition de 15 mm contre *Escherichia coli* et une activité modérée contre *Bacillus subtilis*. *Staphylococcus* présente une bonne sensibilité à cette concentration.
- **Dilution à 50% (E2)** : Une activité antibactérienne modérée est notée contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus* avec un diamètre d'inhibition de 10 mm. Aucune activité n'est observée contre *Bacillus subtilis*.
- **Dilution à 25% (E3)** : Une activité antibactérienne modérée est observée contre *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition de 5 mm. *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus* ne montrent aucune sensibilité.
- **HE encapsulée** : Aucune des souches bactériennes testées ne présente d'activité antibactérienne significative.

Bactéries	HE	Témoin	HE encapsulée	Chatoyante
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				
<i>staphylococcus</i>				

Figure III.5. Résultats de l'activité antibactérienne

En ce qui concerne l'antibiotique de référence, la gentamicine (10 µg) a montré une bonne activité antibactérienne sur la majorité des souches étudiées.

Analyse des résultats :

Les résultats montrent que *Escherichia coli* est sensible à l'huile essentielle pure, avec un diamètre d'inhibition significatif à une concentration de 400 µg/mL, tandis que *Staphylococcus* est plus résistante à cette concentration. Les dilutions à 50% et 25% montrent des effets réduits sur *Escherichia coli* avec des sensibilités respectives moyennes, tandis que les autres souches restent insensibles. Quant aux huiles essentielles encapsulées, aucune activité antibactérienne n'a été observée.

Facteurs expliquant l'absence d'activité antibactérienne des HE encapsulées

- ✓ **Concentration insuffisante** : Les concentrations d'huile essentielle encapsulée pourraient être trop faibles pour inhiber la croissance bactérienne. Des essais avec des concentrations plus élevées seraient nécessaires [51].
- ✓ **Méthodologie** : La méthode de diffusion en disque pourrait ne pas être assez sensible. L'utilisation de méthodes telles que la dilution en milieu liquide ou la microdilution en bouillon pourrait offrir une détection plus précise.
- ✓ **Qualité de l'encapsulation** : Une encapsulation inefficace pourrait limiter la libération des composés actifs. Il est crucial d'examiner la méthode d'encapsulation et d'évaluer la libération des composants actifs [52].
- ✓ **Type de bactéries** : Les différences dans la structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives (*E. coli*) et Gram-positives (*Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*) peuvent influencer leur sensibilité aux huiles essentielles de gingembre. Ces bactéries peuvent être naturellement moins sensibles à ces composés.
- ✓ **Résistance bactérienne** : Les bactéries testées pourraient être intrinsèquement résistantes aux composés de l'huile essentielle encapsulée.

En conclusion, bien que l'encapsulation des huiles essentielles de gingembre n'ait pas montré d'activité antibactérienne dans cette étude, ces résultats mettent en lumière l'importance des facteurs tels que la concentration, la méthodologie, et l'efficacité de l'encapsulation. Des études supplémentaires sont nécessaires pour optimiser ces paramètres et améliorer les performances des huiles essentielles encapsulées dans des applications antimicrobiennes.

CONCLUSION

Dans le cadre de cette étude, nous avons exploré en profondeur l'extraction des huiles essentielles de gingembre (*Zingiber officinale*) et leur encapsulation, mettant en évidence leurs propriétés biologiques et leurs nombreuses applications potentielles.

Au terme de ce travail, nous avons pu conclure que :

- ✓ L'extraction de l'huile essentielle de *Zingiber officinale* a été réalisée par hydrodistillation à l'aide de l'appareil de Clevenger, obtenant un rendement de 0,45 %. Cette méthode garantit la pureté et la qualité des huiles essentielles extraites.
- ✓ L'encapsulation des huiles essentielles de *Zingiber officinale* dans des nanoparticules de chitosane a permis d'améliorer leur stabilité et leur solubilité.
- ✓ L'évaluation de l'activité antioxydante de *Zingiber officinale* a révélé un potentiel anti-radicalaire puissant, comparable à celui de l'acide ascorbique, avec des valeurs de $CI_{50} = 0,21$ mg/mL et $IC_{50} = 0,4$ mg/mL. Cela confirme son efficacité en tant qu'antioxydant naturel, avec un potentiel thérapeutique significatif.
- ✓ L'activité antibactérienne de *Zingiber officinale* a montré une inhibition variable selon les espèces testées, avec des zones d'inhibition allant de 5 mm à 15 mm en méthode par disque. Cependant, l'encapsulation des huiles essentielles n'a pas montré d'effet antibactérien significatif dans ce cadre.

Ces résultats suggèrent que *Zingiber officinale* présente un potentiel pour le développement en phytomédecine. Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires, notamment en termes de sécurité et d'efficacité, surtout en cas d'utilisation prolongée.

PERSPECTIVES

Dans la continuité de ces travaux, il serait intéressant de :

- ✓ Explorer d'autres activités biologiques, telles que les propriétés anti-inflammatoires des huiles essentielles de *Zingiber officinale*, et quantifier les concentrations minimales inhibitrices (CMI) contre une gamme plus large de germes.
- ✓ Tester d'autres méthodes d'extraction afin d'évaluer leur impact sur la composition chimique et les propriétés biologiques des huiles essentielles.

- ✓ Poursuivre les recherches sur l'encapsulation des huiles essentielles pour améliorer encore leur stabilité, optimiser leur efficacité, et maximiser leur absorption dans les applications thérapeutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Ben Ayed, H., Koubaa, M., Marrakchi, C., Rekik, K., Hammami, F., Smaoui, F.; Mariem Ben Hmida, M., SourourYaich, S., ImedMaaloul, I., Damak, J., and Ben Jemaa, M., and Damak, J. (2018). Extrapulmonary tuberculosis: update on the epidemiology, risk factors and prevention strategies. *Int J Trop Dis*, 1(006).
- [2] Zellagui, A., Gherraf, N., & Rhouati, S. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* Cosset Dur. leaves, endemic in Algeria. *Organic and medicinal chemistry letters*, 2, 1-4.
- [3] Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2010). *Citrus d'Algérie: les huiles essentielles et leurs procédés d'extraction*. OPU Algérie.
- [4] Besombes, C. (2008). *Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques: applications généralisées* (Doctoral dissertation, Université de La Rochelle).
- [5] Robin, S., Bruneton, C., & Guévert, E. (2017). *Recommandations nationales et pratiques en matière de traitement du paludisme au Bénin en 2009*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 110(3), 207.
- [6] Nilsson Sköld, H., Aspengren, S., & Wallin, M. (2013). Rapid color change in fish and amphibians—function, regulation, and emerging applications. *Pigment cell & melanoma research*, 26(1), 29-38.
- [7] Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2009). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press.
- [8] Tisserand, R., & Young, R. (2013). *Essential oil safety: a guide for health care professionals*. Elsevier Health Sciences.
- [9] Aguilar, J. A., Albert, A., Amram, P., Anghinolfi, M., Anton, G., Anvar, S., ... & Schuller, J. P. (2005). Transmission of light in deep sea water at the site of the ANTARES neutrino telescope. *Astroparticle Physics*, 23(1), 131-155.
- [10] Krid, S., Aimene, I., & Bekka, F. E. (2013). *Etude bibliographique de l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur des bactéries Gram positif* (Doctoral dissertation, université de jijel).

- [11] Agrane, A., &Dorbane, F. (2017). Traitement par l'huile essentielle et sa toxicité Sur les tissus (Doctoral dissertation, université ibn khaldoun TIARET).
- [12] Turgeon, D., Carrier, J. S., Lévesque, E., Hum, D. W., &Bélanger, A. (2001). Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members. *Endocrinology*, 142(2), 778-787.
- [13] Bardeau, F. (2009). Les huiles essentielles. Fernand Lanore.
- [14]Le Roux, X., Barbault, R., Baudry, J., Burel, F., Doussan, I., Garnier, E., ... &Trommetter, M. (2008). Agriculture et biodiversité. Valoriser les synergies.
- [15]Couderc, V. (2001). Toxicité des huiles essentielles (Doctoral dissertation).
- [16]Lardry, J. M., &Haberhorn, V. (2007). Les huiles essentielles: principes d'utilisation. *Kinesithérapie, la revue*, 61(7), 18-23.
- [17]Ahlem, C. H. E. R. G. U. I. Etude des propriétés physico-chimique et biologique de l'huile essentielle d'une plante Algérienne (*S. incana*).
- [18]Hüsni, K., &Buchbauer, G. (2010). Essential oils science, technology, and applications.
- [19]Klompas, M., Branson, R., Eichenwald, E. C., Greene, L. R., Howell, M. D., Lee, G., ...&Berenholtz, S. M. (2014). Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia in acute care hospitals: 2014 update. *Infection Control &HospitalEpidemiology*, 35(8), 915-936.
- [20]Lina, E. N. E. H. H., &Dounya, M. (2017). Le gingembre et l'immunité.
- [21]Gigon, F.(2012). Le gingembre, une épice contre la nausée. *Phytothérapie*, 10(2), 87-91.
- [22]Abdelli, S., & Ait El Menceur, A. (2023). Extraction des huiles essentielles et des extrait phénoliques du gingembre (*Zingiber officinale*), caractérisation de leurs activités biologiques—caractérisation physicochimique, phytochimique du gingembre (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- [23]Cheng, C. J., Tietjen, G. T., Saucier-Sawyer, J. K., & Saltzman, W. M. (2015). A holistic approach to targeting disease with polymeric nanoparticles. *Nature reviews Drug discovery*, 14(4), 239-247.

[24]Christoforidis, J. B., Chang, S., Jiang, A., Wang, J., &Cebulla, C. M. (2012). Intravitreal devices for the treatment of vitreous inflammation. *Mediators of inflammation*, 2012(1), 126463.

[25]Bensouiki, S., &Belaib, F. (2022). Développement des systèmes de délivrances des médicaments en vue de l'application à la libération prolongée d'un principe actif (Doctoral dissertation, Université Constantine 3 Salah Boubnider, Faculté de génie des procédés pharmaceutiques).

[26]Stella, B., Marengo, A., &Arpicco, S. (2017). Nanoparticles: an overview of the preparation methods from preformed polymers. *Istituto Lombardo-Accademia di Scienze e Lettere• Incontri di Studio*.

[27]Gurny, R., Peppas, N. A., Harrington, D. D., & Banker, G. S. (1981). Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug development and industrial pharmacy*, 7(1), 1-25.

[28] characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of controlled release*, 50(1-3), 31-40.

[29] Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M. J., ...&Vigneron, C. (1998). Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of controlled release*, 50(1-3), 31-40.

[30] Trotta, M., Debernardi, F., & Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. *International journal of pharmaceutics*, 257(1-2), 153-160.

[31] Tiruwa, R. (2016). A review on nanoparticles-preparation and evaluation parameters. *Indian journal of pharmaceutical and biological research*, 4(2), 27.

[32] Legrand, P., Benoit, J. P., Briançon, S., Fattal, E., Fessi, H., &Passirani, C. (2007). Sphéroïdes et formes vectorisées. *Pharmacie Galénique: Formulation et Technologie pharmaceutique*, 221-250.

- [33] Fessi, H. P. F. D., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., & Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International journal of pharmaceutics*, 55(1), R1-R4.
- [34] Allémann, E., Gurny, R., & Doelker, E. (1992). Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *International journal of pharmaceutics*, 87(1-3), 247-253.
- [35] Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 26, 1025-1058.
- [36] Naskar, S., Sharma, S., & Kuotsu, K. (2019). Chitosan-based nanoparticles: An overview of biomedical applications and its preparation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 49, 66-81.
- [37] Roberts, G. A., & Roberts, G. A. (1992). Structure of chitin and chitosan. *Chitin chemistry*, 1-53.
- [38] Vårum, K. M., Ottøy, M. H., & Smidsrød, O. (1994). Water-solubility of partially N-acetylated chitosans as a function of pH: effect of chemical composition and depolymerisation. *Carbohydrate polymers*, 25(2), 65-70.
- [39] Buntrock, R. E. (2002). ChemOffice Ultra 7.0. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 42(6), 1505-1506.
- [40] Kunjachan, S., Jose, S., & Lammers, T. (2010). Understanding the mechanism of ionic gelation for synthesis of chitosan nanoparticles using qualitative techniques. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*, 4(2).
- [41] Hosseinejad, M., & Jafari, S. M. (2016). Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan. *International journal of biological macromolecules*, 85, 467-475.
- [42] Ma, Y., Liu, P., Ye, K., He, Y., Chen, S., Yuan, A., ...& Yang, W. (2022). Preparation, characterization, in vitro release, and antibacterial activity of oregano essential oil chitosan nanoparticles. *Foods*, 11(23), 3756.
- [43] Jayakumar, R., Prabakaran, M., & Muzzarelli, R. A. (Eds.). (2011). *Chitosan for biomaterials I* (Vol. 243). Springer

- [44] Sessa, M., Balestrieri, M. L., Ferrari, G., Servillo, L., Castaldo, D., D'Onofrio, N., & Tsao, R. (2014). Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. *Food chemistry*, 147, 42-50.
- [45] Milinčić, D. D., Salević, A., Kostić, A. Ž., Nedović, V. A., & Pešić, M. B. (2022). Improvement of physicochemical properties of food, functionality, quality, and safety by phytochemical-loaded nanoemulsions. In *Bio-Based Nanoemulsions for Agri-Food Applications* (pp. 279-296). Elsevier.
- [46] Djahra, A. B., Bordjiba, O., & Benkherara, S. (2013). Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube. *Phytothérapie*, 11, 348-352.
- [47] Molyneux, P. (2004). Utilisation du radical libre stable diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) pour estimer l'activité antioxydante. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- [48] Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003). Activité antimicrobienne des huiles essentielles sur la microflore native de la bette à carde bio suisse. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 679-684.
- [49] Sánchez-Moreno, C. (2002). Méthodes pour évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres dans les aliments et les systèmes biologiques. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- [50] Duraffourd, C., Laure d'. Hervicourt, & Lapraz, J. C. (1983). *Cahiers de phytothérapie clinique: Examens de laboratoire, galénique, éléments thérapeutiques synergiques*. Masson
- [51] Chatjuthamard, P., Boonlert-U-Thai, K., Jiraporn, P., Uyar, A., & Kilic, M. (2023). Hostile takeover threats, managerial myopia and asset redeployability. *Corporate Governance: The International Journal of Business in Society*, 23(1), 169-188.
- [52] Cai, H., Gan, C., Wang, T., Zhang, Z., & Han, S. (2019). Once-for-all: Train one network and specialize it for efficient deployment. *arXiv preprint arXiv:1908.09791*.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II.2 Encapsulation de l'Huile Essentielle de Gingembre sous Forme de Nanoparticules

- **Préparation les solutions filles**

- **Exemple de Calcul**

- Pour préparer une solution à 1% (v/v) à partir d'une solution mère à 1% (v/v) avec un volume final souhaité de 25 mL

$$V1 = \frac{C2 \times V2}{C1} = \frac{1\% \times 25 \text{ mL}}{1\%} = 25 \text{ mL.}$$

- Pour préparer une solution à 0,01% (v/v) : $V1 = \frac{0,01\% \times 25 \text{ mL}}{1} \% = 0,25 \text{ mL}$ Ajouter 0,25 mL de la solution mère et compléter avec de l'eau jusqu'à un volume final de 25 mL en utilisant une fiole de 25 mL.
- Pour préparer une solution à 0,5% (v/v) : $V1 = \frac{0,5\% \times 25 \text{ mL}}{1} \% = 12,5 \text{ mL}$
- Pour préparer une solution à 0,05% (v/v) : $V1 = \frac{0,05\% \times 25 \text{ mL}}{1} \% = 1,25 \text{ mL}$

II.3 Évaluation du pouvoir antioxydant de l'huile essentielle du gingembre

- **Calcul des concentrations finales**

- Utilisez la formule suivante pour déterminer les concentrations finales des solutions diluées après l'ajout d'éthanol

$$Cf = \frac{Ci \times Vi}{Vf}$$

- **Exemple de calcul**

- Pour 10 µl de la solution mère de DPPH et un volume final de 1500 µl :

$$Cf = (30000 \times 101500) = 200 \mu \frac{g}{ml} = \frac{0,2 \text{ mg}}{ml}$$

➤ **Calcul**

- Calculez le pourcentage d'inhibition (I%) en utilisant la formule suivante

$$I\% = \frac{(A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}})}{A_{\text{blanc}}} \times 100$$

Où :

A_{blanc} : absorbance de la solution de DPPH en l'absence de l'extrait ou de l'huile essentielle.

A_{échantillon}: absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait ou de l'huile essentielle.

➤ **Exemple de calcul :**

- Pour une concentration à 9% : $I\% = \left(\frac{0,57 - 0,272}{0,57} \right) \times 100 = 52,28\%$
- Pour une concentration à 10% : $I\% = \left(\frac{0,57 - 0,284}{0,57} \right) \times 100 = 50,17\%$