

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

Université A. MIRA – BEJAIA



Faculté de Technologie



Département de Génie des Procédés

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de

Master

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

Présenté par

IDIR Souad

HADERBACHE Zahra

Thème :

**Extraction et évaluation des propriétés anti-oxydantes des extraits de Thymus :
préparation pharmaceutique par microencapsulation dans des polymères
biodégradables**

Soutenu le : 02 Juillet 2023

Devant le Jury composé de :

M^r BELHAMEL Kamel, Professeur, Président

M^{me} BOUARICHE Zakia, MAA, Examinatrice

M^{me} BELKACEMI Hayet, Professeur, Encadreur

Année universitaire : 2022-2023

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné le courage et la volonté à fin d'accomplir ce mémoire.

*Nos sincères remerciements vont à notre promotrice **M^{me} BELKACEMI** pour avoir accepté de nous encadrer, grâce à sa gentillesse. Sans lui, ce thème n'aurait jamais été. Qui depuis le début, n'a cessé de nous faire bénéficier de ses nombreux conseils, de ses compétences et de son soutien.*

*Nous tenons à remercier **Mr BELHAMEL** d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nos remerciements vont à **M^{me} BOUARICHE** d'avoir accepté d'examiner notre mémoire.*

Nos remerciements sont aussi adressés à l'ensemble des techniciens de laboratoire de génie des procédés du bloc 11.

Nos remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Tout d'abord, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage, la force, la chance et la patience pour accomplir ce modeste travail que je dédie :

A mes très chers parents

Pour tout l'amour qu'ils me portent et pour leurs encouragements qu'ils m'ont apportés au cours de ce projet, je leur dédie ce travail en témoignage d'un grand amour et reconnaissance infinie.

Ma très chère mère pour son sacrifice, son aide, ses conseils et sa patience.

Mon très cher père pour tous ce qu'il a fait pour moi durant toutes mes années d'étude, pour ses encouragements. Mes cher parents qui Dieu vous garde.

A ma sœur et mon frère Nesserine et Sofiane

A toute ma famille et ma belle famille

Je dédie tout particulièrement ce travail à ma chère grande mère « yamma Zohra » pour ses prières à mon égard, ses conseils précieux puisse Dieu te donne santé, bonheur que Dieu te garde pour nous.

A mon cher fiancé Khalil, merci infiniment pour les encouragements permanents, les conseils, le soutien moral que tu m'as apporté depuis que l'on s'est rencontré.

A mon merveilleux binôme « Souad » et sa famille

A toutes mes amies : Hadjer, Lydia, Zaza, Lila, Laledja, Sylia, Nawel, Sonia, Nassima, Cylia. Je vous aime.

Zahra

Dédicace

*Mes remerciements vont tout d'abord au **DIEU** pour la volonté et la patience qu'il m'a donnée durant ces longues années d'études afin que je puisse arriver à ce stade.*

Je dédie ce modeste travail :

*À la mémoire de mon cher père, malheureusement le destin ne nous a pas permis de partager ce moment ensemble et de t'exprimer mon amour, puisse **DIEU** t'accueillir dans son vaste paradis.*

*À ma chère maman, qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études **QUE DIEU** le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie et te protège de tout mal.*

*À mes chers frères : **Atman** et **Mokran** vous êtes la lumière de ma vie sans votre présence je ne pourrai jamais avancer, Je vous aime.*

À mes chères sœurs, Que dieu vous protège.

À tous les membres de ma famille.

*À mon cher fiancé : **RIADH**.*

*À mon merveilleux binôme et mon amie « **ZAHRA** ».*

À mes très chères amies : Lydia, Leila, Nawel, Laldja, Silia, Nacima, Cylia, Fairouz.

Souad.

Liste des abréviations

Abréviation	Mot complet
Abs	Absorbance
ADN	Acide désoxyribonucléique
AG	Acide gallique
BHT	Butylhydroxytoluène
BHA	Butylhydroxyanisole
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
DCM	Dichlorométhane
Dex	Dextrine
EDCM	Extrait de Dichlorométhane
EP	Ether de pétrole
EEP	Extrait d'éther de pétrole
ERO	espèces réactives de l'oxygène
GPxs	Glutathion peroxydases
HA	Hydro-alcoolique
HE	Huile essentielle
HCL	d'acide chlorhydrique
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
IRFT	Infrarouge à Transformation de Fourier
MDA	Malondialdéhyde
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Liste des abréviations

NaOH	Hydroxyde de sodium
PA	Principe actif
PEG	polyéthylène glycol
PM	Phase mobile
Qr	Quercétine
RP	Rapport polymère
SOD	Superoxyde dismutase
TBARS	Substances réactives à l'acide Thio barbiturique
TBHQ	Tertiobutylhydroquinone
Thym	thymol
Tr	Temps de rétention
UV	Ultra violet

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
figure I.1	Aspects morphologiques de <i>Thymus vulgaris L. officinalis</i>	6
Figure I.2	Distribution géographique de Thym dans le monde	8
Figure I.3	quelques espèces de genre thymus	9
Figure I.4	Schéma global qui résume le métabolisme végétal	12
Figure I.5	Squelette de base des polyphénols	14
Figure I.6	Squelette de base d'un flavonoïde	14
figure I.7	Quelques structures de base des flavonoïdes	15
Figure I.8	(A) Structure chimique d'acide gallique, (B) acide ellagique	16
Figure I.9	Exemple des tanins condensés	17
Figure I.10	Structure de l'unité isoprène	17
Figure I.11	Modes d'extraction des huiles essentielles	19
Figure I.12	l'hydrodistillation simple	20
Figure I.13	Distillation à vapeur saturée	20
Figure I.14	l'hydro diffusion	21
Figure I.15	Structure chimique du thymol	23
Figure I.16	Structure chimique du carvacrol	24
Figure II.1	Les processus de formation des ERO	26
Figure II. 2	principales sources des radicaux libres	27
Figure II. 3	Schéma des molécules intervenant dans les protections cellulaires	34
Figure II.4	Mise en forme d'un médicament	36
Figure II.5	Les formes galéniques	37

Figure II.6	Représentation schématique d'une microcapsule et d'une microsphère	38
Figure II.7	Représentation statistique des domaines d'applications de la Microcapsulation	41
Figure II.8	Système de microencapsulation mécanique Nébulisation/séchage	42
Figure II.9	Différents états de la substance active à encapsuler en lit fluidisé	43
Figure II.10	Schéma du principe de la microencapsulation par polycondensation interfaciale	43
Figure II.11	Réticulation interfaciale des microcapsules par coacervation complexe	44
Figure II.12	Représentation de l'émulsion simple	45
Figure II.13	Représentation de l'émulsion double	46
Figure II.14	Profils des cinétiques de dissolution de modèles fickiens et d'ordre zéro	49
Figure III.1	Thymus vulgaris sous forme séchée	54
Figure III.2	broyage des feuilles de thymus	55
Figure III.3	poudre des feuilles de thymus après tamisage	55
Figure III.4	Macération (extraction solide /liquide)	56
Figure III.5	Filtration	57
Figure III.6	Le filtrat	57
Figure III.7	Le résidu	57
Figure III.8	Evaporation de filtra	58
Figure III.9	Extraction par l'éther de pétrole	59
Figure III.10	Extrait de l'éther de pétrole (EEP)	60
Figure III.11	Extraction par Dichlorométhane	61
Figure III.12	Extrait Dichlorométhane (EDCM)	61
Figure III.13	les extraits de la plante thymus	62
Figure III.14	Schéma des étapes de la préparation d'échantillon des extraits du thymus	64
Figure III.15	Formule chimique de la Quercétine	64
Figure III.16	Schéma de réaction des flavonoïdes avec chlorure	65

	d'aluminium	
Figure III.17	Schéma des étapes de la préparation d'échantillon des extraits (flavonoïdes)	66
Figure IV.18	représente la formule globale du DPPH	67
Figure III.19	Schéma des étapes de dilutions de l'extrait HE et de mesure de l'activité Anti-oxydante par le DPPH.	68
Figure III.20	Représentation schématique du polyéthylène glycol	70
Figure III.21	Représentation schématique de la dextrine	70
Figure III.22	Représentation schématique du glutaraldéhyde	70
Figure III.23	Représentation schématique du thymol et carvacrol	71
Figure III.24	La phase dispersée	74
Figure III.25	La phase continue	75
Figure III.26	Emulsion	75
Figure III.27	Filtration	76
Figure III.28	installation du dissolu test mise en œuvre pour l'étude de la cinétique de libération	78
Figure IV.1	Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux	79
Figure IV.2	Histogramme de variation des teneurs en polyphénols totaux dans les extraits de <i>Thymus L. Officinalis</i>	80
Figure IV.3	Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux	81
Figure IV.4	Histogramme de variation des teneurs en flavonoïdes totaux de <i>Thymus Vulgaris L. officinalis</i> .	82
Figure IV.5	Histogramme de l'activité antioxydante et pouvoir d'inhibition des extraits de <i>Thymus L. Officinalis</i> .	83
Figure IV.6	les chromatogrammes des standards	85
Figure IV.7	les chromatogrammes des extraits.	87
Figure IV.8	Diagramme de Pareto pour la réponse EEP%.	92
Figure IV.9	Optimisation de la réponse pour EEP %	93
Figure IV.10	Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEP%	94
Figure IV.11	les diagrammes surface-réponse et contour pour EEP%	95

Figure IV.12	Diagramme de Pareto pour EEF%.	97
Figure IV.13	Optimisation de la réponse pour EEF%.	97
Figure IV.14	Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEF%.	98
Figure. IV.15	diagrammes surface-réponse ou contour pour EEF%.	99
Figure IV.16	Courbe de la cinétique de libération des polyphénols dans le milieu intestinal (PH=6.8)	101
Figure IV.17	Profil de la variation du taux d'inhibition du radical DPPH en fonction du temps des microparticules PEG / Dextrine, dans le milieu intestinal (pH=6.8).	101
Figure IV.18	spectre infrarouge IRFT de la quercétine dans le KBr.	103
Figure IV.19	Spectre infrarouge IRFT de l'acide gallique dans le KBr	103
Figure IV.20	Spectre infrarouge IRFT du thymol dans le KBr	104
Figure IV.21	Spectre infrarouge IRFT de dextrine dans le KBr.	104
Figure IV.22	Spectre infrarouge IRFT du Glutaraldéhyde dans le KBr.	105
Figure IV.23	Spectre infrarouge IRFT du PEG6000 dans le KBr	105
Figure IV.24	Spectre infrarouge IRFT d'extrait de thymus sec dans le KBr.	106
Figure IV.25	Spectre infrarouge IRFT microcapsules Dex/PEG de l'extrait de thymus dans le KBr.	106

La liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Page
Tableau I.1	Classification botanique de <i>thymus vulgaris</i>	5
Tableau I.2	les différentes classes des composés phénoliques	13
Tableau II.1	liste de quelques espèces réactives	26
Tableau II.2	Les formes galéniques les plus courantes	37
Tableau II.3	Exemples de composés encapsulés selon leurs domaines d'application	40
Tableau II.4	Matrice d'expériences du plan factoriel pour 3 facteurs	52
Tableau III.1	préparation des étalons d'acide gallique	63
Tableau III.2	préparation des étalons de Quercétine	65
Tableau III.3	les dilutions de l'huile essentielle	67
Tableau III.4	les différentes masses de PEG, de dextrine et volumes d'extrait de thymus des essais du plan d'expérience factoriel	73
Tableau III.5	variables codées et réelles des facteurs	73
Tableau III.6	Matrice du plan d'expérience factoriel pour les essais de microencapsulation de l'extrait du thymus dans les polymères Dex/PEG.	74
Tableau IV.1	Le pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH en fonction des extraits des feuilles de thym	83
Tableau IV.2	Les temps de rétention des standards.	84
Tableau IV.3	Temps de rétentions des principes actifs des extraits de <i>Thymus Vulgaris L. officinalis</i> .	86
Tableau IV.4	concentrations des extraits de <i>Thymus Vulgaris L</i> par HPLC	88
Tableau IV.5	Matrice du Plan factoriel avec les réponses expérimentales	90
Tableau IV.6	analyse statistique de la variance pour la réponse EEP%	91
Tableau IV.7	analyse statistique de la variance pour la réponse EEF%	96
Tableau IV.8	taux de libération des polyphénols, flavonoïdes et l'inhibition de radical DPPH en fonction du temps des microparticules de PEG / Dextrine préparées dans les conditions optimales, dans le milieu intestinal (pH= 6.8).	100
Tableau IV.9	Les principales bandes d'absorption infrarouge identifiée sur les spectres IR de l'extrait brut, des microcapsules et des standards	107

Sommaire

Remerciement

Dédicace

La liste des abréviations

La liste des figures

La liste des tableaux

Introduction générale..... 1

**CHAPITRE I : Etude bibliographique sur la plante *thymus vulgaris L Offi-
cinalis***

Partie 01 : Généralités sur les plantes médicinales 3

I.1.1. Les plantes médicinales 3

I.1.2. Effets thérapeutiques des plantes médicinales 3

Partie 02 : *le thymus vulgaris Lamiacées*

I.2.1. Présentation de *Thymus vulgaris L*..... 4

I.2.2. Présentation de la famille des *Lamiaceae*..... 4

I.2.3. Origine et distribution de la plante..... 5

I.2.4. Classification systématique 5

I.2.5. Description botanique de la plante..... 6

I.2.6. Noms vernaculaires 6

I.2.7. Habitat 7

I.2.8. Répartition géographique de la plante..... 7

1. dans le monde 7

2. En Algérie.....	8
I.2.9. Quelques espèces de genre thymus	8
I.2.10. La composition chimique du thymus vulgaris	9
I.2.11. Principes actifs du thym	10
I.2.12. Domaines d'utilisation.....	10
I.2.12.1. Utilisation en médecine traditionnelle	10
I.2.12.2. Utilisation culinaire et agroalimentaire	10
Partie 03 : Les métabolismes	
I.3.1. Définition.....	11
I.3.2. Classification des métabolites.....	11
I.3.2.1. Métabolites primaire.....	11
I.3.2.2. Métabolites secondaire	11
I.3.3. Les composés phénoliques	12
a. Définition	12
b. structure chimique de polyphénols	13
I.3.3.1. Les flavonoïdes	14
a) définition les flavonoïdes.....	14
b) structure chimique de flavonoïde	14
c) Classification	15
d) Rôles des flavonoïdes dans la plantes	15
I.3.3.2. Tannins	16
I.3.3.2.1. Tannins hydrolysables	16
I.3.3.2.2. Tanins condensés	16
I.3.3.3. Les Terpenoides	17
I.3.3.4. Les composés azotés dérivés des acides aminés (Alcaloïdes)	17

Partie 04 : Les huiles essentielles

I.4.1. Définition.....	18
I.4.2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	18
I.4.2.1. Entraînement à la vapeur d'eau.....	19
I.4.2.1.1. Hydrodistillation simple	20
I.4.2.1.2. Distillation à vapeur saturée.....	20
I.4.2.1.3. Hydrodiffusion	21
I.4.3. Rôle des HE dans les plantes	22
I.4.4. Principaux domaines d'application	22
I.4.4.1. Aromathérapie.....	22
I.4.4.2. Agro-alimentaire	22
I.4.4.3. Cosmétologie et parfumerie	22
I.4.4.4. Pharmacie	23
I.4.5. L'huile essentielle du thym.....	22
I.4.5.1. Thymol.....	23
I.4.5.2. Carvacrol.....	24
I.4.6. Conservation des huiles essentielles.....	24

CHAPITRE II : radicaux libre et stress oxydatif et microencapsulation

Partie 1 : radicaux libre et stress oxydatif

II.1.1. les radicaux libres (les oxydants).....	25
II.1.1.1. Histoire des radicaux libre.....	25
II.1.1.2. Définition des radicaux libres.....	25
II.1.1.3. Origine des radicaux libres.....	27
II.1.1.4. Phase de l'oxydation.....	28
a) Initiation.....	28
b) Propagation.....	28
c) Terminaison (arrêt).....	28
II.1.2. Stress oxydatif	28
II.1.2.1. Définition du stress oxydatif.....	28

II.1.2.2. Conséquences biochimiques du stress oxydatif	29
a) Effets sur les protéines	29
b) Effets sur les acides gras	29
c) Effets sur les glucides	30
d) Effets sur l'ADN	30
II.1.2.3. Les moyens de défense contre le stress oxydatif	30
II.1.2.3.1. Moyens de défense endogène	31
1) Le superoxyde dismutase (SOD)	31
2) Catalase	31
3) Glutathion peroxydases (GPxs)	31
4) Le cuivre	31
5) Le zinc	32
6) Sélénium	32
II.1.2.3.2. Moyens de défense exogène	32
a) Vitamine E	32
b) Vitamine C	32
II.1.3. Les antioxydants	33
II.1.3.1. Classification	33
a) Les antioxydants enzymatiques	34
b) Les antioxydants non enzymatiques	34
c) Les antioxydants d'origine végétale	34
d) Les antioxydants synthétiques	35
Partie 2 : microencapsulation	
II.2.1. Définition d'un médicament	35
II.2.2. Mise en forme d'un médicament	35

II.2.3.	Formes galéniques des médicaments.....	36
II.2.4.	La microencapsulation.....	37
II.2.4.1.	Historique.....	37
II.2.4.2.	Définition.....	38
II.2.4.3.	Classification des microparticules.....	38
II.2.4.4.	Intérêt de la microencapsulation.....	39
II.2.4.5.	Composition chimique des microparticules.....	39
II.2.4.6.	Applications de l'encapsulation.....	40
II.2.4.7.	Techniques d'encapsulation.....	41
II.2.4.7.1.	Procédé mécanique.....	41
II.2.4.7.2.	Procédés chimiques.....	43
II.2.4.7.3.	Procédés physico-chimiques.....	43
II.2.5.	Cinétique de libération du principe actif encapsulé.....	46
II.2.5.1.	Système à libération accélérée.....	46
II.2.5.2.	Système à libération prolongée.....	46
II.2.5.3.	Système à libération déclenchée.....	46
II.2.6.	Modèles théorique du mécanisme de libération de principe actif.....	47
a.	Diffusion fickienne.....	47
b.	Modèles d'ordre 1 ou de Wegner.....	47
c.	Modèle d'Higuchi.....	48
d.	Modèle de Weibull ou de la fonction RRSBW.....	48
e.	Modèle d'ordre zéro (modèle non fickien).....	49
II.2.7.	Principaux matériaux d'encapsulation.....	49
II.2.8.	Polymères biodégradables.....	50
II.2.8.1.	Définition.....	50
II.2.8.2.	Mélanges de polymères.....	50
II.2.8.3.	Avantages des mélanges de polymères.....	50
II.2.9.	Méthodologie des plans expériences.....	50
II.2.9.1.	Définition.....	50
II.2.9.2.	Types des plans d'expériences.....	51
a)	Plans factoriels à 2 niveaux (2^k).....	51
b)	Plans centrés composés.....	52

c) Plans Box-Behnken.....	53
---------------------------	----

CHAPITRE III : Matériels et Méthodes

Introduction

III.1. Matériel végétale.....	54
III.1.1. Cueillette.....	54
III.1.2. Prétraitement de la plante	55
III.1.2.1. Broyage.....	55
III.1.2.2. Tamisage et conservation	55
III.2. Méthode d'extraction	56
III.2.1. Macération (extraction solide/ liquide).....	56
III.3. Rendement massique.....	58
III.4. Extraction par les solvants organiques (Extraction liquide-liquide)	59
a. Extraction par l'éther de pétrole EP.....	59
b. Extraction par Dichlorométhane.....	60
III.5. Analyse et quantification par spectroscopie UV-VIS	62
III.5.1. Dosages des polyphénols totaux	62
III.5.2. Dosage des flavonoïdes	64
III.5.3. Activité antioxydante par méthode de DPPH... ..	66
III.6. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC	68
Partie 03 : Microencapsulation	
III.3.1. Présentation des matières premières.....	69
III.3.2. Préparation des milieux physiologiques	71
III.3.3. optimisation des paramètres de préparation des microparticules	72
III.3.4. Mode opératoire de la préparation de la microencapsulation	74

III.3.5. Techniques de caractérisation	77
Partie 4 : étudier la cinétique de libération	
III.4.1. les matériels utilisés	78
III.4.2. Préparation des milieux physiologique	78
III.4.3. Protocole expérimental.....	78
III.5. Caractérisation par infrarouge IRFT	79
CHAPITRE IV : Résultats et discussion	
<hr/>	
IV.1. Extraction.....	79
IV.1.1. Calcul du rendement massique.....	79
IV.2. Résultats de l'étude phytochimique.....	79
IV.2.1. Caractérisation par spectrophotométrie UV-visible	79
IV.2.1.1. Dosage des polyphénols totaux	79
IV.2.1.2. Dosage des flavonoïdes.....	81
IV.2.2. Activité biologie	82
IV.2.2.1. Activité antioxydant par la méthode DPPH... ..	82
IV.3. Caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	84
IV.4. La microencapsulation.....	89
IV.4.1. Réalisation des essais et analyse statistique	89
❖ Utilisation du logiciel Minitab	90
IV.4.1.1. Taux d'encapsulation en polyphénols EEP%	90
1. Analyse de la variance et équation du modèle pour EEP %	90
2. Diagramme de Pareto pour EEP%	91
3. Optimisation de la réponse EEP%	92
4. Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEP%	93

5. Les diagrammes surface-réponse ou contours pour EEP%	94
IV.4.1.2. Taux d'encapsulation des flavonoïdes	95
1. Analyse de la variance et équation du modèle pour EEF %	95
2. Diagramme de Pareto pour le EEF%	96
3. Optimisation de la réponse EEF%	97
4. Diagramme des effets des principaux facteurs pour EEF%	98
5. Les diagrammes surface-réponse ou contours pour EEF%	
IV.5. Etude de libération in vitro de principe actif (thymol) encapsulée dans les microparticules de PEG / Dextrine	99
IV.5.1. Profil de libération dans le milieu intestinal.....	99
IV.6. Caractérisation par IRFT	102
Conclusion générale.....	109

Références bibliographique

Annexe

Résumé

Introduction générale

Les plantes aux propriétés thérapeutique ou pharmacologique bénéfiques pour le corps humain sont souvent qualifiées de plantes médicinales. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 80% de la population mondiale est partiellement dépendante des plantes médicinales [1].

Les plantes aromatiques ont été employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines grâce à leurs richesses en composants de valeur thérapeutique. Le pouvoir de guérison des plantes provient des effets de leurs métabolites secondaires. Ces métabolites interviennent dans la défense contre les parasites pathogènes. Il existe plusieurs groupes des métabolites notamment les phénols (simple phénols, acides phénoliques, flavonoïdes, flavones, flavonols, tannins et cumarines).

La plante, sur laquelle est porté notre choix, fait partie d'une espèce de thym (*Thymus Vulgaris L. officinalis*). Ce choix est fondé sur les critères suivants : le thym est parmi les plus populaires des plantes aromatiques utilisées dans le monde entier, son utilisation fréquente par nos populations dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle, a été valorisé du fait que leurs huiles essentielles sont très recherchées pour les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Un stress oxydant se définira lorsqu'il y aura un déséquilibre profond entre antioxydants et pro- oxydants [2]. Donc en situation physiologique, il y a un équilibre parfait entre la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes de défenses antioxydants. L'espèce *Thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales [3].

Notre étude est consacrée à la réalisation du suivi de l'extraction des principes actifs (le thymol, les flavonoïdes et les polyphénols), par différents solvant d'extraction et d'analyse. Elle sera approfondie par l'évaluation de l'activité anti-oxydante au DPPH.

L'encapsulation est parmi les préparations pharmaceutiques en cours d'élaboration par les grandes firmes médicamenteuses, qui consiste à encapsuler selon un procédé déterminé un principe actif dans une autre matière inactive, afin d'améliorer les propriétés de conservation, de présentation et de biodisponibilité [4].

L'encapsulation de principe actif est possible en utilisant des polymères, en particulier, biodégradables, bio résorables,... ou un mélange de ces derniers comme excipient. Ils sont très utilisés dans le domaine médical pour leur non toxicité et leur caractéristique à contrôler la libération du principe actif encapsulé. Pour choisir le bon polymère on doit vérifier certain facteur à savoir la nature du polymère et le procédé d'encapsulation.

L'objectif de l'étude est la formulation des microparticules comportant un principe actif «**Thymol**», dans des polymères biodégradables en appliquant le procédé de double émulsion. On doit optimiser les différents paramètres du procédé avec la méthodologie des plants d'expériences. Le but de cette recherche est d'obtenir une libération contrôlée par amélioration des cinétiques de libération de la substance active des microparticules, dans le milieu physiologique intestinal.

Pour cela, nous proposons de suivre le plan d'étude suivant :

- Une partie théorique devisée en deux chapitres:

1°/- Le premier chapitre, composé de plusieurs parties : la première partie c'est une synthèse bibliographique sur les plantes médicinales, la deuxième est réservé à la description de la plante étudiée, la troisième sur les métabolites secondaires et la dernière contient des généralités sur les huiles essentielles, leurs applications et les différentes méthodes d'extraction.

2°/- Le second chapitre, composé de deux parties : la première partie est consacrée aux radicaux libre et au stress oxydatif, et la deuxième présente les techniques d'encapsulation ainsi que le concept de libération des médicaments dans l'organisme et méthodologie des plants d'expériences.

- Une partie expérimentale (le troisième chapitre) concerne la présentation du matériel et les méthodes utilisées pour l'extraction et la microencapsulation, le dosage colorimétrique des polyphénols et des flavonoïdes, les analyses physicochimiques (HPLC et IR), et l'activité antioxydante.

Les résultats obtenus dans notre étude seront discutés dans le quatrième chapitre.

- Enfin, une conclusion générale et des perspectives.

Chapitre I :

Etude bibliographique sur la plante thymus vulgaris L

Partie 01 : Généralités sur les plantes médicinales

I.1.1. Les plantes médicinales

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales, dont au moins une partie possède des propriétés curatives [5].

Environ 35000 plantes sont employées par le monde à des fins médicinales. Ce qui constitue le plus large éventail de biodiversité utilisé par les êtres humains. Les plantes médicinales continuent à répondre à besoin important, malgré l'influence du système thérapeutique moderne [6].

La préparation et l'utilisation d'extraits de plantes médicinales sont transmises d'une génération à autre. Ce sont des pratiques empiriques, basées sur des connaissances ancestrales, ignorant ainsi la manière dont ces extraits agissent sur le corps humains. Avec la révolution scientifique et tous les progrès des domaines (médecine, pharmacie, biologie, botanique, pharmacologie, toxicologie...) les cibles et les mécanismes moléculaires des extrais végétaux sont mieux clarifiés [7].

I.1.2. Effets thérapeutiques des plantes médicinales

Les plantes médicinales favorisent un mode de vie sain, elles nous fournissent des médicaments naturels. En éliminant la plupart des effets secondaires, la phytothérapie assure un traitement plus holistique et moins agressif.[8].

- ✓ **Plante à propriété antidépressive** : certaines plantes possèdent des principes actifs bénéfiques pour le traitement des troubles de l'humeur transitoires et des dépressions légères par un effet qui stimule le système nerveux.
- ✓ **Plantes stimulantes et apéritives** : certaines plantes sont riches en vitamine C, considérées comme stimulantes, comme y'a d'autres qui contiennent des composants amers qui stimulent l'appétit et favorisent ainsi la prise de poids.
- ✓ **Les plantes à propriété hormonale** : certaines espèces sont utiles pour soulager les règles douloureuses.
- ✓ **Les plantes qui soulagent la constipation** : utilisées dans le traitement de la constipation sont repartis en deux groupes : les plantes laxatives, les plantes laxatives stimulantes.

- ✓ **Les plantes utilisées dans le cas d'une inflammation** : certaines plantes possèdent des principes actifs qui leur confèrent des propriétés anti-inflammatoires, qui s'accompagnent souvent d'effets analgésiques. Ce sont des plantes utiles pour le traitement des inflammations aiguës comme l'entérite, et des douleurs inflammatoires chroniques comme l'arthrose.

Partie 02 : le *thymus vulgaris* Lamiacées

I.2.1. Présentation de *Thymus vulgaris* L

Les plantes aromatiques et médicinales peuvent être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique et agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes.

Ces plantes aromatiques sont, donc, à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits résines...etc.) qui se présentant presque toujours comme des mélanges complexes, dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation.

Parmi ces plantes à valeur ajoutées. *Thymus vulgaris* L *officinalis*(thym) possédant une activité pharmacologique, pouvant conduire à des applications thérapeutiques, et cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives, qui pour plus part agissent sur l'organisme humain [9].

Le genre *Thymus* est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées, avec comme forte diversité dans la partie occidentale du bassin méditerranéen [10]. Comme beaucoup de labiées elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques.

Le nom "*Thymus*" dérive du mot grec « thymos » qui signifie "parfumer" à cause de l'odeur agréable que la plante dégage [11]. L'espèce *thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales [3].

I.2.2. Présentation de la famille des Lamiacées

La famille des Lamiacées, anciennement appelée Labiées en raison de la corolle à deux lèvres de ses petites fleurs, est l'une des familles les plus larges dans le règne végétal. Elle comprend approximativement 240 genres et 7200 espèces [12].

Elle est divisée en sept sous-familles : Ajugoideae, Lamioideae, Nepetoideae, Prostantheroidea, Scutellarioideae, Symphorematoideae et viticoideae [13].

C'est une famille d'une grande importance aussi bien pour son utilisation en industrie alimentaire et en parfumerie qu'en pharmacutique. Elle est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiale d'épices et d'extraits à fort pouvoir antibactérien, antifongique, anti-inflammatoire et antioxydant [9].

I.2.3. Origine et distribution de la plante

Thymus vulgaris L officinalis est indigène de l'Europe du sud, on le rencontre depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au sud-est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française [14]. Il est maintenant cultivé partout dans le monde comme thé, épice et plante médicinale [15].

Le *Thymus vulgaris L* présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages [16]. Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés des bords de la mer à la montagne [17].

I.2.4. Classification systématique

La classification botanique de l'espèce *Thymus vulgaris* est présentée dans le **Tableau I.1**, [10].

Tableau I.1 : Classification botanique de *thymus vulgaris L*

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
Embranchement	Spermaphytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	Thymus
Espèce	<i>Thymus vulgaris L</i>

I.2.5. Description botanique de la plante

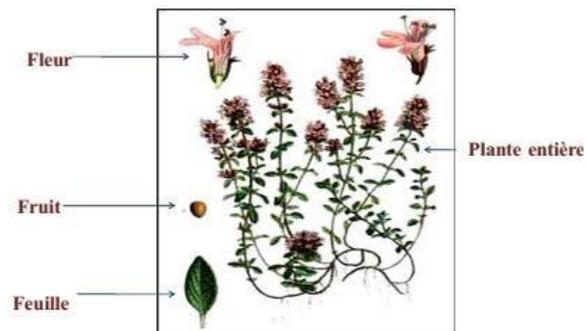
Le thym est une plante basse sous-ligneuse, peut atteindre 40 cm de hauteur, caractérisée par les feuilles vert foncé de 4-10 mm de long, et de forme elliptique à oblongue et à tige courte (**Figure I.1**). Ces feuilles sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes), ces derniers contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes [18].

Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts de ces structures qui libèrent l'essence par simple contact, bien qu'en plus faible densité sur les tiges [19]. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet par le rose [20].

Le thym a une durée de vie allant de 4 à 7 ans [21]. La floraison a lieu d'avril à septembre.



-A-



-B-

Figure I.1 : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris L. officinalis* :

A) plante de thymus vulgaris, B) schéma botanique de la plante [3].

I.2.6. Noms vernaculaires

Les noms vernaculaires de l'espèce *thymus vulgaris* sont les suivants : [22]

Arabe	Saatar, zaatar (en arabe زعتر ou صعتر)
Français	Thym vulgaire, thym de jardins, farigoule
Anglais	Common thym, Garden thym
Allemande	Thymian, Echterthymian, Gartenthymian, Römischecherthymian, romischerquendel,

I.2.7. Habitat

Le thym pousse bien sur des endroits naturels, sur sol légers et calcaires mais il prospère tout aussi bien sur sols fertiles argileux mais non détrempés, et il nécessite des endroits bien la sécheresse. C'est d'ailleurs sur sols pauvres que se développe le mieux son arôme. Dans des endroits de fortes gelées, une protection est recommandée durant l'hiver sa multiplication se fait par semis superficiel (germination à la lumière), réalisé mi-avril ou plus rarement en août, en rangées encadrées environ 20 à 30 cm ; de préférence sur sol léger et sablonneux [23].

I.2.8. Répartition géographique de la plante :

1. dans le monde

Le thym est réparti entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée [24]. Il est très répandu dans le nord-ouest africain (Maroc, Tunisie, Algérie et Libye), les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud-ouest, en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (**Figure I.2**). Il se trouve également en région Micronésienne (îles Canaries, Madère et les Açores) et en Himalaya. Il peut même atteindre les limites de la région tropicale et dans le nord du Japon, il pousse en Sibérie, en Europe nordique jusqu'aux bords du Groenland [25].

La région de l'ouest méditerranéen, est considérée comme étant le centre de l'origine du genre thymus ; l'espèce *T. vulgaris* provient particulièrement du sud de l'Europe, de l'Europe, l'Espagne à l'Italie [25 ; 26]. Le thym est maintenant très cultivé au Portugal, Allemagne, Espagne, Italie, Algérie, Maroc, Tunisie, Egypte, Turquie, Chine, Russie, Angleterre et les Etats-Unis d'Amérique [27 ; 28].

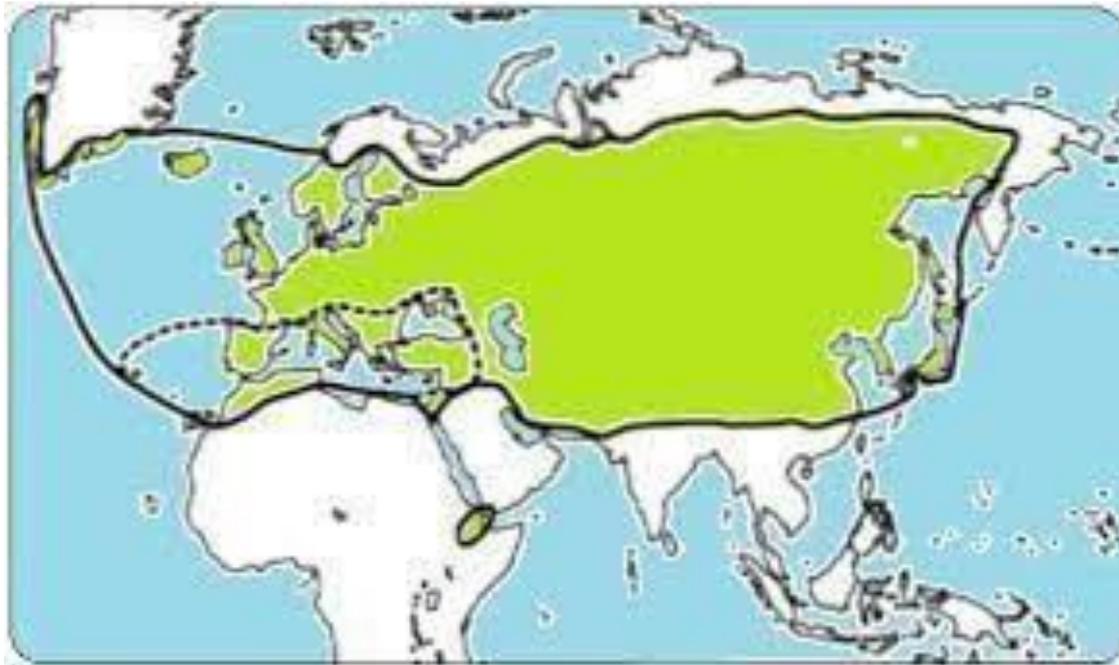


Figure I.2 : Distribution géographique de Thym dans le monde.

(Le cercle noir représente la zone de distribution du genre thymus dans le monde) [29].

2. En Algérie

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales à cause de sa superficie et sa diversité bioclimatique. Le genre *thymus* comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides [30].

Le thym est représenté par plus de 300 espèces à travers le monde dont 12 sont localisées en Algérie et 9 d'entre elles sont endémiques [31]. Ces espèces sont réparties long du territoire national, du Nord algérois à l'Atlas saharien, et du constantinois à l'oranais [16].

I.2.9. Quelques espèces de genre thymus



♣ *Thymus ciliatus*



♣ *Thymus capitatus*



♣ *Thymus algeriensis*

♣ *T. fontanesii*♣ *T. munbyanus*♣ *Thymus numidicus*

Figure I.3 : quelques espèces de genre thymus

I.2.10. La composition chimique du *thymus vulgaris*

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchages, des stockages, et des méthodes d'extraction et de détection [32].

Thymus vulgaris renferme une huile volatile de couleur pâle, jaune ou rouge, avec une odeur riche et aromatique et un goût persistant, corsé et épice [33]. La teneur en huiles essentielles de la plante varie de 5 à 25 ml/kg et sa composition fluctue selon le hémotype considéré.

L'huile essentielle de *thymus vulgaris* analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse a révélé, 30 composés dont les plus abondants sont respectivement : **thymol** (44.4 – 58.1%), (9.1 – 18.5%), **terpinène** (6.9 – 18 %), **carvacrol** (2.4 – 4.2%), **linalol** (4 – 6.2%) [1], les principaux flavonoïdes sont composés de flavone libre (notamment l'apigénine, la 6-hydroxylutéoline et l'alutéoline), des flavanonols comme la taxifoline, des flavanones comme la naringénine, de nombreuses flavones méthoxylées (cirsilinéol, 8-méthoxycirsilinéol, cirsimaritine, sacuranétine, salvgénine, sidéritoflavone, thymonine et thymusine) [34].

La plante renferme des dérivés de l'acide hydroxycinnamique (principes amers des lamiales) (avec environ 4%), l'acide rosmarinique (avec environ 0.8 à 2.6 %), des dérivés de l'acétophénone constitués particulièrement de 4-hydroxyacétophénone, des hétérosides estérifiés et des dérivés de l'acide benzoïque, on trouve également les triterpènes renfermant surtout de l'acide usolique (1.9%) et d'acide oléanolique (0.6%) [32].

I.2.11. Principes actifs du thym

Le thym comporte plusieurs molécules intéressantes qui se trouvent dans les différents organes de la plante [31]. Ces molécules sont :

- **Le thymol**
- **Les acides phénoliques** : acide caféique, acide rosmarinique .
- **Les flavonoïdes** : hespéridine, eriotrécine, narirutine, lutéoline.
- **Les polyphénols** : tanin.

I.2.12. Domaines d'utilisation

I.2.12.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Les espèces de *Thymus* sont considérées comme des plantes médicinales en raison de leurs propriétés pharmacologiques et biologiques. Le thym est l'une des plantes les plus utilisées comme extraits à fort pouvoir antibactérien et anti-inflammatoire dans la pharmacopée traditionnelle [35; 36].

Des études récentes ont montré que les espèces de *thymus* ont de forts pouvoirs antifongiques, antiviraux, antiparasitaires, spasmolytiques et antioxydant [37].

Cette plante aromatique très odorante est considérée comme l'un des remèdes les plus efficaces contre le rhume, la grippe et l'angine, elle calme les toux quinteuses, et diminue les sécrétions nasales. Elle contribue aussi dans le traitement de l'hypertension et les problèmes intestinaux et en usage externe pour le nettoyage et la cicatrisation des plaies [38]. Elle est également utilisées dans les remèdes naturels contre : l'asthme, l'ingestion, les maux de têtes et le rhumatisme [39]. Les feuilles du thym sont très antiseptiques et peuvent être utilisés pour traiter les infections pulmonaires, ses propriétés antiseptiques agissent également sur le système digestif, notamment en cas de diarrhée [40].

I.2.12.2. Utilisation culinaire et agroalimentaire

Thymus vulgaris est l'un des plus populaire plantes aromatiques utilisées dans le domaine alimentaire [41]. Le thym est consommé en tisane, condiment ou épices. L'épice *thymus vulgaris* est intensivement cultivé en Europe et aux Etats-Unis pour l'usage culinaire dans l'assaisonnement des poissons, des volailles, des potages et des légumes [14].

Partie 03 : Les métabolismes

I.3.1. Définition

L'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent dans un organisme est appelé « métabolisme » le métabolisme de la plante verte produit avant tous des glucides et de protides.

Une fraction de glucide est ensuite transformée en composés divers, dont les lipides sont les plus importants pour la plante. Mais le métabolisme fournit aussi plusieurs corps secondaires que l'homme utilise dans son arsenal thérapeutique, il s'agit des hétérosides, des alcaloïdes, des terpenoïdes, et des composés phénoliques. Les végétaux nous fournissent aussi des vitamines, des oligo-éléments et des antibiotiques [42].

I.3.2. Classification des métabolites

Les réactions chimiques qui ont lieu dans le protoplasme des cellules végétales donnent naissance à deux types de produits : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

I.3.2.1. Métabolites primaire

Des métabolites primaire sont synthétisés par la cellule parce qu'elles sont indispensables pour leurs accroissement. Les préposés du service significatifs sont des acides aminés ; des alcools, des vitamines (B2 et B12), des polyols, des acides organique, des protéines, des lipides ainsi que des nucléotides (par exemple inosine-5-monophosphate et guanosine-5-monosphosphate)[43,44].

Ces métabolites se trouvent dans toutes les cellules végétales et sont nécessaires à leur développement.

I.3.2.2. Métabolites secondaire

Les métabolites secondaires constituent un ensemble de molécules qui ne sont pas strictement nécessaires à la survie d'une plante, d'une bactérie ou d'un champignon. Il s'agit majoritairement de molécules de taille et de masse faibles comparées aux molécules du métabolisme primaire (glucide, lipides et acides aminés). Elles sont majoritairement la source d'odeurs jouant le rôle à la fois de répulsif envers les prédateurs (concurrents écologiques) et d'attractif, de pigments permettant de capter le rayonnement solaire mais aussi de protéger la plante contre ce rayonnement. Parmi les métabolites secondaires, les huiles essentielles sont

les plus étudiées et présentent une grande importance commerciale. Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles [45]:

- Les polyphénols
- Les terpènes
- Les alcaloïdes

Un schéma explicatif est représenté ci-dessous :

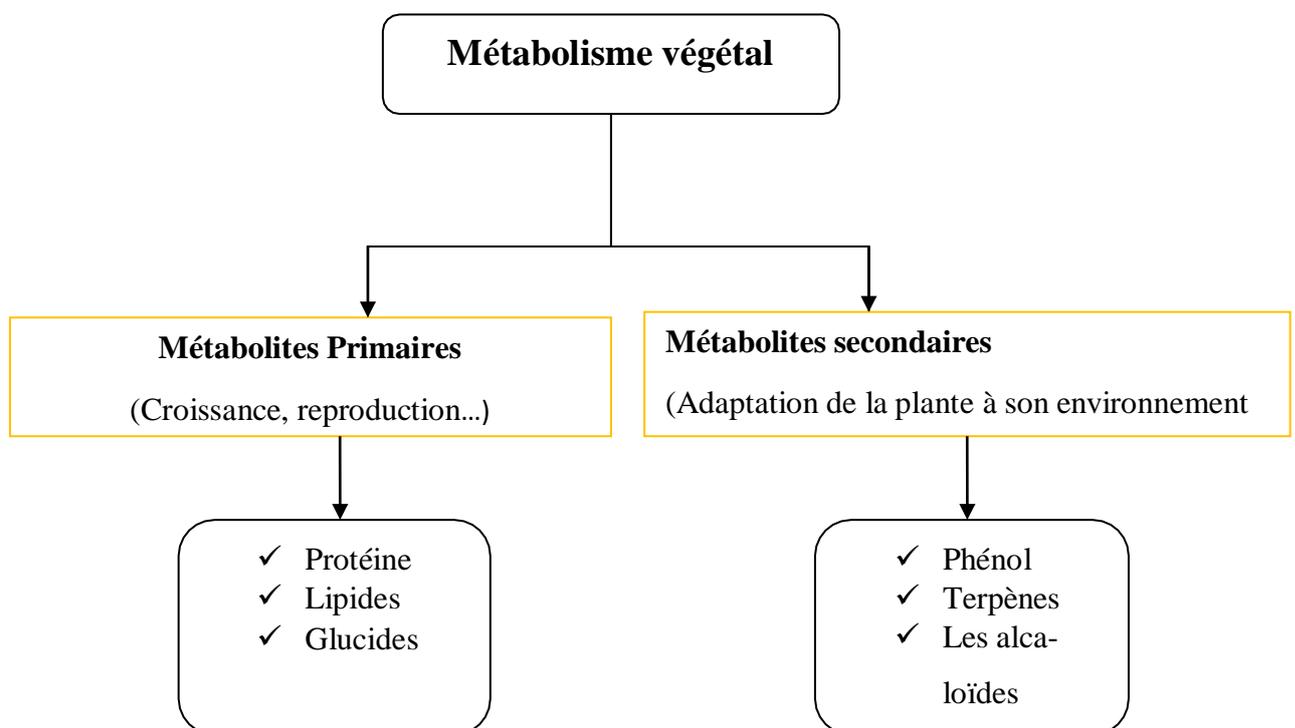


Figure I.4 : Schéma global qui résume le métabolisme végétal

I.3.3. Les composés phénoliques

a. Définition

Les composés phénoliques(ou polyphénols) sont une vaste classe de substance organique cyclique très variés, d'origine secondaire qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzén [46].Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits, et l'écorce. La couleur et l'arome, ou l'astringence des plantes dépendant de la concentration et des transformations des phénols. Ces composés représentent 2 à 3 % de la matière organique des plantes et dans certains cas

jusqu'à 10% et même d'avantage. Dans la nature, ces composés sont généralement dans l'état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins). [47]

Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes [48]. Plusieurs classes de composés polyphénoliques sont définies selon le squelette de base (tableau 2) .

Tableau I.2 : les différentes classes des composés phénoliques. [49]

Squelette carbonée	Classes de composés phénoliques
C ₆	Phénols simples et benzoquinones
C ₆ -C ₁	Acides phénoliques
C ₆ -C ₂	Acétophénones et les acides phenylacétiques
C ₆ -C ₃	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes, chromons
C ₆ -C ₄	Naphthoquinones
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthomes
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbénes et anthraquinones
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes et isoflaconoides
(C ₆ -C ₁) ₂	Tannin hydrolysables
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes et néolignanes
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Bi flavonoïdes
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines
(C ₆) _n	Catéchols
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tannins condensés

b. structure chimique de polyphénols

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques. L'élément fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique(Aromatique), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (**Figure I.5**), libre ou Engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside [50]. Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de

30000 daltons, comme les tanins [51].

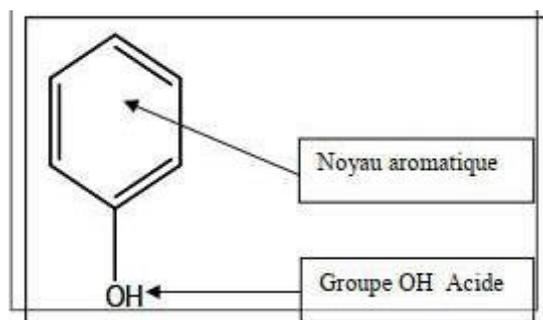


Figure I.5: Squelette de base des polyphénols

I.3.3.1. Les flavonoïdes

a) définition les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux, qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels du règne végétal [52], qui sont caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des plusieurs polyphénols.

Actuellement, plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autre à découvrir, puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupement hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyle et isoprényl [53]

b) structure chimique de flavonoïde

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de 15 atomes de carbone constitué de deux cycles aromatique (A) et (B) qui sont reliés entre eux par la une chaîne en C3 formant ainsi l'hétérocycle (C)[54]

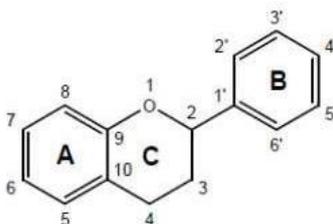


Figure I.6 : Squelette de base d'un flavonoïde [55]

c) Classification

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base [9].

Les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes dont les plus importantes sont : Flavone, flavonol, flavanone, chalcone, flavandiols, flavanol, antocyanidin, isoflavone, neoflavonoids (**figure I.7**).

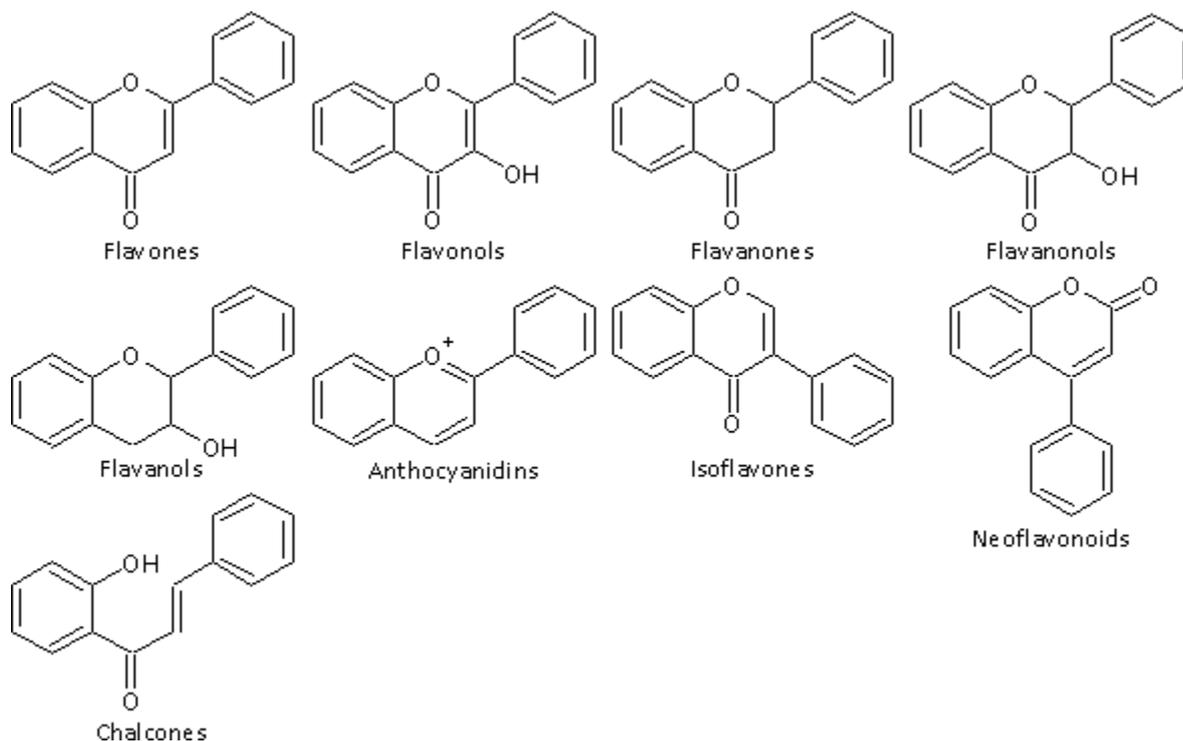


figure I.7 : Quelques structures de base des flavonoïdes. [56]

d) Rôles des flavonoïdes dans la plantes

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Par leur goût désagréable, les flavonoïdes peuvent jouer un rôle de protection des plantes en repoussant certains insectes [9]. Certain flavonoïdes jouent un rôle de lutte contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries [9]. Ces composés phénoliques jouent un rôle très important dans la croissance des plantes, la floraison, la fructification et la défense contre les maladies et les micro-organismes. Ils ont également un rôle très important pour la santé humaine. A titre d'exemple, ils sont efficaces contre l'inflammation chronique, les maladies allergiques, les maladies coronariennes et le cancer [52].

I.3.3.2. Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines, on distingue deux groupes de tannins différents : les tannins hydrolysables et les tannins condensés [57].

I.3.3.2.1. Tannins hydrolysables

Ils sont constitués par une molécule de sucre (le glucose le plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés (acide ellagique, chébulique ou valonique). Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique. [58]

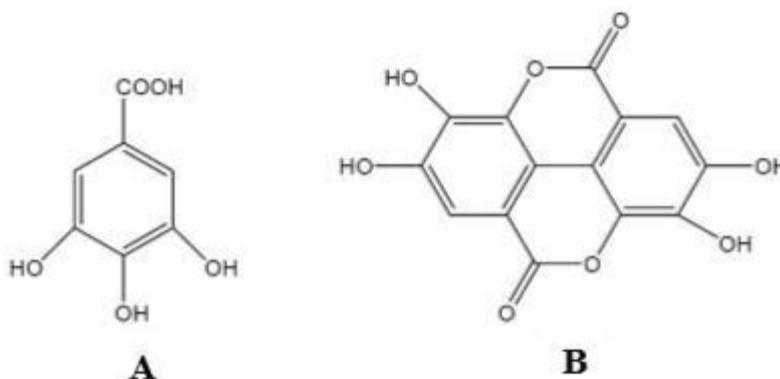


Figure I.8: (A) Structure chimique d'acide gallique, (B) acide ellagique [57]

I.3.3.2.2. Tanins condensés:

Ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ols (catéchines) et flavan-3,4-diols (leuco anthocyanidines). Ils sont aussi désignés aussi sous le nom de « tanins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides. [58]

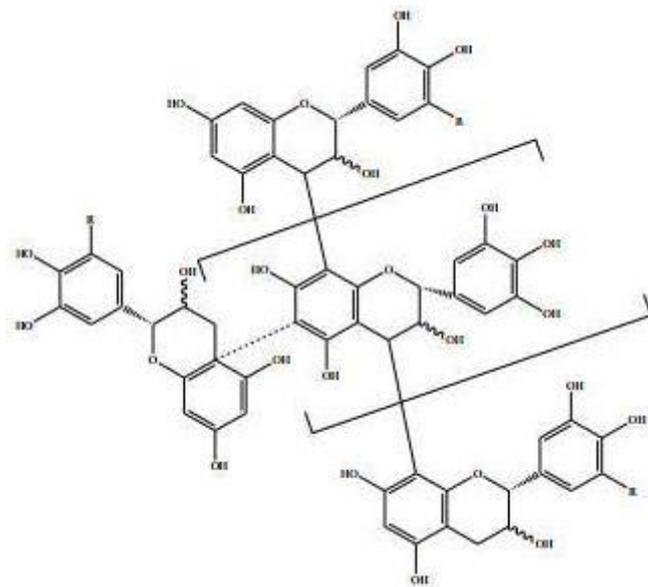


Figure I.9: Exemple des tanins condensés. [58]

I.3.3.3. Les Terpénoides

Ils constituent sans doute le plus vaste ensemble connu des métabolites secondaires des végétaux. Ce sont des molécules polyphénols qu'on retrouve également dans le règne animal. Les terpènes sont subdivisés, selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporés dans leurs structures, en monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30) [20].

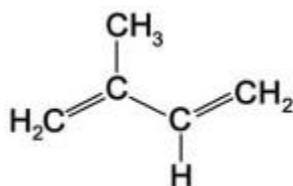


Figure I.10 : Structure de l'unité isoprène [59]

I.3.3.4. Les composés azotés dérivés des acides aminés (Alcaloïdes)

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène, du point de vue structure, propriétés chimiques et effets biologiques qu'ils manifestent. Ce sont des composés azotés, basiques qui précipitent avec des réactifs iodométriques tels que les réactifs de Mayer, Dragendorff. Ils peuvent être présents dans tous les organes de la plante [60]. Dans les plantes, les alcaloïdes

en tant que composés du métabolisme secondaire jouent un rôle écologique de défense contre les herbivores.

Les alcaloïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes, parmi lesquels nous pouvons citer : les phénylalanines ; les alcaloïdes isoquinoléiques ; les alcaloïdes quinoléiques ; les alcaloïdes pyridiques et pipéridiques ; les alcaloïdes dérivés du tropane et les alcaloïdes stéroïdes [61]. Ils trouvent cependant plusieurs applications pharmaceutiques chez l'homme, comme anti tumoraux ; Antalgiques ; Spasmolytiques et Antitussifs [61].

Partie 04 : Les huiles essentielles

I.4.1. Définition

Plusieurs définitions sont disponibles des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont généralement des mélanges des principes volatils contenus dans les végétaux [62]. Se sont des produits obtenus à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche.

Les huiles essentielles (HE) sont des extraits végétaux volatiles et odorants appelés également substances organiques aromatiques liquides, qu'on trouve naturellement dans diverses parties des arbres, des plantes et des épices, elles sont volatiles et sensibles à l'effet de la chaleur, elles ne contiennent pas de corps gras [63].

Les HE trouvent des emplois dans des secteurs assez divers, principalement en parfumerie, en cosmétique et font aussi l'objet d'une consommation importante de la part de l'industrie agroalimentaire où elles sont appréciées pour leurs propriétés organoleptiques. Les méthodes d'extraction des HE obéissent à des normes comme celle de l'AFNOR NF 75-006 qui précise que seul l'entraînement à la vapeur, les procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus et la distillation à sec peuvent produire une huile essentielle [64].

Elles peuvent être stockées, dans tous les organes végétaux : fleurs, feuilles, écorces, racines, graines. Elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes, la composition pouvant varier d'un organe à l'autre (9).

I.4.2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'HE représente de 0,1 à 3% du poids sec des plantes aromatiques. Une grande variété de méthode d'extraction est utilisée commercialement pour isoler les HE à partir du matériel végétal.[65]

L'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation constituent les procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens.[66]

I.4.2.1. Entraînement à la vapeur d'eau

Il existe trois méthodes de distillation qui repose sur le principe d'entraînement des constituants volatils du matériel végétal par la vapeur d'eau : l'hydrodistillation, la distillation à la vapeur saturée et l'Hydrodiffusion.

La différence entre ces trois modes réside dans le degré de contact entre l'eau liquide et le matériel végétal. [67]

I.4.2.1.1. Hydrodistillation simple

La méthode par l'hydrodistillation est traditionnellement la plus couramment utilisée (environ 80% des cas) car elle est la plus économique. Elle consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic remplis d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. [67]

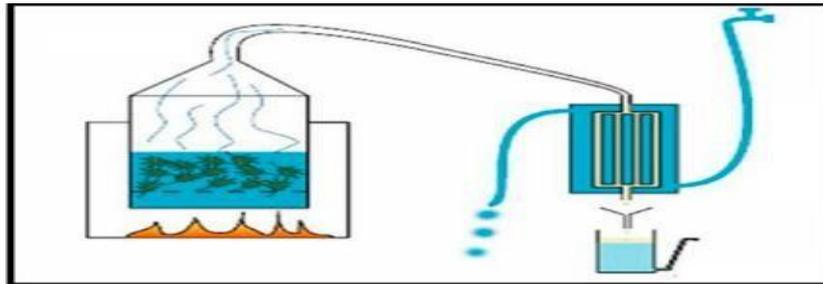


Figure I.12 : l'hydrodistillation simple [68]

I.4.2.1.2. Distillation à vapeur saturée [67]

L'entraînement à la vapeur d'eau pure est le procédé qui donne les meilleures garanties de qualité.

Dans ce procédé, le végétal n'est pas en contact avec l'eau : la vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées

La vapeur fait éclater les cellules à essence. Les molécules aromatiques sont captées par la vapeur qui se charge de molécules volatiles. A la sortie de la cuve, la vapeur s'est combinée aux HE. La condensation et le refroidissement s'effectuent dans un serpentin.

A la sortie du serpentin, un essencier recueille la vapeur refroidie et revenue à l'état d'eau et l'HE. La différence de densité entre les deux liquides facilite la séparation de cette dernière qui, à quelque exception près, est plus légère que l'eau

L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile.

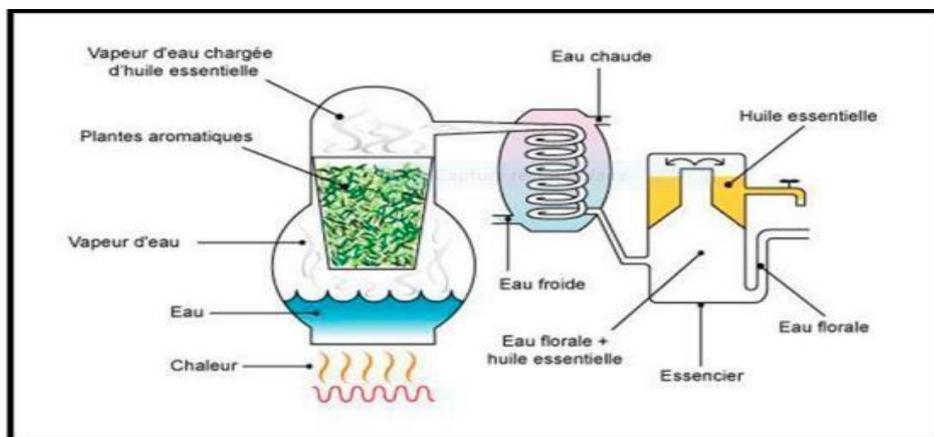


Figure I.13 : Distillation à vapeur saturée[69]

I.4.2.1.3. Hydro diffusion

L'hydro diffusion consiste à pulser de la vapeur d'eau à très faible pression à travers la masse végétale, du haut vers le bas. La condensation du mélange de vapeur contenant l'huile se produit sous la grille retenant la matière végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils. De plus, l'hydrodiffusion permet une économie d'énergie due à la réduction de la durée de la distillation et donc à la réduction de la consommation de vapeur [68]

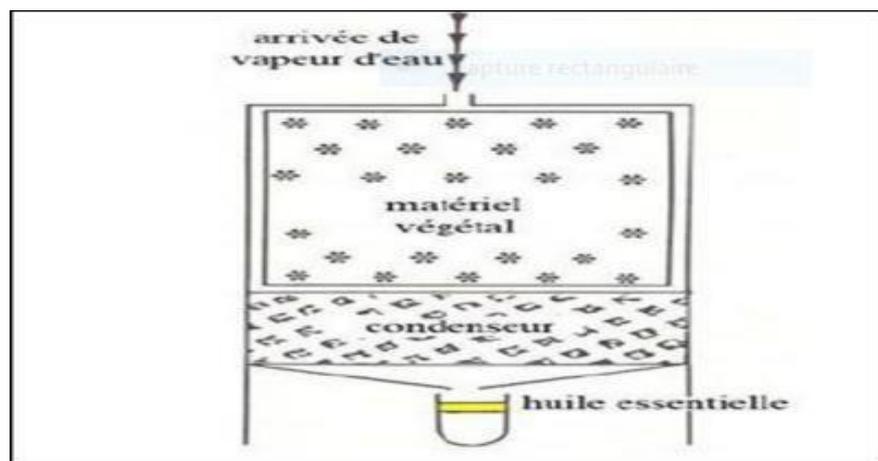


Figure I.14 : l'hydro diffusion [68]

I.4.3. Rôle des HE dans les plantes

Les huiles essentielles jouent un rôle important dans les plantes : ils sont sécrétés en réaction à l'environnement, en tant que moyen de protection (inhibition de la germination en hiver par exemple, le déclenchement de la floraison ou la protection contre les parasites, les insectes ou herbivore) ou pour aider en attirant pollinisation certains insectes interviennent également sur les conditions de pluviosité pour lutter contre la sécheresse [70,71]

I.4.4. Principaux domaines d'application [67]

En raison de leurs diverses propriétés, les HE sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie par leur pouvoirs antiseptique, analgésique, antispasmodique, apéritif,

antidiabétique..., en alimentation par leur activité antioxydante et leur effet aromatisant, en parfumerie et en cosmétique par leur propriété odoriférante.

I.4.4.1. Aromathérapie

L'aromathérapie est une forme de médecine alternative dans laquelle les HE ont une grande importance car elles induisent de nombreux effets curatifs. Ainsi elles s'utilisent de plus dans diverses spécialités médicales telles que : la podologie, l'acupuncture, masso-kinésithérapie, l'ostéopathie, la rhumatologie ainsi que dans l'esthétique.

I.4.4.2. Agro-alimentaire

En vertu de leurs propriétés antiseptiques et aromatisants, les HE sont employées quotidiennement dans les préparations culinaires (ail, laurier, thym...). Elles sont également très prisées en liquoristerie (boisson anisées, kummel) et en confiserie (bonbons, chocolat...). Leur pouvoir antioxydant leur permet de conserver les aliments en évitant les moisissures, conservation du smen par exemple par le thym et le romarin.

I.4.4.3. Cosmétologie et parfumerie

Les HE sont recherchés dans l'industrie des parfums et des cosmétiques en raison de leurs propriétés odoriférantes. L'industrie de la parfumerie consomme d'importants tonnages d'essences (60%) en particulier celles de rose, de jasmin, de violette, de verveine,...Les HE sont aussi consommées en cosmétologie pour parfumer les produits cosmétique : les dentifrices, les shampoings, les crèmes solaires, les rouges à lèvres, les savons, ect...

Les produits d'hygiène, détergents et lessives par exemple, consomment eux aussi beaucoup d'HE pour masquer les odeurs (souvent peu agréables) des produits purs.

I.4.4.4. Pharmacie

Les essences issues de plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion (menthe, verveine, thym,..) et sous la forme de préparations galéniques. Plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes, par exemple gastralgie est un digestif antiacide qui se compose d'HE de carvi.

De même, elles permettent par leurs propriétés aromatisants de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale. Aussi beaucoup de médicaments vendus en pharmacie sont à base d'HE comme par exemple les collyres, les crèmes, les élixirs,...

I.4.5. L'huile essentielle du thym

L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles essentielles les plus actives. Les huiles essentielles de thym sont composées par des molécules aromatiques d'origine végétale présentant une très grande diversité de structure.

La variabilité chimique des huiles essentielles de thym dépend de plusieurs facteurs, qui sont généralement d'ordres climatiques et environnementaux mais, qui peuvent être aussi d'ordre génétique et saisonnier (stade végétale). Ainsi, une étude menée par **Dob et al.(2006)** sur les thymus d'Afrique du Nord a montré que le composé majoritaire est le thymol chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le carvacrol chez les espèces de Tunisie[9].

I.4.5.1. Thymol

Le thymol est l'un des principaux phénols reconnus dans l'huile essentielle de quelques lamiacées comme le thym, l'origan et la sarriette, dont le contenu peut atteindre jusqu'à 84%. Le thymol a été découvert par **Caspar Neumann** en 1719 et épuré en 1853 par **M. Lallemant** qui lui a donné le nom « thymol » et lui a attribué la formule chimique (C₁₀H₁₄O). Le thymol est un phénol (2-isopropyl-5-méthyl-phénol) et est isométrique avec le carvacrol[72]

Le thymol existe dans l'huile de thym et est lié à d'autres hydrocarbures d'une plus grande volatilité comme le p-cymène (C₁₀H₁₄) et le thymène (C₁₀H₁₆) [73].

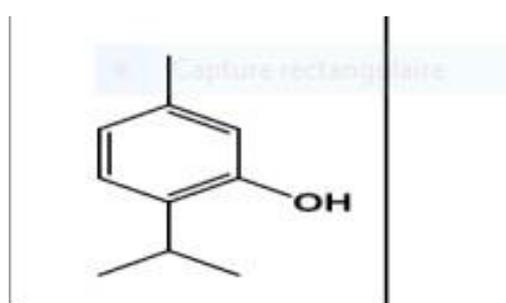


Figure I.15 : Structure chimique du thymol [74]

Plusieurs études ont montré que le thymol possède de nombreuses activités biologiques, telles que l'activité antispasmodique, antimicrobienne, fongicide, insecticide, antioxydant anti-cancérigène et anti-inflammatoire(9).

I.4.5.2. Carvacrol

Le carvacrol (5-isopropyl-2-méthylphénol ; poids moléculaire 150,21) est également un phénol monoterpénoïde présent dans l'huile essentielle de thymus vulgaris et de nombreuses autres herbes aromatiques et épices. Pour le carvacrol, de nombreux effets biologiques sont rapportés, notamment des propriétés antithrombotiques, anti-inflammatoires, antimicrobiennes et inhibitrices de l'acétylcholinestérase (9).

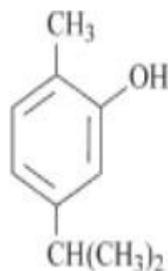


Figure I.16 : Structure chimique du carvacrol (77).

I.4.6. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances sensibles et très délicates, ce qui rend leur conservation difficile et obligatoire dans le but de limiter les risques de dégradation, ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons opaques à l'abri de la chaleur et de la lumière [8].

Chapitre II :
Stress oxydatif et microencapsulation

Partie 1 : radicaux libre et stress oxydatif

II.1.1. les radicaux libres (les oxydants)

II.1.1.1. Histoire des radicaux libre

Gerschaman et al. Indiquaient au milieu des années 50 que l'oxygène est indispensable à la vie, il est aussi toxique pour l'organisme [76]. S'inspirant de ses travaux, Harman propose la « théorie radical du vieillissement » [77] via la production de radicaux libre (entité chimique très instable et réactives suite à la présence d'un électron libre dans leur structure). L'oxygène est à l'origine du processus du vieillissement cellulaire.

Pour l'histoire du stress oxydant, les américains Mc Cord et Fridovich séparaient, en 1969, à partir des globules rouges humaines, un système enzymatique antioxydant : le superoxyde dismutase (SOD), qui élimine le radical libre anion superoxyde produit par réduction univalente de l'oxygène. Cette découverte fondamentale montre indirectement que les radicaux libres sont produits dans notre corps. Ceci est donc le point de départ de recherches sur les sources de production de l'anion superoxyde et sur ses rôles pathologique et physiologique [78].

Vers la fin des années 1980, d'autres méthodes plus nécessaires pour l'évaluation des dommages oxydatifs sont apparus au niveau des lipides ; de l'ADN ou des protéines. En utilisant toutes ces méthodes, l'efficacité scientifique des molécules antioxydants peut ensuite être testée in vivo dans divers modèles de stress oxydatif, chez l'animal et chez l'homme [79].

II.1.1.2. Définition des radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés [80], cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre[81].

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux secondaires, qui se forment suite à une réaction des radicaux primaires avec les composés biochimiques de la cellule [82].

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé « espèces réactives de l'oxygène » (ERO). Cette appellation n'est pas restrictive ; elle inclut les radicaux libres de

II.1.1.3. Origine des radicaux libres

Toutefois, au contact entre l’oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d’anions super oxydés se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l’organisme l’oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l’oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450.

L’inflammation par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d’un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l’activation du complexe de la NADPH oxydase.

Les métaux toxique (chrome, cuivre, vanadium), mais aussi le cuivre et le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l’espèce peu réactives H_2O_2 , par une réaction appelée réaction de Fenton .

Les rayonnements UV sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres [2].

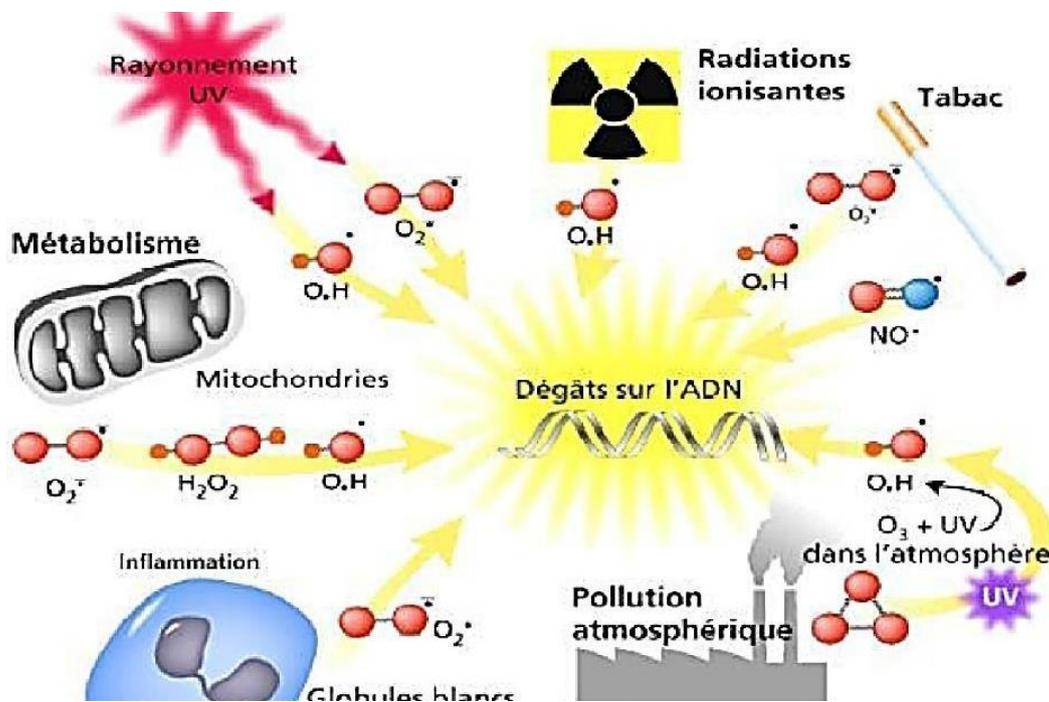


Figure II. 2 : principales sources des radicaux libres [84]

II.1.1.4. Phase de l’oxydation :

Traditionnellement, on décrit l'oxydation en trois phases distinctes, mais pratiquement simultanées [85]

a) Initiation (formations d'hydroperoxydes)

L'oxygène n'oxyde pas directement les molécules, le mécanisme réactionnel initial peut être initié par la chaleur, les UV ou les ions métalliques. De même, l'oxygène triplet, stable, peut être activé en oxygène singulet, réactif, par l'intermédiaire d'une photo sensibilisateur. La phase d'initiation aboutit donc à la formation d'espèces très réactives

b) Propagation

- Destruction des hydroperoxydes et apparition des composés responsables des goûts et odeur de rance.
- La liaison O-O dans un hydroperoxyde est faible et peut être facilement rompue.
- Les deux dernières réactions sont en boucles, ce qui explique que des traces d'ions métalliques suffisent à générer une grande quantité de radicaux libres.
- Les espèces radicalaires produites par les premières réactions sont hautement réactives et vont à leur tour arracher un hydrogène à une autre molécule ou réagir avec un oxygène triplet.

c) Terminaison (arrêt)

- Apparition de nouvelles espèces moléculaires anarchiques
- La chaîne de propagation peut s'arrêter par la formation de polymères ou au contact avec un autre radical. Les molécules créées n'ont plus de fonction biologique.

II.1.2. Stress oxydatif

II.1.2.1. Définition du stress oxydatif

De petites quantités de dérivés réactifs de l'oxygène seront produites par le métabolisme cellulaire en continu. Cette production est fortement élevée dans certaines situations entraînent un stress oxydatif, qui sera défini comme un déséquilibre entre la production et la destruction de ces molécules. A cause de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme, les dérivés réactifs de l'oxygène ont été impliqués dans un nombre important de pathologies. La production de dérivés réactifs de l'oxygène augmente en réponse à toute attaque infectieuse, le développement d'un stress oxydatif incontrôlé a été proposé comme l'un des facteurs secondaires contribuant au mauvais pronostic de ces pathologies [86].

II.1.2.2. Conséquences biochimiques du stress oxydatif

Les ERO qui interagissent avec une variété de substrats biologiques importants sont toxiques. Des dénaturations de protéines, des inactivations d'enzymes, une oxydation du glucose, des ruptures d'ADN et des processus de peroxydation lipidiques peuvent alors apparaître avec des conséquences souvent irréversibles pour la cellule [87].

a) Effets sur les protéines

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des radicaux libres. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus, pour conséquence, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes. Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire [79].

b) Effets sur les acides gras

Les scientifiques développent de multiples expériences in vitro dans le sillage de la découverte de la SOD, qui montrent la toxicité des radicaux libres responsables de dommages cellulaires importants, via le déclenchement de ruptures et de mutations au sein de l'ADN, l'inactivation de diverses enzymes, la modification des structures protéiques ; l'oxydation des sucres et induction de peroxydation lipidique [79].

Le test TBARS (thiobarbiturique réactive substances) a été développé au milieu des années 70, pour la détection du processus de peroxydation lipidique [79] qui est un processus complexe et une large gamme de produits formés en quantités variables [88]. Les cibles préférées des ERO sont les lipides et, plus spécifiquement, les acides gras polyinsaturés. Une fois formés, les lipides oxydés donnent naissance à des sous-produits tels que le malinaldéhyde, le 4-hydroxynonanal, les lipofuschines (pigment d'âge) ou le pentane [89]. La méthode TBARS mesure par colorimétrie le produit de la réaction de l'acide thiobarbiturique avec le malondialdéhyde (MDA), un sous-produit des lipides oxydés. Cependant, le grand nombre d'artefacts associés à la technique la rend peu fiable [89].

c) Effets sur les glucides

Les radicaux peuvent oxyder les monosaccharides, mais ils peuvent également réagir avec des polysaccharides et induire leur dépolymérisation [90]. Le radical OH est capable de couper les molécules de sucre (désoxyribose, mannose, glucose) et de susciter ainsi des liaisons entre sucres et protéines provoquant des épaissements membranaires. La cataracte diabétique serait une conséquence de cette liaison. Les radicaux de l'oxygène provoquent aussi une fragmentation des polymères comme l'acide hyaluronique, glycosaminoglycane constitué de répétitions d'unités d'acide glucuronique-N-acetylglucosamine et qui maintient la viscosité élevée du liquide synovial. Cependant, dans la polyarthrite rhumatoïde ; il est dépolymérisé ; sous l'effet des ERO générés par les neutrophiles [91].

d) Effets sur l'ADN

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des ERO. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. L'atteinte de l'ADN implique le franchissement préalable de toutes les barrières de défense mises en place par les végétaux, la potentialité de détoxification des cellules ou de l'organisme et enfin du potentiel des systèmes de réparation de l'ADN de l'organisme. Plusieurs altérations ont été observées : [92]

- ✓ Une formation des bases oxydées.
- ✓ Des sites abasiques qui sont une partie de l'ADN dépourvue d'une base purique ou pyrimidique et ayant perdu l'information génétique par rupture de la liaison entre une base et le désoxyribose.
- ✓ Des cassures au niveau des brins d'ADN.
- ✓ Des pontages « ADN-protéines », les lésions au niveau de l'ADN peuvent également provoquer des aberrations chromosomiques, c'est-à-dire un nombre ou une structure anormale des chromosomes.

II.1.2.3. Les moyens de défense contre le stress oxydatif

Le corps dispose d'un ensemble complexe de défense antioxydants pour se protéger effets nocifs de l'ERO. Il existe deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque, l'autre est endogène comprend des enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase), des protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine) et des systèmes de réparation des dommages oxydatifs tels que

les endonucléases. A cela s'ajoutent des oligo-éléments tels que le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des facteurs d'enzymes antioxydantes [93].

II.1.2.3.1. Moyens de défense endogène

1) Le superoxyde dismutase (SOD)

Ces métalloprotéines, qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, assurent l'élimination de l'anion super-oxyde $O_2^{\circ-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Chez l'homme, on décrit 3 isoenzymes : la Cu/Zn-SOD₁ cytosolique, la Mn-SOD₂ mitochondriale et la Cu/Zn-SOD₃ [79].

Superoxyde dismutase



2) Catalase :

La catalase est l'une des principales enzymes du système antioxydant biologique. Elle joue un rôle important dans les voies de défense antioxydantes. Le site actif de la catalase est l'hémoglobine, et il agit en tant que catalyseur dans la décomposition de H_2O_2 en eau et oxygène moléculaire [95].

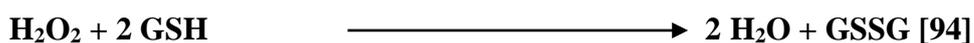
Catalase



3) Glutathion peroxydases (GPxs)

La glutathion peroxydase est une enzyme qui constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable non seulement de détoxifier le peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultant de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras, la glutathion peroxydase se trouve dans le cytoplasme et dans les mitochondries, elle nécessite la présence de deux cofacteurs importants : le glutathion réduit et le sélénium [81].

Glutathion peroxydase



4) Le cuivre

A concentration physiologique, le cuivre est un cofacteur d'enzymes tels que la SOD, le cytochrome C oxydase, la dopamine β -hydroxylase. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle essentiel dans le déclenchement des réactions pour produire les ERO (réactions de Fenton) et peut lorsqu'il est à haute concentration de

devenir pro-oxydant. L'apport journalier recommandé est d'environ 2,5 mg. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle, le foie de veau [96].

5) Le zinc

Le zinc intervient en tant que cofacteur enzymatique au niveau de la plupart des métabolismes, il contribue à la stabilisation des membranes lipidiques, les tissus en formation étant particulièrement sensibles au stress oxydatif. Il se concentre dans les muscles et les os, mais un apport quotidien est indispensable car l'organisme ne parvient pas à le stocker comme le sélénium, cet oligo-élément est un constituant indispensable à la synthèse d'un antioxydant enzymatique (le superoxyde dismutase) [2] Les viandes, poissons et fruits de mer contiennent des quantités importantes de zinc. Il est également présent dans les œufs, les fruits et légumes secs [2].

6) Sélénium

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases séléno-dépendantes (constituant indispensable des glutathion-peroxydases), et l'activité biologique antiradicalaire des séléno-protéines [97]

Les sources de sélénium sont les fruits de mer, les abats, les volailles, et les noix du Brésil. Les végétaux en contiennent également ; mais les teneurs sont très variables en fonction du sol dans lequel ils ont été cultivés [97].

II.1.2.3.2. Moyens de défense exogène

a) Vitamine E

La vitamine E ou α -tocophérol, est un antioxydant liposoluble, elle se localise entre les chaînes d'acides gras des phospholipides qui constituent les membranes et les lipoprotéines, le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidique RO_2 qui propagent les chaînes de peroxydation [98].

Les huiles végétales sont les plus riches en vitamine E. les noisettes et les légumes verts à feuilles (salades, épinards...) sont également de bonnes sources de vitamine E. Cet antioxydant résiste à la chaleur [99].

b) Vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble ; l'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles OH, mais aussi avec les radicaux superoxydes O₂ [98]. Ses principales fonctions sont la contribution au fonctionnement du système immunitaire, l'implication dans la synthèse du collagène et des globules rouge, la protection des composés situés dans les compartiments cellulaires et tissulaires hydrosolubles et la participation dans les mécanismes liés à la métabolisation du fer [100].

Cette vitamine est particulièrement sensible à la chaleur, à la lumière, et elle est soluble dans l'eau. Elle est présente dans tous les fruits et les légumes frais, et particulièrement dans l'acérola, les agrumes, le poivron rouge...etc. [101].

II.1.3. Les antioxydants

Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydant en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant [102].

Les antioxydants sont l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces en les piégeant pour former un composé stable, en séquestrant le fer libre ou en générant du glutathion [2]. On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule.

II.1.3.1. Classification

Les antioxydants sont un groupe hétérogène composé de systèmes antioxydants endogènes enzymatiques ou non, des vitamines, d'oligo-éléments ou encore de polyphénols) [103]. Classiquement, on répertorie les antioxydants selon leur origine (**figure II. 3**), les antioxydants endogènes de type enzymatique sont plutôt impliqués dans la neutralisation des (ERO) alors que les antioxydants non enzymatiques et ceux d'origine exogène sont des donneurs de proton ou d'électron [104]

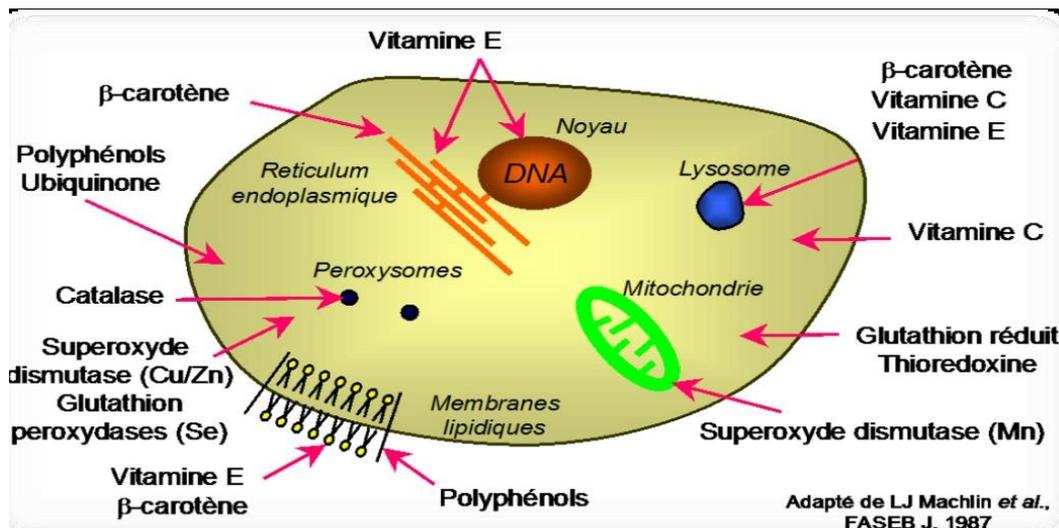


Figure II. 3 : Schéma des molécules intervenant dans les protections cellulaires [105]

a) Les antioxydants enzymatiques

Les cellules possèdent des enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très important car les enzymes ont la capacité de fonctionner en permanence. Cette ligne de défense est constituée d'enzymes ou protéines antioxydantes de superoxyde dismutase (SOD) de catalase, et de glutathion peroxydase, [106] (le zinc, le sélénium et le manganèse) qui interviennent comme cofacteurs d'enzymes indispensables dans la lutte contre les radicaux libre [107].

Elles sont présentes en permanence dans l'organisme mais leur quantité diminue avec l'âge.

b) Les antioxydants non enzymatiques

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer : le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque.

D'autres substances exogènes apportées par l'alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), ou les caroténoïdes, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l'électron non apparié, les transformant ainsi en molécules ou ions stables. D'autres composés tels que les huiles essentielles, les alcaloïdes, les polyphénols, les phytates et les flavonoïdes, apportés par l'alimentation, jouent un rôle similaire de piègeurs de radicaux libres [108 ; 109].

c) Les antioxydants d'origine végétale

Les caroténoïdes et les polyphénols constituent de vastes familles de composés (plusieurs centaines) parmi les quels se trouvent le β -carotène, l'acide caféique et la quercétine. Les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement de bons capteurs de radicaux hydroxyles OH et peroxydes RO₂. Ils sont donc susceptibles d'inhiber les chaînes de peroxydation lipidiques, mais d'une manière moins efficace que celle de l' α -tocophérol. En outre, les caroténoïdes ont un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet O₂, ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire [98].

d) Les antioxydants synthétiques

Il s'agit du butylhydroxytoluène (BHT) et des esters de l'acide gallique : gallate de propylée, gallate doctyle, et de dodécyle. Le BHT est un antioxydant de rupture de chaîne, très efficace et peu coûteux. Le BHA est un mélange de deux isomères de position dont l'efficacité est un peu inférieure à celle du BHT.

Il existe d'autres antioxydants synthétiques peu utilisés tels que la TBHQ (tertiobutylhydroquinone) utilisée pour la conservation des huiles brutes, l'acide nordihydrogualarétique (NDGA). Ce dernier est utilisé dans les produits à usage topique et le 4-hydroxyméthyl 2,6-ditertiobutylphénol ou Inox 100, dont les propriétés antioxydantes sont voisines de celles du BHT [110].

Partie 2 : microencapsulation

II.2.1. Définition d'un médicament

Un médicament est une substance utilisée pour prévenir, soulager ou guérir une maladie ou ses symptômes [111]

Toute substance ou composition qui présente des propriétés thérapeutiques ou prophylactiques pour une maladie humaine ou animale, et toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou l'animal, ou pouvant être administrée pour établir un diagnostic médical ou en exerçant des propriétés pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques ayant pour fonction de restaurer, corriger ou altérer sa fonction physiologique.[112]

II.2.2. Mise en forme d'un médicament

Un médicament se compose de principe(s) actif(s), d'excipient(s), l'ensemble étant contenu dans un récipient. [113]

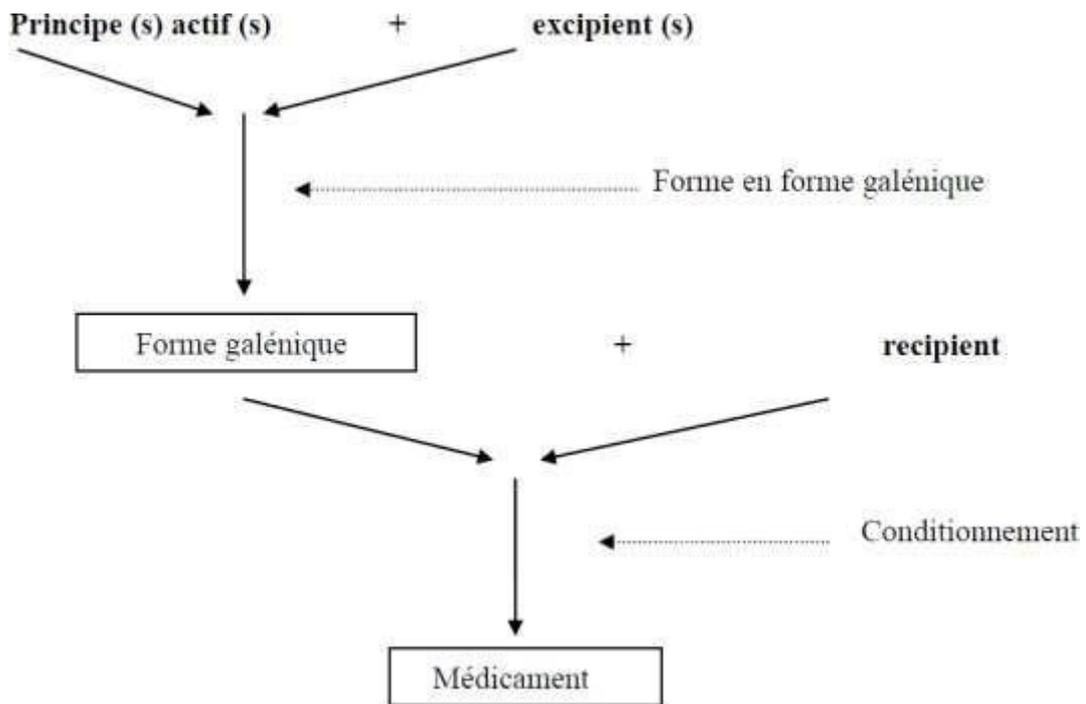


Figure II.4. Mise en forme d'un médicament.

II.2.3. Formes galéniques des médicaments :

Une formulation galénique est une forme distincte dans laquelle sont placés le principe actif et les excipients (substances inactives) pour constituer le médicament. Il correspond à l'aspect physique final du médicament qui sera utilisé chez le patient : comprimé, gélule, sachet, solution buvable, suspension injectable, etc.

En fonction des excipients appropriés, la forme pharmaceutique est généralement choisie pour que les principes actifs atteignent le plus facilement et le plus rapidement l'organe ou la zone du corps auxquels ils sont destinés, tout comme elle peut également adapter le médicament aux contraintes spécifiques d'un patient. [114]

Les différentes formes galéniques les plus courantes sont résumées dans la **Figure II.5.** et le tableau **II.2.**



Figure II.5 : Les formes galéniques

Tableau II.2 : Les formes galéniques les plus courantes.

Voies	Forme principales
Orale	Comprimés, gélules, solution ou suspensions aqueuses
Parentérale	Solution aqueuses
Rectale	Suppositoires
Vaginale	Comprimés, solution aqueuses
Ophtalmique	Solution aqueuses
ORL	Solution aqueuses pulvérisées ou non
Percutanée	Pommades et solutions

II.2.4. La microencapsulation

II.2.4.1. Historique

La fabrication de microcapsules colorantes pour le papier carbone sans carbone (le papier autocopiant) fut la première application industrielle des microparticules en 1950 dans le domaine de l'imprimerie [115]. Cette fabrication a été réalisée par coacervation complexe entre la gélatine et la gomme arabique.

Depuis, la microencapsulation a intéressé de domaine pharmaceutique où elle fut utilisée pour le masquage du goût et de l'odeur des médicaments administrés par voie orale et la libération contrôlée des principes actifs au cours de la digestion, ainsi que pour d'autres applications industrielles telles que les colles [116]

Elle s'applique également à de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, l'agrochimie, les cosmétiques, le textile, l'environnement..., etc. [117].

L'augmentation du nombre d'applications de la microencapsulation depuis les années 1950 a engendré une intensification des recherches concernant une variété de substances encapsulées par diverses techniques de synthèses de microcapsules. Ces investigations ont également permis d'obtenir des microcapsules de plus petites, atteignant ainsi l'ordre de quelques nanomètres [118]

II.2.4.2. Définition

La microencapsulation peut être définie comme l'association d'un ensemble de technologies, qui permettent de produire des microparticules individualisées présentant une taille comprise entre environ 1 μ m et 1000 μ m et contiennent un matériau enrobant enfermant entre 5 et 90% (en masse) de matière active [4].

La substance encapsulée peut se présenter sous forme d'un liquide, d'un composé gazeux, ou de fines particules solides.

II.2.4.3. Classification des microparticules :

Le type de particules obtenues par microencapsulation dépend des propriétés physico-chimiques de la matière active et de la matière enrobant, de leur composition et de la technique utilisée, on retrouve deux types de microparticules (**Figure II.6.**) qui diffèrent par leur morphologie [4].

- **Les microcapsules** : sont des particules réservoirs constituées d'un cœur dans lequel se trouve la matière active, qui peut être sous forme liquide ou solide entourée par une enveloppe formée par l'agent encapsulant [4].
- **Les microsphères** : sont des particules présentées sous une structure matricielle. Elles sont constituées d'un réseau polymère dans lequel se trouve finement dispersée la matière active à l'état de fines particules solides ou de gouttelettes de solutions [4].

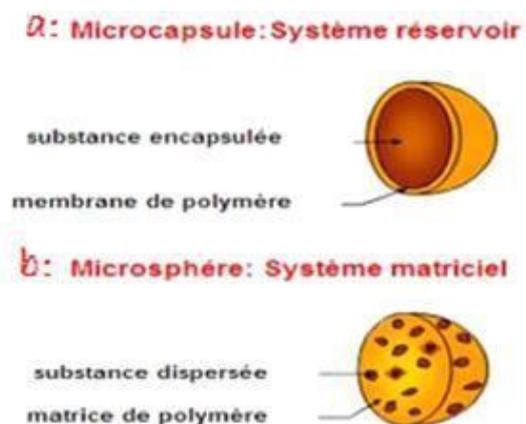


Figure II.6 : Représentation schématique d'une microcapsule et d'une microsphère [119].

II.2.4.4. Intérêt de la microencapsulation

Les microparticules peuvent avoir différents rôles selon l'application pour laquelle sont conçues, elles assurent donc plusieurs fonctions telles que [4]:

- Masquage d'un goût ou d'une odeur.
- Améliore la présentation du produit.
- Réalisation d'une mise en forme adaptée.
- Protection et stabilisation d'une matière active dans une formulation.

Modification et maîtrise du profile de libération

II.2.4.5. Composition chimique des microparticules [120]:

Les constituants principaux d'une particule obtenue par microencapsulation sont la matière enrobant et la matière active. Des additifs peuvent être ajoutés pour améliorer la stabilité du système et/ou lui apporter des fonctionnalités désirées

➤ **Les matières actives** déterminent l'utilisation suivante des microparticules produites.

Elles sont d'origines très variées, elles peuvent être des :

- Principes actifs pour l'industrie pharmaceutique
- Principes actifs cosmétiques
- Vitamines, comme l'acide ascorbique (vitamine C), le β -carotène (vitamine A)-tocophérol (vitamine E)
- Additifs alimentaires
- Arômes, huiles essentielles et substances aromatisants volatiles
- Produits phytosanitaires, essences parfumées, micro-organismes, cellules, ou encore catalyseurs de réaction chimique.

➤ **Les matériaux enrobant** jouent un rôle principal sur l'efficacité et la stabilité des microparticules et permettent aussi de masquer l'odeur et la saveur de la substance active. Ils doivent avoir la capacité de former un film stable et compatible avec la molécule à encapsuler [120].

Parmi les matériaux qui ont été utilisés, on distingue :

✓ **Des polymères** qui peuvent être d'origine :

1. **Naturelle** : (gélatine, chitosane, alginate de sodium, agarose, pectine, l'amidon et les amidons modifiés, cellulose microcristalline...)
2. **Hémisynthétique** : (dérivés de la cellulose...) tels que l'éthylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, l'acetate-phatalate de cellulose...

3. Synthétique : Tels que les copolymères des acides lactique et glycolique, les copolymères acryliques et méthacryliques, le polycaprolactone...

La biocompatibilité, la biodégradabilité et le non toxicité sont des propriétés requises dans le domaine de l'application pharmaceutiques.

✓ **Des lipides et des cires minérales :** acides gras, alcools gras, glycérides, cholestérol, cires (d'abeille, de carnauba...), cires minérales.

D'autres matériaux peuvent être ajoutés à la formulation des microparticules tels que les tensioactifs, les dispersants, les antimottants, les cryoprotecteurs...

II.2.4.6. Applications de l'encapsulation

Les recherches dans le domaine de l'encapsulation se sont intensifiées afin de développer de nouvelles technologies et d'encapsuler divers composés. Actuellement, les applications de l'encapsulation sont très nombreuses (**Tableau II.3**) et généralisées à plusieurs secteurs d'activités, en partant de la chimie à l'agro-alimentaires et en passant par les secteurs pharmaceutiques, cosmétiques, l'agriculture, les textiles ou encore la peinture[121].

Tableau II.3 : Exemples de composés encapsulés selon leurs domaines d'application

Domaine industriel	Exemples de composés encapsulés
Pharmaceutique et médical	Antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins, bactéries, vitamines, minéraux, antigènes, anticorps...
Cosmétique	Parfums, huiles essentielles, anti transpirants, agents bronzants, crème solaires, colorants capillaires, baumes démêlants, mousses a raser...
Alimentaire	Huiles essentielles, graisses, épices, arômes, vitamines, minéraux, colorants, enzymes, levures, microorganismes...
Agriculture	Herbicides, insecticides, engrais, répulsifs, hormones végétales...
Biotechnologie	Enzymes immobilisées, microorganismes, cellules vivantes, cellules artificielles, cultures tissulaires, composés nutritionnels...
Chimie	Catalyseurs, enzymes, additifs pour plastiques, eau (plâtre et béton), inhibiteurs de corrosion, retardateurs d'incendie, colorants et pigments, agents UV protecteurs, parfums, huiles essentielles, agents lubrifiants...



Figure II.7 : Représentation statistique des domaines d'applications de la Microencapsulation [122].

II.2.4.7. Techniques d'encapsulation : [123]

Les procédés d'encapsulation sont généralement catégorisés dans trois classes :

- ✓ Procédés mécaniques.
- ✓ Procédés chimique.
- ✓ Procédés physico-chimiques.

II.2.4.7.1. Procédé mécanique

Le procédé mécanique de l'encapsulation repose sur la nébulisation de la formulation, ou l'enrobage de microparticules suspendant en lit fluidisé, ou l'extrusion du mélange de matière active et l'agent enrobant. La formulation des matières sera pulvérisée de sorte que la matière active soit encapsulée.

❖ Nébulisation/séchage [124]

Ce procédé permet de transformer une formulation liquide initiale en une microparticule sèche. La formulation liquide est composée d'une phase de matière active sous formes différentes (solution, émulsion, dispersion de particules solides) et une autre phase de la solution de l'agent enrobant. Il y a généralement quatre étapes essentielles dans ce procédé.

- ✓ Diffusion de la phase liquide (nébulisation) pour former un aérosol ;
- ✓ Mise en contact de l'aérosol avec un flux d'air, porté à une température contrôlée
- ✓ Séchage rapide de l'aérosol pour former des microparticules solides ;
- ✓ Séparation et collection de la poudre de microparticules et de l'air contenant le solvant vaporisé

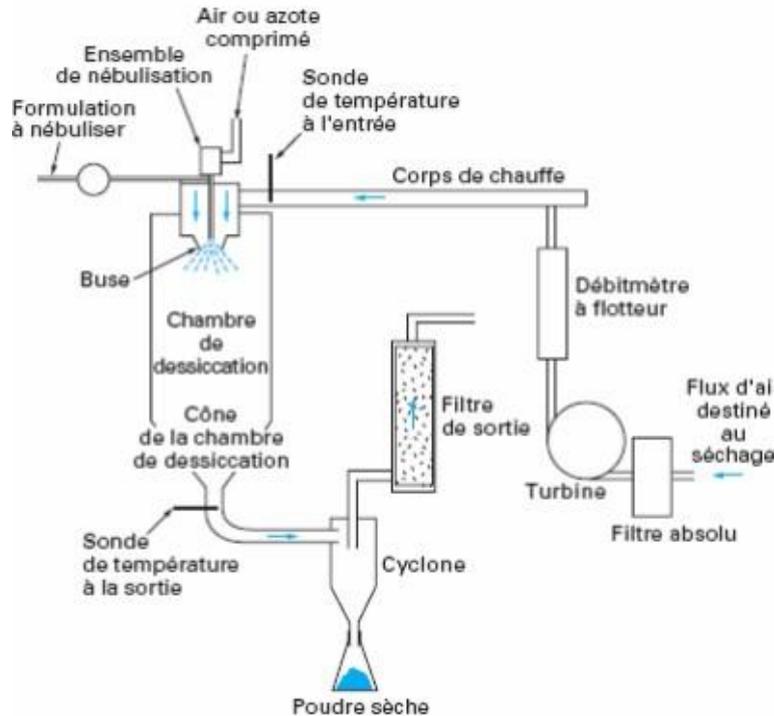


Figure II.8 : Système de microencapsulation mécanique Nébulisation/séchage [125].

❖ Procédé d'enrobage en lit fluidisé

Le procédé d'enrobage en lit fluidisé s'applique exclusivement à des matières actives constituées de particules solides (granulés, cristaux). Des matières actives liquides peuvent néanmoins être encapsulées après absorption par des supports particuliers poreux.

Le procédé permet de réaliser un enrobage continu de particules qui conduit donc à la production de microcapsules. Il comprend une séquence cyclique en trois temps :

- ✓ Fluidisation de la poudre de particules ;
- ✓ Pulvérisation du matériau enrobant sur les particules ;
- ✓ Séchage et filmification de l'enrobage [119].

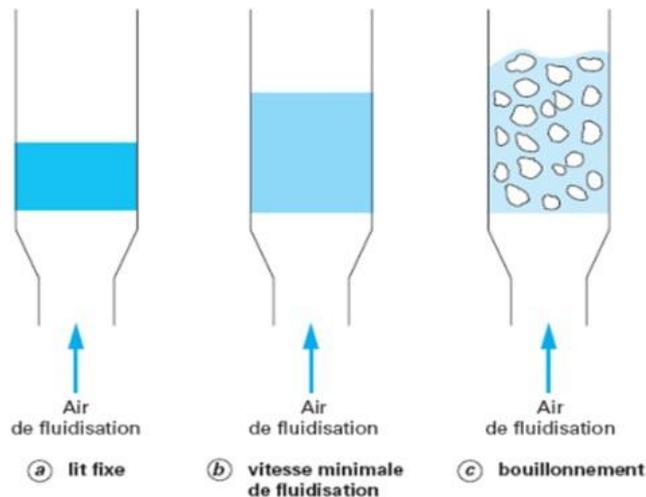


Figure II.9 : Différents états de la substance active à encapsuler en lit fluidisé [125].

II.2.4.7.2. Procédés chimiques

❖ Polycondensation interfaciale

Elle met en jeu deux monomères ayant des groupes fonctionnels complémentaires (A et B), chacun soluble dans une des phases d'un système diphasique. L'encapsulation de principes actifs peut être réalisée par cette méthode via un protocole en deux étapes. Dans un premier temps préparer une émulsion, la phase dispersée contient l'espèce à encapsuler ainsi qu'un monomère. Puis cette émulsion est diluée afin d'apporter le second monomère en phase continue. La réaction démarre alors à l'interface des gouttelettes. On obtient en fin de réaction une membrane qui renferme l'espèce à encapsuler [126].

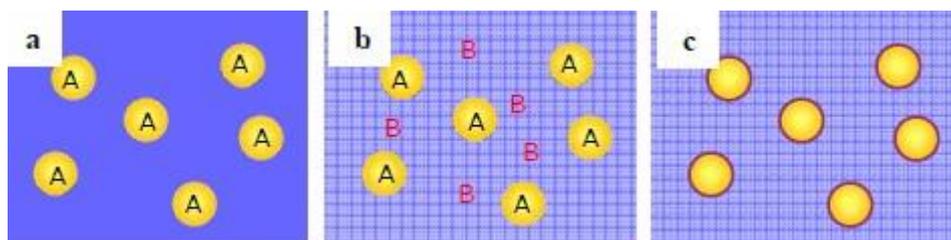


Figure II.10 : Schéma du principe de la microencapsulation par polycondensation interfaciale (a)Obtention d'une émulsion avec un monomère A dans les gouttelettes ; (b) Dilution de l'émulsion avec un monomère B dans la phase continue ; (c) Polycondensation des monomères A et B à l'interface des gouttelettes pour former la membrane des microcapsules [126].

II.2.4.7.3. Procédés physico-chimiques

❖ Coacervation

La coacervation décrit le procédé de la séparation de phases au sein d'une solution pour un polymère [127]. Le procédé de coacervation consiste à abaisser la solubilité d'un polymère initialement solubilisé dans un solvant approprié, en variant la température ou le pH

du milieu ou par ajout d'un électrolyte, d'un non-solvant ou d'un deuxième polymère (agent coacervation). Il se forme alors deux phases liquides : l'une riche en polymère appelée coacervat et l'autre pauvre en polymère [128], il s'agit d'une coacervation complexe. Le procédé de coacervation complexe peut être séparé en Cinque étapes comme le montre la figure II.11 [127].

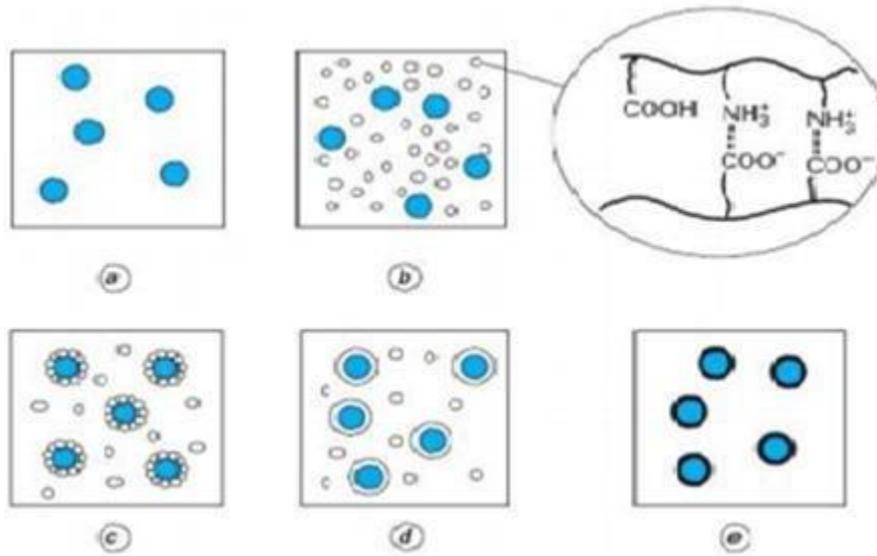


Figure II.11 : Réticulation interfaciale des microcapsules par coacervation complexe : (a) dispersion du principe actif dans la solution de polymère ; (b) formation du coacervat ou séparation de phase ; (c) dépôt du coacervat et formation d'un enrobage ; (d) renforcement de l'enveloppe ; (e) l'enrobage est consolidé par réticulation [127].

❖ Emulsion-évaporation de solvant

Une émulsion selon l'IUPAC "International Union of Pure and Applied Chemistry", est une dispersion colloïdale d'un liquide sous forme de gouttelette (phase dispersée ou discontinue) dans un autre liquide non miscible (phase dispersante ou continue) comme l'eau et l'huile, à laquelle on ajoute généralement un tensioactif afin d'éviter la séparation des phases et d'assurer la stabilité de l'interface de l'émulsion [128,129].

Le processus de dispersion consiste à cisailé l'une des phases dans l'autre de manière former des gouttes dont la taille peut varier de 0.1 à 10 μ m environ.

❖ Emulsion simple

L'émulsion eau/huile est généralement utiliser pour les PA faiblement hydrosolubles ou insolubles dans l'eau, tandis que l'émulsion huile/eau est envisagée lorsque le PA est hydrosoluble. Le type d'une émulsion simple, directe ou inverse, est fixé au premier ordre par la

solubilité préférentielle du tensioactif dans l'une ou l'autre des phases, en accord avec la règle empirique de Bancroft : le recours à un tensioactif hydrosoluble permet de former préférentiellement une émulsion directe, alors qu'un tensioactif liposoluble favorise une émulsion inverse [130]

Cette méthode est la plus simple et toutes les autres en dérivent, elle s'effectue en préparant la phase dispersée par dissolution du PA et le polymère dans un solvant organique, puis en réalisant l'émulsification (la mise en suspension) qui consiste à introduire la phase hydrophile dans la phase lipophile [131]. Cette étape est suivie par l'évaporation du solvant organique qui engendre la solidification des gouttelettes de phase dispersée [132].

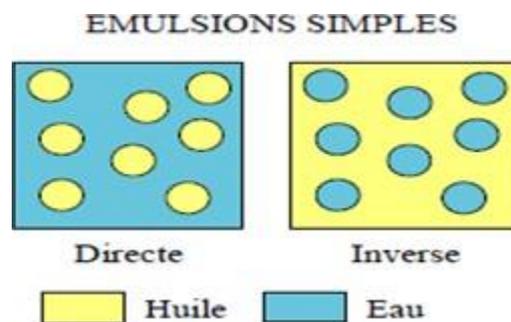


Figure II.12 : Représentation de l'émulsion simple [133].

❖ Emulsion double

Les émulsions doubles ou multiples par leur structure compartimentée, ont depuis longtemps été envisagées comme un matériau idéal pour jouer le rôle de microréservoir [132].

L'encapsulation des composés hydrophiles ne peut s'effectuer par la méthode eau/huile du fait de leur insolubilité dans les solvants organiques ; et de leur diffusion vers la phase continue durant l'étape d'émulsification conduisant à de faible taux d'encapsulation [132].

La solution aqueuse contenant le PA à encapsuler est émulsionnée avec la phase huileuse (solution organique dissolvant ou dispersant les polymères) avec une agitation ultrason pour obtenir une émulsion submicronique du type eau/huile. Cette émulsion est ensuite utilisée comme phase dispersée dans la troisième solution aqueuse contenant l'agent tensioactif, permettent d'obtenir une double émulsion (E/H/E). Enfin, les particules obtenues sont séchées et récupérées [130].

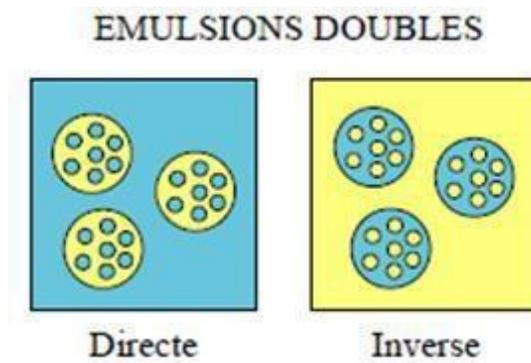


Figure II.13 : Représentation de l'émulsion double [133].

II.2.5. Cinétique de libération du principe actif encapsulé

Les interactions entre le principe actif et le milieu extérieur, deux types de microparticules Selon peuvent être formés celles qui ne doivent pas libérer leur contenu telles que les microparticules qui contiennent des enzymes ou des bactéries et celles qui sont formulées de façon à libérer le principe actif. Nous distinguons les systèmes à libération déclenchée et les systèmes à libération prolongée [134].

II.2.5.1. Système à libération accélérée

Type particulier de forme à libération modifiée se caractérisant par une vitesse de libération du (ou des) PA supérieure à celle qu'assurait la forme à libération conventionnelle administré par la même voie [135].

II.2.5.2. Système à libération prolongée

Ce sont des microsphères, ce type de système est caractérisé par les mécanismes de libération mis en jeu au cours de la dissolution de la forme (diffusion passive, dégradation/dissolution du matériau enrobant, échange d'ions ...). Il s'ensuit que la libération dépendra des structures de ces systèmes (microcapsules ou microsphères)[136].

II.2.5.3. Système à libération déclenchée

Généralement ce sont des microcapsules formées d'une membrane de faible perméabilité, qui vont libérer brutalement leur contenu par éclatement de cette membrane.

La rupture est déclenchée, soit par une pression (mécanique ou osmotique), une variation de température, une variation de pH ou encore une dégradation enzymatique de la membrane [126, 131].

II.2.6. Modèles théorique du mécanisme de libération de principe actif

La libération du principe actif a travers une matrice polymérique est généralement régit par trois mécanismes. Ils sont fortement dépendants de la nature de principe actif, et plus particulièrement des propriétés structurales du polymère tel que son taux de gonflement, vitesse de gélification et son comportement dans les fluides physiologique, Ces mécanismes selon Jalil. [137] obéissent à des lois telles que :

a. Diffusion fickienne

Où le principe actif diffuse à travers les chaînes macromoléculaires du polymère, due à l'existence d'un gradient de concentration du PA entre la matrice et le milieu dans lequel elle se trouve. Les modèles d'ordre 0 et 1 sont ceux qui représentent le mieux les profils de la cinétique de libération du principe actif en fonction du temps pour les formes conventionnelles, exprimés respectivement par les équations suivantes :[137]

Ordre $\frac{Ct}{C_{\infty}} = \frac{Mt}{M_{\infty}} = kt^{1/2}$ zéro (le rapport de concentrations est proportionnel au temps est linéaire en fonction de t)

b. Modèles d'ordre 1 ou de Wegner

Le modèles d'ordre 1 (le rapport de concentration varie exponentiellement en fonction de temps) est celui qui représente le mieux les profils de la cinétique de la libération de PA en fonction de temps, exprimés respectivement par les deux équations suivantes[103] :

$$\frac{Ct}{C_{\infty}} = \frac{Mt}{M_{\infty}} = (1 - e^{-kt}), \text{ ou bien}$$

$$Qt = 100 (1 - e^{-kt})$$

Tel que : M_0 , C_0 et Q_0 : sont la quantité ou la concentration ou le pourcentage massique du PA initialement à t_0 dans la forme, ou bien à t_{∞} (maximales), ordre 1 (le rapport de concentrations varie exponentiellement en fonction du temps, équation de Wagner)

2eme Loi de Fick

La forme logarithmique linéaire en fonction du temps :

$$\ln \left(1 - \frac{Ct}{C_{\infty}} \right) = \ln \left(1 - \frac{Mt}{M_{\infty}} \right) = \ln(100 - Qt) = -kt$$

$$Q_{\infty} = Q_{\max} = 100\%$$

c. Modèle d’Higuchi

Higuchi a développé des modèles décrivant la libération des PAs solubles et peu solubles incorporés dans des matrices solides. Le PA est libéré par diffusion à travers le réseau poreux créé par le solvant, qui est la seule étape limitant du mécanisme. Pour celui-ci, le rapport des concentrations varie linéairement en fonction de $t^{1/2}$. L’équation du modèle cinétique peut s’écrire globalement ainsi [121] :

K_H : est la constante cinétique d’Higuchi

$$\frac{Ct}{C_{\infty}} = \frac{Mt}{M_{\infty}} = K_H t^{1/2}$$

ou bien $Qt = K_H t^{1/2}$

Avec la linéarisation à l’échelle logarithmique ;

$$\ln\left(\frac{Ct}{C_{\infty}}\right) = \ln\left(\frac{Mt}{M_{\infty}}\right) = \ln k + 1/2 \ln t ; \text{ ou bien } \ln(Q_t) = \ln k' + 1/2 \ln t$$

d. Modèle de Weibull ou de la fonction RRSBW

Lorsque le profil s’écarte sensiblement du cas idéal d’ordre 1 aux temps faibles, du à un ralentissement au départ du relargage du PA. Ainsi, l’équation varie exponentiellement en fonction du temps, mais elle comporte aussi un coefficient de forme β . Elle peut s’écrire de la manière suivante [121] :

$$\frac{Ct}{C_{\infty}} = \frac{Mt}{M_{\infty}} = \left(1 - e^{-\left(\frac{t-t_0}{t_d}\right)^{\beta}}\right)$$

Où

$$Qt = Q_{\infty} \left(1 - e^{-\left(\frac{t-t_0}{t_d}\right)^{\beta}}\right)$$

- t_0 : temps initial
- t_a : temps correspondant à un pourcentage de 63.2% de PA dissout
- β : est le facteur de sigmoïté

e. Modèle d’ordre zéro (modèle non fickien)

Il est appliqué aux formes à libération modifiée de type matriciel inerte avec des PA peu solubles qui ne se désagrègent pas. Ces formes libèrent le produit sur une grande période de temps à quantités égales. L’équation du modèle [121]:

$$\frac{C_t}{C_\infty} = \frac{M_t}{M_\infty} = k_0 t$$

Ordre zéro (le rapport de concentrations est proportionnel au temps et linéaire en fonction De(t)

- C_t et C_∞ : sont respectivement les concentrations du PA libéré au temps t et à saturation (équilibre), M_t et M_∞ leurs masses ou quantités en mg correspondantes.
- Q_t : est le taux de PA dissous à t .
- K_0 : les constantes cinétiques

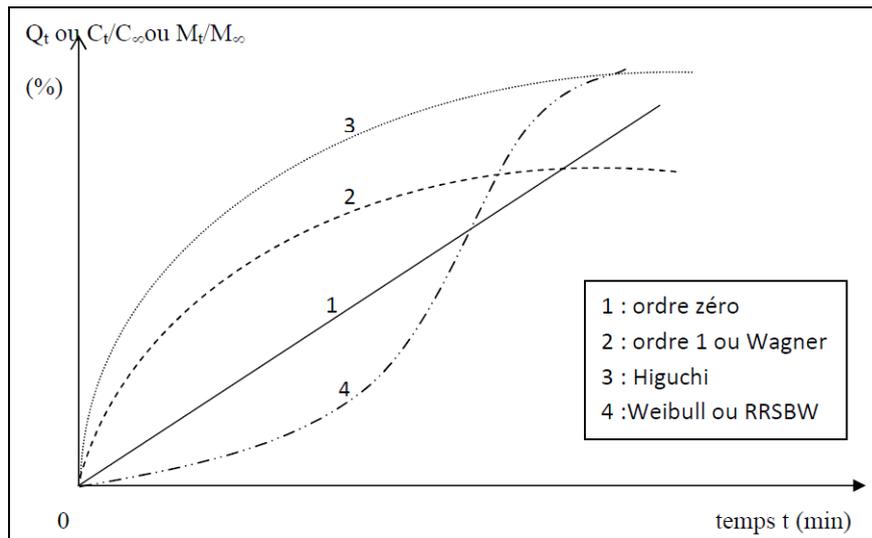


Figure II.14: Profils des cinétiques de dissolution de modèles fickiens et d'ordre zéro [121]

II.2.7. Principaux matériaux d'encapsulation

Les matériaux utilisés pour obtenir les microparticules sont nombreux et variés. Ils peuvent être de nature hydrophile, hydrophobe ou une combinaison des deux, ils doivent être capables de former un film stable et compatible avec la molécule à encapsuler [126].

Un certain nombre de matériaux ont été utilisés, nous pouvons citer :

- ✓ Les polymères d'origine naturelle animale ou végétale, tels que la gélatine, le Chitosane, l'alginate de sodium, l'amidon et les amidons modifiés.
- ✓ Les polymères synthétiques, tels que les copolymères acryliques et méthacryliques, le Polycaprolactone, les polymères d'acides lactiques et glycoliques.
- ✓ Les polymères semi-synthétique (dérivés cellulosique), tels que l'éthylcellulose, L'hydroxypropylméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, l'acétate-phthalate de cellulose.
- ✓ Les lipides et les cires minérales : corps gras solides, glycérides, cires (d'abeille, de carnauba...), cires minérales [122,138].

II.2.8. Polymères biodégradables

II.2.8.1. Définition

Les polymères biodégradables sont actuellement en plein essor de par leurs nombreuses applications, telles que les matériaux à usage médical (sutures, broches, prothèses chirurgicales...) ou à usage pharmaceutique (matrice à libération contrôlée de principe actif).

La biodégradation est la décomposition de matière organique par des microorganismes comme les bactéries, les champignons ou les algues [139].

II.2.8.2. Mélanges de polymères

La recherche en matière de polymères est de plus en plus axée sur la préparation et la création de nouveaux matériaux. Ces derniers, sont obtenus soit par : [140]

- ✓ Synthèse de nouveaux monomères et/ou développement de nouveaux procédés dépolymérisation;
- ✓ Copolymérisation d'au moins deux monomères, dont les propriétés du matériau obtenu dépendent de sa structure et de la composition des monomères;
- ✓ Mélange de deux ou plusieurs polymères dont l'intérêt réside dans la synergie de leurs propriétés respectives.

II.2.8.3. Avantages des mélanges de polymères

L'intérêt de préparer des mélanges de polymères, en solution ou à l'état fondu, réside dans la facilité et le faible coût de leur préparation comparé à la synthèse chimique.

Généralement, les matériaux issus de l'association de deux ou plusieurs polymères permettent d'élargir la gamme de propriétés ou d'obtenir des matériaux avec des compromis de propriétés (résistance mécanique, résistance aux chocs, thermo stabilité ...etc.) avantageuses pour l'application recherchée.

Malgré les avantages offerts par cette voie, elle reste très délicate à mettre en œuvre et permet d'obtenir des matériaux ayant des morphologies bi-phasiques à propriétés médiocres [141].

II.2.9. Méthodologie des plans d'expériences**II.2.9.1. Définition**

Un plan d'expériences est une série d'essais organisés à l'avance dans lesquels les variables du procédé à étudier sont mises en œuvre, afin d'étudier l'impact de ces changements sur une réponse d'intérêt, pour optimiser ainsi les performances du système étudié, tout en essayant de minimiser le nombre d'essais sans sacrifier la qualité, pour obtenir à la fois une

meilleure précision sur les résultats et un maximum d'efficacité avec un moindre coût [142,143]

La méthode des plans d'expériences cherchera à déterminer et à établir les liens existants entre 2 types de variables [144]

- La réponse : grandeur physique étudiée
- Les facteurs grandeurs physiques modifiables par l'expérimentateur, sensés influé sur les variations de la réponse

II.2.9. 2.Types des plans d'expériences :

a) Plans factoriels à 2 niveaux (2^k)

Un plan factoriel est un plan d'expérience où l'on fait, dans une même expérience, l'étude simultanée de deux ou plusieurs variables indépendantes (facteurs), afin de connaître le rôle propre de chaque variable indépendantes, leur importance relative et leur interaction [145].

Les plans factoriels à deux niveaux sont les plus utilisés car ils sont plus simples et rapides à mettre en œuvre. Le nombre d'essais nécessaires dans le cadre de ce plan est égal à 2^k où k correspond au nombre de facteurs. Chaque facteur expérimental n'a que deux niveaux, plus le nombre de facteurs augmente, plus le nombre d'essais nécessaires pour effectuer le plan augmente. Les plans factoriels à 2 niveaux ne peuvent pas explorer entièrement une large zone de l'espace factoriel, mais ils fournissent des informations utiles pour un nombre restreint d'essais par facteur [146]

Plan 2^2 : facteurs A et B 4 expériences.

Plan 2^3 : facteurs A, B et C 8 expériences.

Plan 2^4 : facteurs A, B, C et D 16 expériences.

La matrice d'expérience se construit selon le tableau suivant pour le cas de plan 2^3 avec des facteurs A, B et C. Le modèle mathématique de 3 facteurs correspond à la relation suivante :

$$Y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_3 x_3 + b_{12} x_1 x_2 + b_{13} x_1 x_3 + b_{23} x_2 x_3 + b_{123} x_1 x_2 x_3 + e$$

- **Y**: est la réponse
- **b₀**:est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude

- $x_1, 2, 3$: représente le niveau attribué au facteur 1, 2, 3
- b_1 : est l'effet (ou effet principal) du facteur 1.
- b_2 : est l'effet (ou effet principal) du facteur 2.
- b_3 : est l'effet (ou effet principal) du facteur 3.
- b_{12} : est l'effet entre les facteurs 1 et 2.
- b_{13} : est l'effet entre les facteurs 1 et 3.
- b_{23} : est l'effet entre les facteurs 2 et 3.
- b_{123} : est l'effet entre les facteurs 1 et 2 et 3.
- e : est l'écart

Tableau II.4 : Matrice d'expériences du plan factoriel pour 3 facteurs

N° essais	A	B	C
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

Plus généralement, la matrice d'expériences comporte k colonnes pour les facteurs principaux et 2^k lignes soit 2^k essais. Elle se construit selon la règle suivante : colonne du 1er facteur: alternance de -1 et +.

- ✓ Colonne du 2^{ème} facteur : alternance de -1 et +1 de 2 en 2
- ✓ Colonne du 3^{ème} facteur: alternance de -1 et +1 de 4 en 4
- ✓ Colonne du 4^{ème} facteur : alternance de -1 et +1 de 8 en 8

Et ainsi de suite pour un nombre plus élevé de facteurs.

b) Plans centrés composés

Le plan composé centré s'avère très intéressant d'un point de vue expérimental, car il est basé sur un plan factoriel (2^k) complété par un plan en « étoile » où chaque facteur varie à une distance $\pm\alpha$ du centre (les autres facteurs sont au centre du domaine d'étude). Il permet ainsi à partir d'un plan factoriel, d'évoluer progressivement vers un plan en surface de ré-

ponse. La partie centrale constituée par n_0 expérience au centre du domaine. Le nombre total de N essais à réaliser pour « K » facteur est donné par la relation suivante [147].

c) Plans Box-Behnken :

Les plans de box-behnken comptent toujours 3 niveaux par facteur. On commence avec un plan factoriel complet, puis on utilise les interactions du plan complet pour construire de nouveaux facteurs en rendant leurs niveaux de facteurs identiques à ceux des termes d'interaction respectifs [148]

- S'il y a deux facteurs prenant chacun trois niveaux, il faut exécuter 9 essais
- S'il y a trois facteurs prenant chacun trois niveaux, il faut exécuter 27 essais

Chapitre III :
Matériels et méthodes

Introduction

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie industriel au niveau de « L'université A-Mira, Bejaia ».

Cette partie expérimentale décrit le matériels et méthodes utilisées dont :

- L'extraction par les solvants organiques de la plante étudiée, détermination du rendement, caractérisation par UV-Visible, HPLC, spectroscopie infrarouge, suivi par la détermination des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.
- Etude de l'activité antioxydant par DPPH.
- Préparation pharmaceutique par microencapsulation dans des polymères biodégradable et étudier la cinétique de libération de PA

III.1. Matériel végétale

III.1.1. Cueillette

Le Matériel végétal choisi dans cette étude est représenté par les feuilles « thymus vulgaris » qui ont été achetées, sous forme séchée (**Figure 1**) chez un herboriste dans le village de Béni Maouche- wilaya de Bejaia. Elles ont été récupérées dans un sac propre à l'abri de la lumière pour servir ultérieurement à l'extraction.



Figure III. 1 : Thymus vulgaris sous forme séchée

III.1.2. Prétraitement de la plante

III.1.2.1. Broyage

Les feuilles séchées ont été broyées à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine



Figure III. 2 : broyage des feuilles de thymus

III.1.2.2. Tamisage et conservation

La poudre obtenue à partir des feuilles de la plante étudiée a été tamisée avec un tamis de 100 μ m, pesée avec précision, puis conservée dans un sachet, entouré avec du papier aluminium à l'abri de la lumière et de l'humidité.



Figure III. 3 : poudre des feuilles de thymus après tamisage

III.2. Méthode d'extraction :

III.2.1. Macération (extraction solide/ liquide)

La macération (extraction solide/liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (poudre) dans un solvant pendant une période donnée, pour extraire les principes actif (composés phénoliques et flavonoïdes).

Mode opératoire :

- ✓ Peser 20gramme de la matière végétale (poudre)
- ✓ Mélanger la poudre avec 40 ml d'eau distillé et 160 ml d'éthanol dans un bécher
- ✓ Laisser le mélange macérer pendant 24h avec agitation.



Figure III. 4 : Macération (extraction solide /liquide)

- ✓ Après 24h, le mélange est filtré sur un papier wattman (n°1). **(Figure 5)**



Figure III. 5 : Filtration

- ✓ Récupérer le filtrat dans un récipient, et conserver au froid et à l'abri de la lumière (**Figure 6**). Et le résidu est récupéré dans une boîte de pétri pesée préalablement (**Figure 7**).



Figure III.6 : Le filtrat



Figure III. 7 : Le résidu

III.3. Rendement massique

- **Evaporation**

- ✓ Une quantité de 20ml de filtra obtenu a été évaporé à l'aide d'un agitateur pendant 2jours. (**Figure 8**)



Figure III. 8 : Evaporation de filtra

- ✓ Au bout de 2 jours, l'extrait est récupéré dans une boîte de pétri pesée préalablement vide.
- ✓ L'extrait est laissé à la température ambiante pour qu'il s'évapore.
- ✓ En suite la boîte de pétri est mise dans l'étuve pendant 2h à une température de 40c° pour sécher complètement l'extrait.
- ✓ Après 2h la boîte de pétri pleine est pesée.

- **Détermination du rendement**

Le calcul du rendement est exprimé en pourcentage de masse de l'extrait sec par rapport au poids du matériel végétale sec initial.

La masse de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids de boîte de pétri plein (après élimination du solvant par évaporation) et le poids de boîte de pétri vide.

Le rendement massique est calculé par l'équation suivante[149]:

$$\%R = \frac{M_{ext}}{M_{éch}} \times 100$$

- **R** : Rendement massique (%)
- **Mext** : la masse de l'extrait sec après l'évaporation du solvant (g)
- **Méch** : la masse de la poudre de l'échantillon de plante de thymus (g)

III.4. Extraction par les solvants organiques (Extraction liquide-liquide)

A. Extraction par l'éther de pétrole EP :

- On verse dans une ampoule à décanter 50ml de l'extrait + 50 ml de l'éther de pétrole EP.
- On agite bien le mélange, et on le laisse reposer au moins 20 min jusqu'à l'obtention de deux phases (**Figure 9**) :
 - Une phase organique ou extrait de l'éther de pétrole (EEP) (phase supérieure)
 - Une phase aqueuse (phase inférieure)

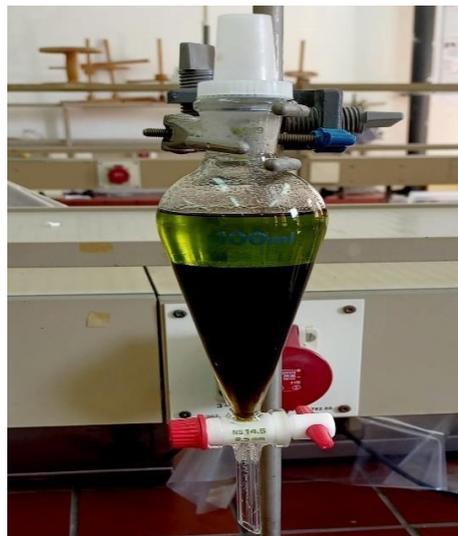


Figure III.9: Extraction par l'éther de pétrole

- On récupère la phase organique (supérieure) ou l'extrait de l'éther de pétrole (EEP) dans un erlenmeyer (**Figure 10**).

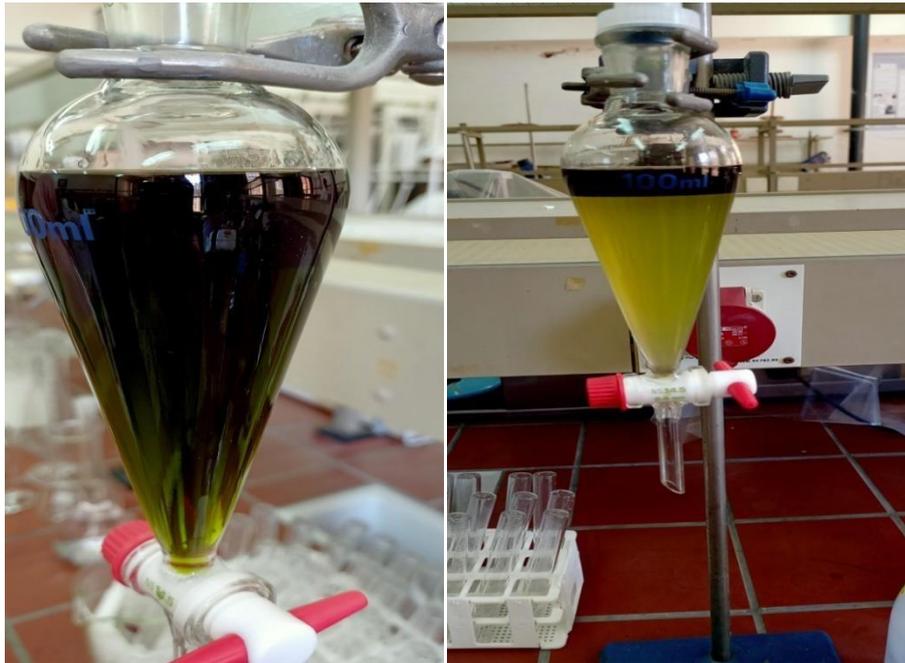


Figure III. 10 : Extrait de l'éther de pétrole (**EEP**)

- On récupère la phase aqueuse (inférieure) dans un récipient en verre.

B. Extraction par Dichlorométhane :

- On verse dans une ampoule à décanter 50 ml de la phase aqueuse récupérée dans la première extraction + 50 ml de Dichlorométhane.
- On agite bien le mélange, et on le laisse reposer au moins 20 min jusqu'à l'obtention de deux phases (**Figure 11**) :
 - Une phase organique ou extrait de Dichlorométhane (EDCM) (phase inférieure).
 - Une phase aqueuse (phase supérieur).
- On répète l'extraction deux fois.

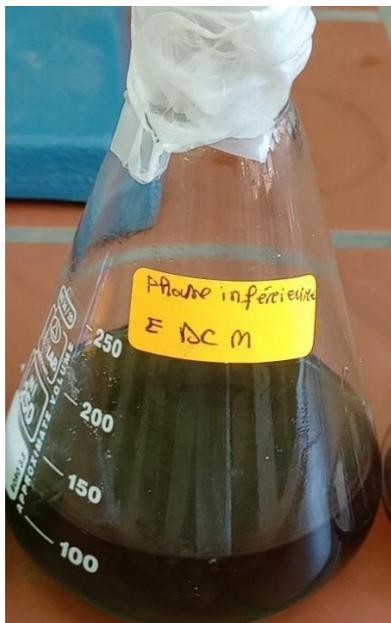


a) la premier extraction

b) la deuxième extraction

Figure III.11 : Extraction par dichlorométhane

- On récupère la phase organique (inférieure) ou l'extrait de Dichlorométhane (EDCM) dans un erlenmeyer (**Figure 11**).

**Figure III. 12** : Extrait Dichlorométhane (EDCM)

- Les résultats de l'extraction liquide-liquide sont résumés dans la figure suivante (**Figure 13**) :



Figure III. 13 : les extraits de la plante thymus

III.5. Analyse et quantification par spectroscopie UV-VIS

III.5.1. Dosages des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les extraits des feuilles de *thymus vulgaris* été effectué par spectrophométrie UV-visible selon la méthode au réactif de Folin- Ciocalteu [150].

+ Principe :

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Il réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène (**ribéreau- gayon.1968**). La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle, selon le principe de la loi de Beer-Lambert, à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [151].

+ Mode opératoire

1. La préparation des 3 différentes solutions suivantes :

❖ Solution mère d'acide gallique d'une concentration de 2 mg/ ml :

15mg d'AG dans 10 ml d'eau distillé

❖ Solution de Folin-Ciocalteu d'une concentration de 0.1 mg/ml :

1ml de Folin-cicalteu dilué dans 9 ml d'eau distillée

❖ Solution de carbonate de sodium d'une concentration de 0.075 mg/ml :

18.75g de Na_2CO_3 dissouts dans 250 ml d'eau distillée

2. Préparation des étalons de l'Acide Gallique.

On prépare une série d'étalons par dilutions de la solution mère d'AG de concentration 2mg/ml selon le **tableau III.1**.

Tableau III.1 : préparation des étalons d'acide gallique

Etalons	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Solution mère d'AG (2mg/ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.7
Eau distillée (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.3
Ce (mg/ml)	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.14
Ve (ml)	0.4					
Folin (ml)	2					
Na ₂ CO ₃ (ml)	1.6					
Ce' (µg/ml)	2	4	6	8	10	14
A à 765nm	0.050	0.122	0.182	0.412	1.003	0.894

Puis on procède aux mélanges de **0.4 ml** de chaque solution étalon (de E₁ à E₆), avec **2ml** de réactif de **Folin-Ciocalteu** et **1.6 ml** de solution de **Na₂CO₃**.

On agite chacune des solutions étalons, puis on laisse déposer pendant **2h** pour développer la coloration bleue du complexe.

On mesure par la suite les absorbance des solutions à **765 nm** par rapport au blanc contenant **0.4 ml d'eau distillée** + **2ml de Folin** et **1.6 ml de carbonate de sodium**, préparé dans les mêmes conditions que les étalons.

3. Dosage de l'extrait :

0.4 ml d'extrait (préparé avec une dilution de **10 fois** pour EEP et **100 fois** pour HA, EDCM et l'extrait brute E) est ajouté à **1.6ml** de la solution de **Na₂CO₃**. Après agitation, **2 ml** de la solution de Folin-Ciocalteu est ajouté à l'ensemble. Après 2h d'incubation à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 765 nm par rapport à un blanc (sans extrait).

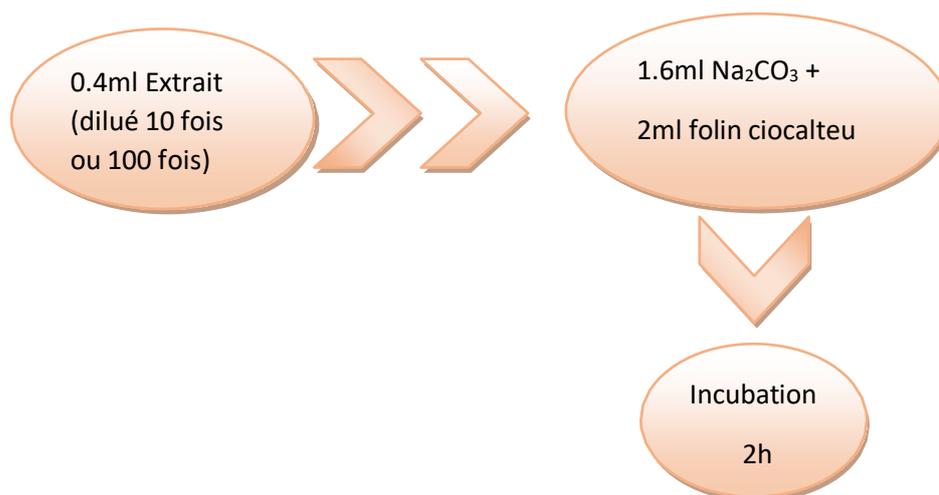


Figure III.14 : Schéma des étapes de la préparation d'échantillon des extraits du thymus

III.5.2. Dosage des flavonoïdes

✚ Principe

Le dosage des flavonoïdes se fait à l'aide des réactifs suivants :

- La quercétine (C₁₅H₁₀O₇) qui est un composé organique de couleur jaune,
- Le trichlorure d'aluminium (AlCl₃) qui est un sel de couleur blanche,

Le mélange des deux, abouti à la formation d'un complexe jaune qui absorbe à 430 nm **Les figures III.15 et III.16** montrent, la formule générale de la Quercétine et la réaction avec le trichlorure d'aluminium :

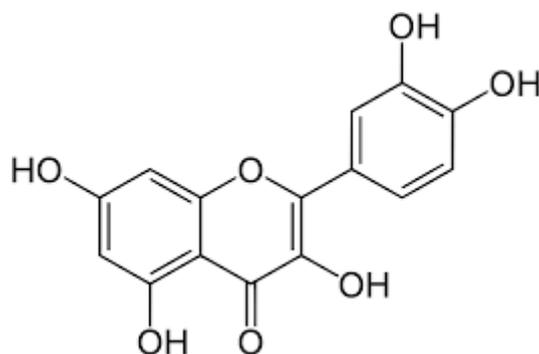


Figure III.15 : Formule chimique de la Quercétine

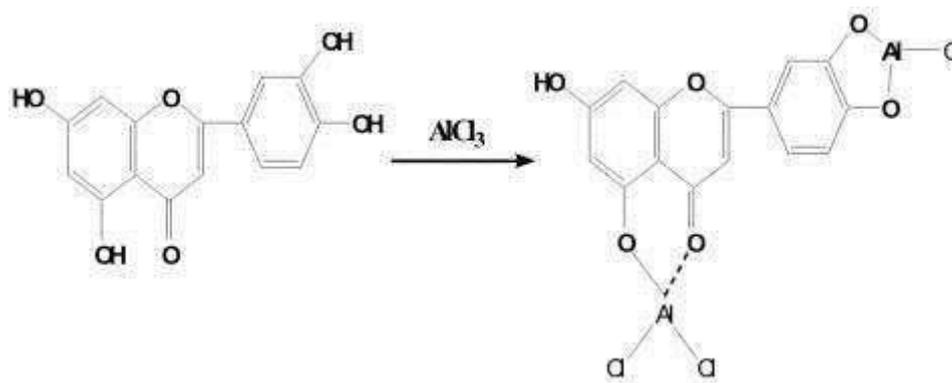


Figure III.16 : Schéma de réaction des flavonoïdes avec chlorure d'aluminium

Mode opératoire

1. Préparation des 2 solutions :

❖ Solution de trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ à 2% :

2g de sel $AlCl_3$ sont dissous dans 100 ml de MeOH

❖ Solution mère de Quercétine :

On dissout une prise d'essai de 15mg de quercétine dans 7.5 ml de MeOH.

2. Préparation des étalons de Quercétine de concentration 2mg/ml :

On doit effectuer une série de dilutions de la solution mère de Quercétine, pour préparer les étalons selon le tableau II.4.

Tableau III.2 préparation des étalons de Quercétine :

Etalons	E1	E3	E4	E5	E6
Solution mère d'Qr (2mg/ml)	0.1	0.3	0.4	0.5	1.5
Eau distillé (ml)	9.9	9.7	9.6	9.5	9.3
Ce (mg/ml)	0.02	0.06	0.08	0.1	0.3
Ve (ml)	0.4				
$AlCl_3$ (ml)	2				
Ce' (μ g/ml)	2	6	8	10	30
A à 765nm	0.195	0.791	1.006	1.032	2.873

Ensuite, on doit effectuer les mélanges de **0.4 ml** prélevé de chacun des étalons (de E₁ à E₆), avec **2ml** de solution de **AlCl₃** dans différents tubes à essai.

Le mélange est vigoureusement agité puis laissé au repos. Après **15 min** d'incubation, l'absorbance est lue à **430 nm** par rapport à un blanc (sans extrait) contenant **0.4 ml de méthanol + 2ml d'AlCl₃**, préparé dans les mêmes conditions que les étalons.

3. préparation de l'échantillon de l'extrait :

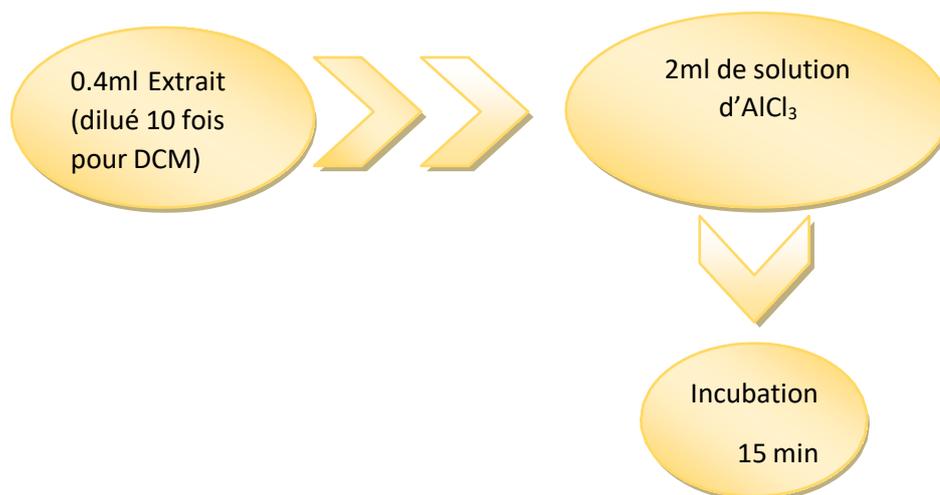


Figure III.17 : Schéma des étapes de la préparation d'échantillon des extraits (flavonoïdes)

4. la lecture de l'absorbance a été réalisée au spectrophotomètre UV –visible à une longueur d'onde de 430 nm contre un **blanc**.

III.5.3. Activité antioxydante par méthode de DPPH

✚ Principe

Le composé utilisé pour la mesure du dosage des antioxydants est le DPPH qui est un radical libre azoté organique avec une couleur purple foncé. Lorsqu'une solution de DPPH est mélangée à un antioxydant, sa couleur passe du violet au jaune de l'hydrazine correspondante. Sa formule chimique (2, 2-diphényl 1-picrylhydrazyle) (C₁₈H₁₂N₅O₆). Ce composé est utilisé pour le dosage des antioxydants. Sa synthèse chimique représentée ci-dessous :

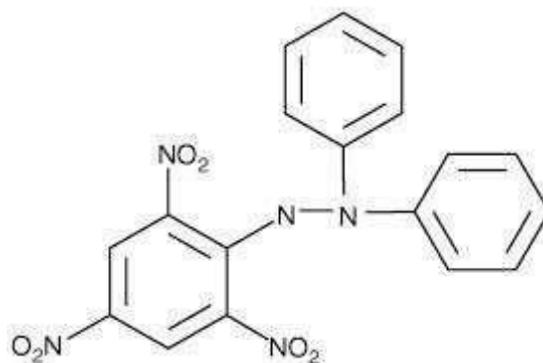


Figure IV.18 : représente la formule globale du DPPH

Mode opératoire

1. Préparation de la solution DPPH de concentration de 0.036 mg /ml

On dissout une prise d'essai de **2 mg de DPPH** pur avec le MeOH dans une fiole de 50ml, on complète au trait de jauge avec le solvant.

2. Préparation des solutions diluées de l'HE

On réalise deux dilutions de chaque extrait concentré dans le MeOH selon le **tableau III.3** ci-dessous, pour étudier l'effet de la concentration en huiles essentielles sur l'activité antioxydante

Tableau III.3 : les dilutions de l'huile essentielle

Solution diluées de l'extrait	E1	E2
HE(μl) (HA, EDCM, EEP, E)	100	800
MeOH (ml)	1	1

Dans cette étape, on a associé le pouvoir d'inhibition antioxydant des huiles essentielle avec un **témoin** qui se compose d'un mélange de (**1ml de MeOH + 2ml de solution de DPPH**).

Ainsi, **1 ml** de chacune des solutions diluées de **l'extrait des HE** est mélangé à **2 ml** de **DPPH**. On laisse agir pendant **30 min**, puis on procède à la mesure des absorbances à **517 nm** par rapport au **blanc** (méthanol)

L'absorbance de la solution témoin doit être mesurée de la même manière que les solutions diluées des HE

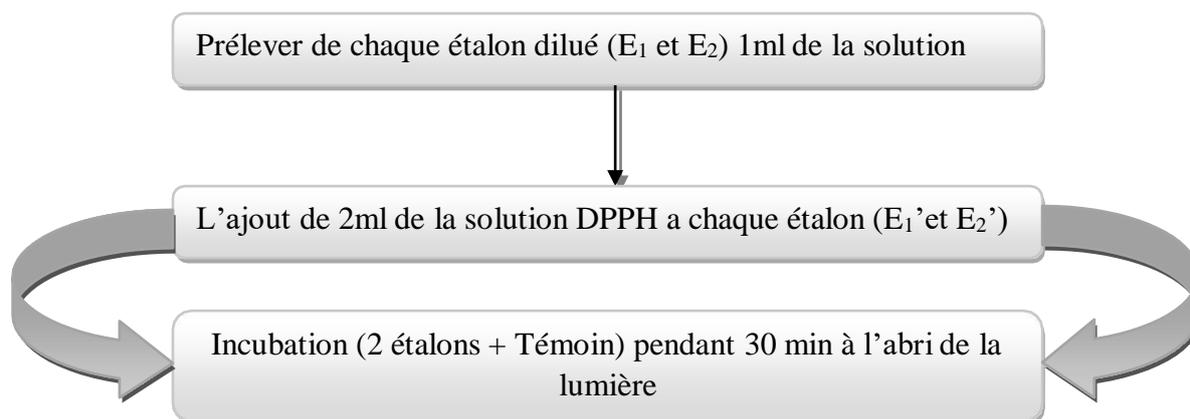


Figure III.19 : Schéma des étapes de dilutions de l'extrait HE et de mesure de l'activité Antioxydante par le DPPH.

L'activité antioxydant est exprimée en pourcentage d'inhibition de radical DPPH, et calculée à partir de l'équation suivante :

$$\text{Inhibition}(\%) = \frac{(\text{AbsTémoin} - \text{Abséchantillon})}{(\text{AbsTémoin})} * 100$$

- **Inhibition %:** pourcentage d'inhibition des radicaux libres.
- **Abs Témoin :** absorbance du Témoin.
- **Abs échantillon :** Absorbance de la solution contenant l'échantillon.

III.6. Essais de caractérisation par chromatographie liquide à haute performance HPLC

✚ Principe et méthode

L'analyse est réalisée par une technique HPLC (UHPLC⁺focused, Ultimate 3000 auto sampler colon compartiment) Le besoin de savoir les profils et d'identifier les composés individuels dans les échantillons exige le remplacement des méthodes traditionnelles par des techniques séparatives. L'HPLC est sous doute la technique analytique la plus utile pour caractériser les composés polyphénoliques [152].

❖ Protocole expérimental

20 µl de chaque extrait ont été injectés dans une colonne de type phase inverse C18, de dimensions égales à 125× 4.6mm. La phase mobile (éluant) est constituée de trois solvants : l'eau distillée, méthanol, acide acétique (50 ; 47 ; 2.5) (v/v/v). Le gradient d'éluant appliqué est de type isocratique pour un temps d'analyse de 20min. Le débit est de 1ml/min [153]. La

détection a été effectuée par un détecteur UV à une longueur d'onde égale **250nm**. Les conditions opératoires sont les suivantes :

- **Débit** :1 ml/min
- **Pression de travail** : 100-150 bars
- **Volume d'injection** : 20µl
- **Longueur d'onde** : 250 nm
- **Temps d'analyse** : 20 min
- **Colonne** : C18

Préparation de la phase mobile, des solutions standards et des extraits

▪ **la phase mobile (PM) :**

La phase mobile est composée de trois solvants polaires : l'eau distillée, méthanol et l'acide acétique (47ml, 50ml, 2.5ml) respectivement

▪ **Les standards (vt=2ml):**

- **Acide gallique (2mg/ml)**

Un volume 0.1 ml d'AG est mélangé à un volume 1.9 ml de solution (PM)

- **Quercétine (1mg/ml)**

Un volume 0.2ml de Qr est mélangé à 1.8 ml de solution (PM)

- **Thymol (1mg/ml)**

Un volume 0.2 ml de thymol est mélangé à 1.8ml de solution (PM)

▪ **Les extraits**

0.2ml de chaque extrait (extrait brute E 20F, HA, EDCM) est ajouté à 1.8 ml de phase mobile.

Partie 03 : Microencapsulation

III.3.1. Présentation des matières premières

Les polymères

a) le polyéthylène glycol (PEG)

Le polyéthylène glycol est un polymère linéaire appartenant à la famille des polyéthers non-ionique, c'est un thermoplastique cristallin la chaîne de PEG est inerte d'un point de vue chimique alors que les groupements hydroxyles terminaux peuvent être exploités pour la synthèse de copolymères

Les PEG ont des poids moléculaires moyens compris entre 2000 et 20000, ils sont généralement produits par polymérisation anionique d'oxyde d'éthylène avec une étape de terminaison, afin de donner des polyéthers.



Figure III.20: Représentation schématique du polyéthylène glycol

Le PEG présente des propriétés physico-chimique et biologiques uniques, y compris la solubilité aqueuse illimitée indépendamment de sa masse moléculaire, biocompatibilité avec une faible degré d'immunogénicité et la non biodégradabilité.[154]

b) dextrine

les dextrines sont des glucides amorphes de formule brute approximative $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$. Elles sont obtenues par chauffage de l'amidon vers 160°C ou par son hydrolyse acide vers 100°C . Des dextrines se forment dans la croûte du pain lors de la cuisson, ce qui lui confère sa couleur et son parfum. On les trouve sous forme de poudre blanche. Elles sont plus ou moins solubles dans l'eau et donnent les solutions incolores et dextrogyres.

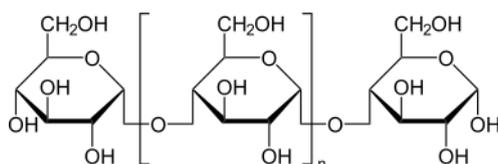


Figure III.21: Représentation schématique de dextrine

c) Tension active (glutaraldéhyde)

Le glutaraldéhyde est utilisé pour la fixation des tissus en microscopie optique et électronique. Par exemple, il permet de fixer les protéines avant la coloration lors d'électrophorèses SDS-PAGE. Il est aussi utilisé comme intermédiaire de « cross-linking » (ou réticulation) intermoléculaire entre protéines.[155]

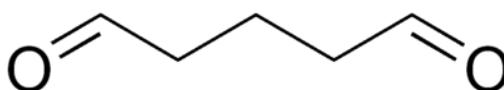


Figure III.22 : Représentation schématique du glutaraldéhyde

✚ Huile de vaseline

La vaseline est un mélange d'hydrocarbures obtenus par purification des fractions lourdes de certains pétroles.

• Structure chimique :

L'huile minérale est un mélange d'alcane, composée d'hydrocarbures linéaires et dont la formule brute est C_nH_{2n+2} , avec n entre 15 et 50

✚ Principe active (thymol & carvacrol)

L'extrait brut est plus riche en thymol et carvacrol que les autres extraits d'après l'analyse de HPLC. Thymol et Carvacrol se présentent comme de principes actifs de thym.

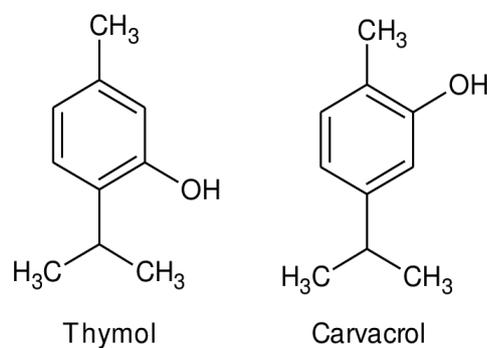


Figure III.23 : Représentation schématique du thymol et carvacrol

III.3.2. Préparation des milieux physiologiques :

❖ Solution d'acide chlorhydrique 0,1 N dans un volume de 100ml :

$$m_{\text{HCL}} = C \cdot V \cdot M \quad \longrightarrow \quad m_{\text{HCL}} = 0,365 \text{ g de HCL pur}$$

$$M = 37 \text{ g/mole}$$

$$\text{Pureté} = 37 \%$$

$$\text{Densité} = 1,18$$

$$\text{Masse volumique } (\rho) = 1,18 \text{ g/cm}^3$$

$$37 \text{ g de HCL} \quad \longrightarrow \quad 100 \text{ g de solution concentré}$$

$$0,365 \text{ g de HCL} \quad \longrightarrow \quad m_{\text{HCL}} \text{ concentré}$$

$$m_{\text{HCL}} = 0,98\text{g}$$

$$p = m_{\text{HCL}}/V \longrightarrow V = m_{\text{HCL}}/p$$

$$V = 0,83 \text{ ml}$$

Donc on prélève 0.8 ml de la solution concentré de HCL à 37% dans une fiole de 100ml, on complète avec l'eau distillée au trait de jauge.

❖ **Solution de NaOH 0,1 N dans un volume de 100ml :**

$$M = 40 \text{ g/mole}$$

$$\text{Pureté} = 98\%$$

$$m_{\text{NaOH}} = C.V.M \longrightarrow m_{\text{NaOH}} = 0,4082 \text{ g}$$

Donc on dissout exactement la prise d'essai d'une masse de 0,4082g de NaOH pesée avec la balance analytique dans une fiole de 100ml on poursuit avec l'eau distillée et on complète au trait de jauge.

➤ **Préparation tampon ph = 4**

On mesure d'abord ph de l'eau distillé avec l'appareil ph mètre on trouve $\text{ph}_{\text{eau distillé}} = 5,47$, on l'ajoute quelque goutte de solution Hcl pour $\text{ph} = 4$

➤ **Préparation tampon ph=8**

On ajoute a l'eau distillé ($\text{ph}_{\text{eau distillé}} = 5.47$) quelque goutte de NaOH jusqu'à arriver à $\text{ph} = 8$

➤ **Préparation tampon ph=6**

On ajoute a l'eau distillé ($\text{ph}_{\text{eau distillé}} = 5.4$) quelque goutte de NaOH jusqu'à arriver à $\text{ph} = 6$

III.3.3. optimisation des paramètres de préparation des microparticules

L'objectif de cette étude est de déterminer les conditions optimales de préparations des microparticules par l'utilisation de la méthode des plans d'expériences (plan factoriel). On a choisi d'étudier trois facteurs différents, la dose de PA, le rapport de polymère, le pH d'après le **tableau III.4.**

Tableau III.4 : les différentes masses de PEG, de dextrine et volumes d'extrait de thymus des essais du plan d'expérience factoriel.

Essai	Volume d'extrait (ml)	Masse de Dextrine (mg)	Masse de PEG (mg)
1	4	300	150
2	12	300	150
3	4	300	50
4	12	300	50
5	4	300	150
6	12	300	150
7	4	300	50
8	12	300	50
9	8	300	75
10	8	300	75

Les variables codées sont présentées dans le tableau III.5.

Tableau III.5 : variables codées et réelles des facteurs.

Facteur indépendant	Niveaux		
	-1	0	+1
Dose de PA (X1)	4	8	12
Rapport de polymère (X2)	2	4	6
pH (X3)	4	6	8

La matrice du plan d'expérience est représentée dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : Matrice du plan d'expérience factoriel pour les essais de microencapsulation de l'extrait du thymus dans les polymères Dex/PEG.

Essai N°	X1	X2	X3	Dose (mg)	Rp	Ph
1	-1	-1	-1	4	2	4
2	1	-1	-1	12	2	4
3	-1	1	-1	4	6	4
4	1	1	-1	12	6	4
5	-1	-1	1	4	2	8
6	1	-1	1	12	2	8
7	-1	1	1	4	6	8
8	1	1	1	12	6	8
9	0	0	0	8	4	6
10	0	0	0	8	4	6

III.3.4. Mode opératoire de la préparation de la microencapsulation

- **La phase dispersée**

On fait dissoudre dans un erlenmeyer 300 mg de dextrine, on ajoute 10 ml de huile vaseline à l'aide d'une éprouvette de 20 ml, on laisse le mélange sous agitation (500tour/min) pendant 5 min pour bien homogénéiser la solution puis on l'ajoute PA (thymol) à différentes concentrations (voir le tableau) (**Figure III.24**)

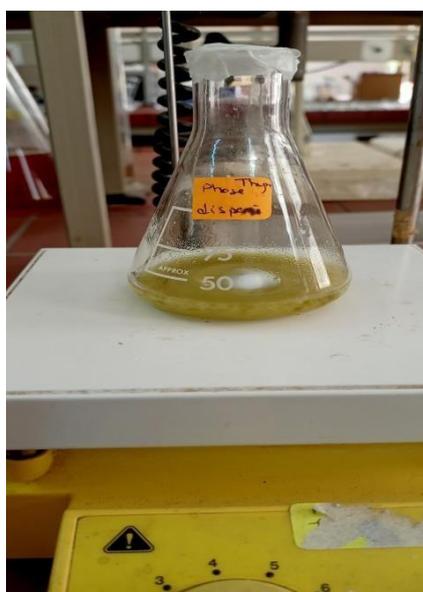


Figure III.24 : La phase dispersée

- **La phase continue**

On fait dissoudre dans un erlenmeyer propre les différentes masses de polymère PEG (suivi tableau), on l'ajoute 20ml de tampon à différentes ph (voir plan expérience) on le laisse sous agitation pendant 2 min puis on l'ajoute 0.2 ml de tension active Glu (glutaraldéhyde) (**Figure III.25**)

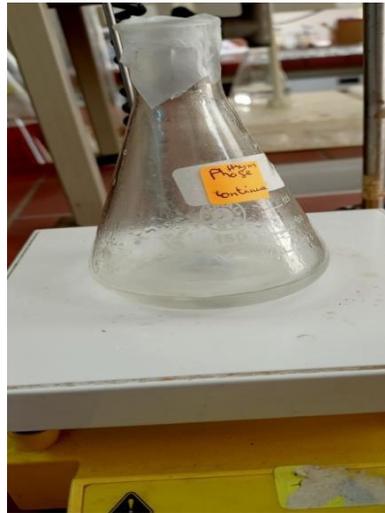


Figure III.25 : La phase continue

- **Emulsification**

On prélève à l'aide d'une seringue de **5 ml** propre toute la phase dispersée et on la verse rapidement dans la phase continue sous agitation **600 tour/ min** à température ambiante pendant **2h** pour former une double émulsion. Après 2h on récupère deux couches (**Figure III.3.7**)



Figure III.26 : émulsion

Ensuite, on filtre l'émulsion à l'aide de papier wataman puis on récupère le filtrat dans un tube bien fermé qui sera dosé par UV- visible (dosage polyphénols totaux et dosage flavonoïdes totaux), et on obtient une suspension laiteuse qui va être laissée sécher à l'aire libre.

Figure III.27



Figure III. 27 : Filtration

III.3.5. Techniques de caractérisation

La méthode a été utilisée pour caractériser les microcapsules obtenues. Le spectrophotomètre UV-visible.

Le spectrophotomètre UV-visible

- **Totaux polyphénols**

0.4 ml de chaque essaie (dilué avec l'éthanol 200 fois), on ajoute **2 ml** de **folin** et **1.6 ml** de solution Na_2CO_3 . Après **2h** d'incubation à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à **765 nm** par rapport à un blanc (sans extrait).

- **La dilution des filtrats (200F) :**

On a fait d'abord la 1^{ère} dilution : **0.1 ml** de filtrat avec **4.9 ml** d'éthanol.

La 2^{ème} dilution : dans la 1^{ère} dilution on prélève **1 ml** de filtrat dilué on ajoute **3 ml** de l'éthanol.

- **Totaux flavonoïdes :**

0.4 ml de chaque essaie (filtrat) avec **2 ml** de la solution AlCl_3 . Après **15 min** d'incubation, l'absorbance est lue à **430 nm** par rapport à un blanc (sans extrait) .

Partie 4 : étudier la cinétique de libération

III.4.1. les matériels utilisés

✓ **Microcapsules de polymère contenant l'extrait (thymol)**

Les microparticules utilisées pour suivre la libération in vitro de l'extrait sont celles obtenues dans l'essai 10 (on a choisi l'essai 10 d'après les analyses UV-visible et HPLC).

✓ **Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)**

L'hydroxyde de sodium utilisé dans ce travail pour préparer les milieux physiologique est fourni par Biochem chemopharma (Montréal, Québec).

✓ **Hydroxyde de sodium (NaOH)**

L'hydroxyde de sodium utilisé dans ce travail pour préparer les milieux physiologique est fourni par Biochem Chemopharma (Montréal, Québec).

III.4.2. Préparation des milieux physiologique

Le milieu physiologique intestinal (pH=6.8) à été préparé en utilisant une solution tampon de phosphate par dissolution de 6.8g de phosphate mono potassique dans 250ml d'eau distillé, mélange à 77ml de la solution NaOH (0.2M), et on complète à 1 litre l'eau distillée. Le pH de la solution est ajusté à 6.8 avec la solution NaOH (2N), par contrôle du pH avec un pH-mètre étalonné de type Hanna.

III.4.3. Protocole expérimental :

L'essai de dissolution est réalisé dans un dissoluteur à godet de 900 ml muni d'un système d'agitation dans lequel est introduite la solution du milieu physiologique maintenu à une température de $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, et à une agitation de 50 tr/min. On dissout une masse de 100mg de les microparticules (essai 10) dans les godets des milieux physiologiques, et on effectue des prélèvements de 1ml à l'aide de la seringue de 5ml suivant des intervalles de temps choisis, en remettant à chaque fois 3ml du milieu physiologique d'après le tableau suivant. Les prélèvements sont filtrés par filtra-seringue puis dosés par spectrophotométrie UV-visible.

T (min)	2	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
V _p (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V _{Ph=6.8} (ml)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3



Figure III.28 : installation du dissolu test mise en œuvre pour l'étude de la cinétique de libération

III.5. Caractérisation par infrarouge IRFT

La spectrophotométrie infrarouge est une technique d'analyse qualitative et quantitative, utilisée pour l'identification des groupements fonctionnels des composés, qui sont caractérisés par leurs bandes d'absorption. Elle consiste à soumettre la molécule au rayonnement IR.

Dans notre étude, l'ensemble des spectres IR ont été enregistrée à l'aide d'un appareil spectrophotométrie infrarouge de modèle SHIMADZU FT IR-8400S, piloté par un ordinateur muni d'un logiciel.

- **Protocole**

L'analyse se fait sur des échantillons sous forme des pastilles préparées sous une pression de 70 KN pendant 2 min, avec un mélange de 80 mg de KBr sec et 2 mg pour (résidu, extrait sec, microparticule, dextrine, PEG)

Chapitre IV :
Résultats et discussions

IV.1. Extraction

IV.1.1. Calcul du rendement massique

L'extrait est obtenu à partir de la plante *Thymus L. Officinalis* par la méthode de macération à froid. Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage de masse d'extrait sec par rapport à la masse initiale de la poudre végétale.

Le rendement obtenu est exprimé par la relation qui suit :

$$R\% = \frac{4,25 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 100 = 21,25\%$$

IV.2. Etude phytochimique

IV.2.1. Quantification par spectrophotométrie UV-visible

IV.2.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux extraits sont quantifiés en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique est utilisé comme standard, les absorbances des solutions étalons sont mesurées à une longueur d'onde de 765nm. Une courbe d'étalonnage a été établie, montrant une relation linéaire avec un coefficient de régression $R^2 = 0,9926$ à partir des résultats obtenus pour l'acide gallique (**Figure IV.1**), son équation est comme suit :

$$Y = 0,0717X - 0,1338$$

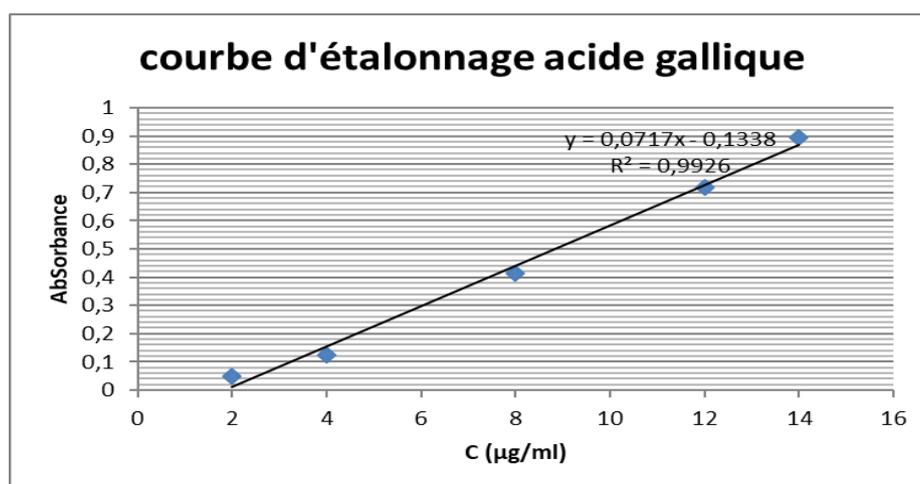


Figure IV.1 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.

Cette droite d'étalonnage a permis l'évaluation de la quantité en polyphénols totaux dans les feuilles de la plante étudiée, exprimée en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec. Les résultats indiquent que tous les extraits de la plante sont riches en polyphénols totaux mais avec des quantités variables d'un extrait à un autre, qui dépendent de la polarité du solvant d'extraction liquide-liquide, comparés à l'extrait brut de macération.

La **figure (IV.2)** montre que l'extrait brut (**E**) possède la plus haute teneur en polyphénols (**2,89 mg EqAG/ g Ex Sec**), suivi par la phase hydro-alcoolique (**HA**) (**1,18 mg Eq AG/ g Ex Sec**), en suite par l'extrait dans le dichlorométhane (**DCM**) (**0,6 mg Eq AG/ g Ex Sec**), et enfin l'extrait d'éther de pétrole (**EP**) (**0,046 mg Eq AG/ g Ex Sec**).

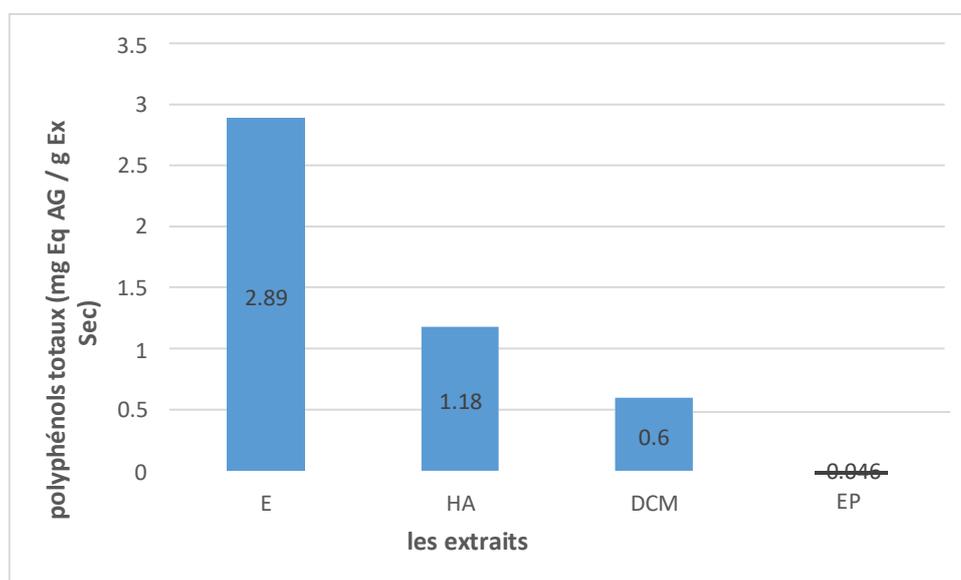


Figure IV.2 : Histogramme de variation des teneurs en polyphénols totaux dans les extraits de *Thymus L. Officinalis*.

Divers facteurs peuvent influencer la variation du profil phénolique des extraits de la plante. Parmi ces derniers, on peut citer la variété de la plante et de l'espèce, les conditions climatiques, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, sa maturité, la température et le type de solvant utilisés lors de l'extraction [156].

Cependant, le contenu phénolique dans les extraits de la plante dépend également du type de l'extrait, c'est-à-dire de la polarité du solvant utilisé dans l'extraction. La solubilité élevée des phénols dans les solvants polaires explique les concentrations plus importantes de ces composés dans les extraits bruts (E) et hydro-alcooliques (HA), en utilisant les solvants très polaires et protiques comme l'eau et l'éthanol ou le méthanol pour l'extraction.

IV.2.1.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée en utilisant la méthode de complexation avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3). Des solutions de quercétine à diverses concentrations ont été utilisées comme étalons pour créer une courbe d'étalonnage. Les absorbances des étalons de quercétine ont été mesurées à une longueur d'onde de 430nm [157].

La courbe d'étalonnage a été tracée à partir des résultats obtenus pour la quercétine (**Figure IV.3**) et exprimée par l'équation suivante :

$$Y = 0,055X + 0,1541 \quad R^2 = 0,989$$

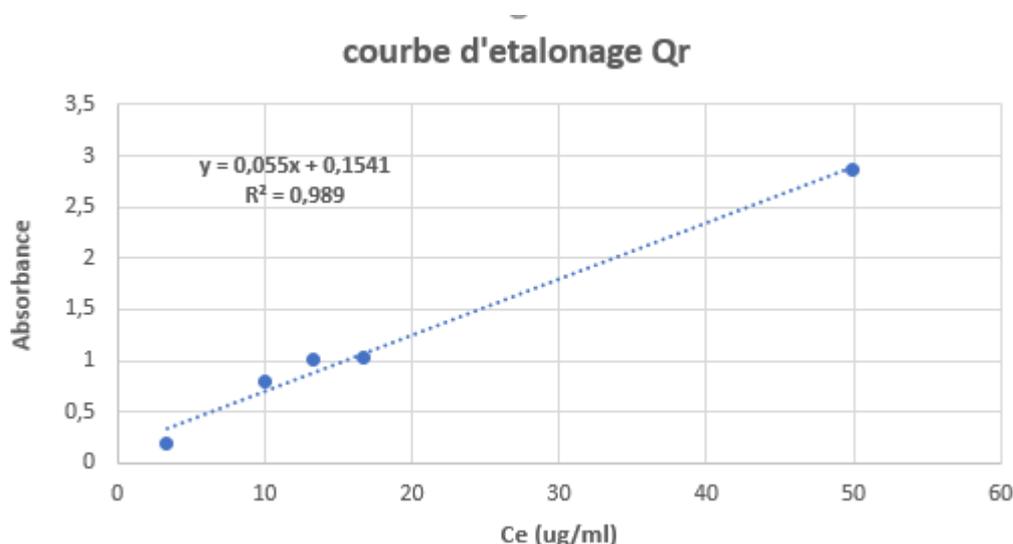


Figure IV.3 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes totaux.

Grâce à cette courbe d'étalonnage, il a été possible d'apprécier la quantité en flavonoïdes totaux présente dans les feuilles de la plante étudiée. Cette quantité a été exprimée en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec considérée comme standard.

Les résultats obtenus, présentés dans la **figure (IV.4)**, montrent que les teneurs en flavonoïdes varient considérablement entre les différents extraits. L'extrait obtenu avec le dichlorométhane (**DCM**) présente la plus grande concentration de flavonoïdes (**0,047mg Eq Q / g Ex Sec**), suivi de près par l'extrait brut (**E**) et l'extrait d'éther de pétrole (**EP**) qui présentes des teneurs légèrement moins élevées (**0,02 mg Eq Q / g Ex Sec**) et (**0,011 mg Eq Q/ g Ex**

Sec) respectivement. Tandis que la teneur la plus basse en flavonoïdes a été retrouvée dans la phase hydro-alcoolique (HA) avec seulement **0,0033 mg Eq Q / g Ex Sec**.

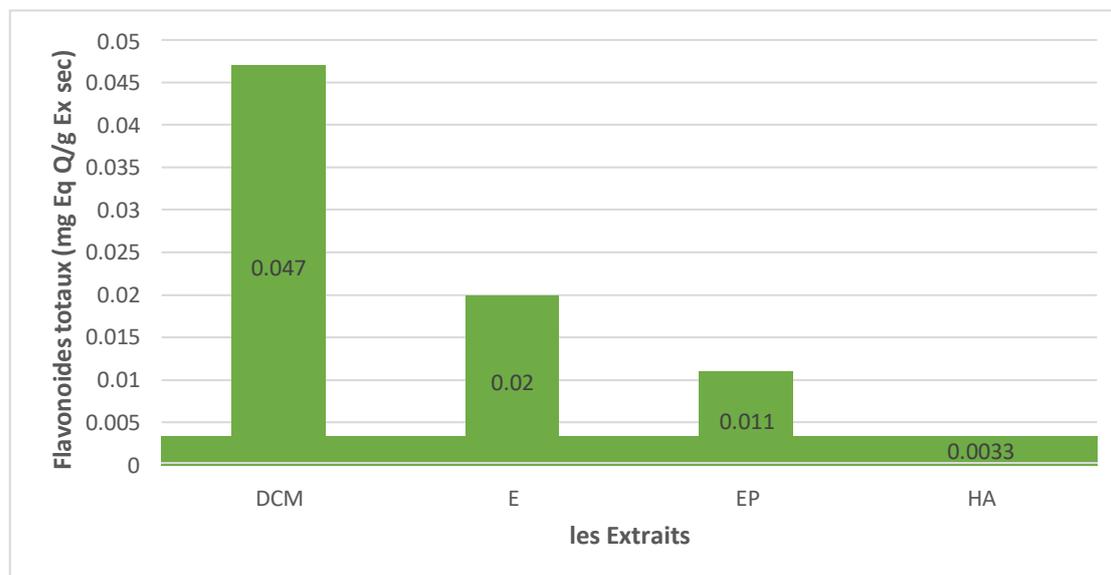


Figure IV.4 : Histogramme de variation des teneurs en flavonoïdes totaux de *Thymus Vulgaris L. officinalis*.

Les recherches effectuées par JG Marco et al. En 1968 indique que la concentration des flavonoïdes dans les extraits de la plante varie en fonction de la polarité des solvants utilisés lors de la préparation des extraits. Ceci est expliqué par le fait que la polarité des flavonoïdes contenus dans le thymus est intermédiaire, et de ce fait ils ont plus d'affinité vis-à-vis du dichlorométhane qui possède une polarité moyenne.

Par ailleurs, il est important de noter que divers facteurs ont une influence sur la quantité de flavonoïdes présents dans les extraits de la plante thymus, tels que la variété et la maturité de la plante, les conditions de culture et la méthode d'extraction utilisée.

IV.2.2. Activité biologique

IV.2.2.1. Activité antioxydante par la méthode DPPH

Les résultats du **tableau IV.1** résument les pourcentages d'inhibition de l'activité antioxydante des extraits de feuilles de thymus.

Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est une mesure de l'activité antioxydante d'un composé ou d'un extrait, où une inhibition plus élevée indique une activité antioxydante plus forte. Dans notre tableau, nous avons présenté les pourcentages d'inhibition pour différents extraits à deux concentrations différentes (100ul et 800ul).

Tableau IV.1 : Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des extraits des feuilles de thymus.

Extraits	HA	DCM	EP	E
Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH % (100ul)	62,36	52,06	0	74,82
Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH % (800ul)	3,51	77,73	35,86	0

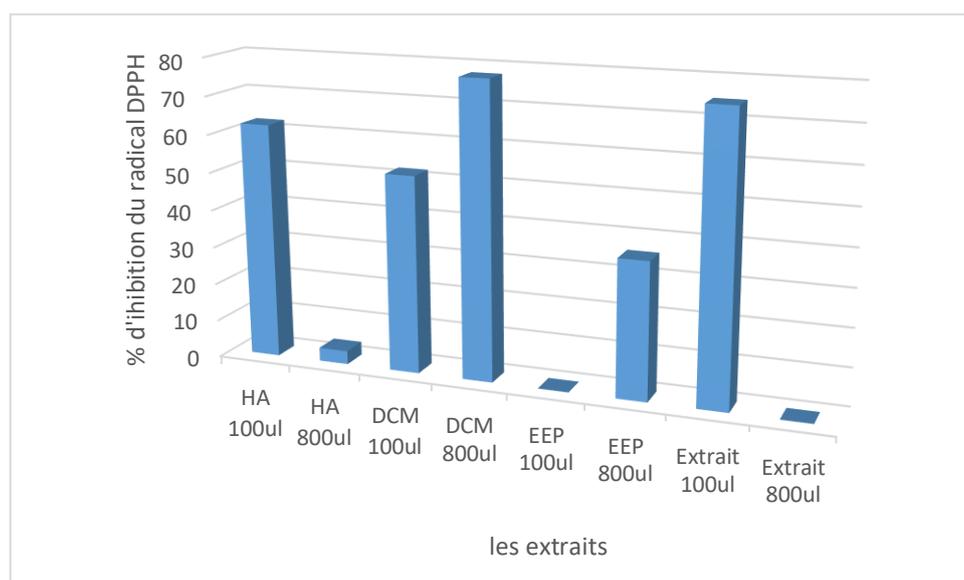


Figure IV.5 : Histogramme de l'activité antioxydante et pouvoir d'inhibition des extraits de *Thymus L. Officinalis*.

D'après la **Figure IV.5**, nous constatons que le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH dépend de la polarité du solvant, elle est la plus élevée et très importante dans l'extrait brut (E) (**74,82 %**), suivi de l'extrait (HA) (**62,36 %**), puis de l'extrait DCM (**52,06 %**), tandis que l'activité antioxydante est nulle dans l'extrait EP (**0%**) pour la quantité de

100 μ L en extrait. Cependant, lorsque on augmente la quantité d'extrait à 800 μ L, nous remarquons des effets inverses, le pourcentage le plus élevé est celui de DCM (**77.73 %**), suivi de celui de EP (**35,86 %**), tandis que celui de HA est très faible (**3.51 %**), alors que celui de l'extrait brut est nul.

Ces résultats sont expliqués par le fait que les solvants polaires et protiques, comme l'eau et l'éthanol influencent la réduction de la DPPH, ce qui fait diminuer le pouvoir d'inhibition de celle-ci. Contrairement, dans les solvants moins polaires tels que le DCM ou apolaires comme l'éther de pétrole, il n'y a présence d'aucun effet de la part de ces solvants sur la réaction de la DPPH. De plus, cette activité antioxydante des extraits pourrait être associée à la teneur en flavonoïdes, qui est plus importante dans le DCM.

Ces variations peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, tels que la composition chimique des extraits, les interactions entre les composés actifs avec les solvants ou des effets spécifiques propres à chaque extrait. Il est essentiel de noter que l'activité antioxydante peut être influencée par de nombreux paramètres comme la nature (apolaire ou polaire et protique) du solvant, et une seule mesure ne suffit pas pour obtenir une vision complète.

IV.3. Caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Trois composés purs, l'acide gallique, la quercétine et le thymol ont été utilisés dans l'analyse HPLC comme Standards. Le premier est un représentant des polyphénols, le second des flavonoïdes et le troisième des huiles essentielles telles que le Thymol et le Carvacrol qui sont deux isomères. Leurs temps de rétentions sont mentionnés dans le **tableau IV.2**.

Les chromatogrammes de l'analyse HPLC sur colonne C18 (apolaire), des extraits de thymus étudié sont présentés dans le **tableau IV.3**. Différentes substances ont été identifiées dans nos extraits par comparaison des chromatogrammes des échantillons avec ceux des substances purs Standard.

Tableau. IV.2 : Les temps de rétention et les aires des pics des standards.

Standard	Temps de rétention (min)	Aire relative (mAU.min)
Acide gallique	1.700	11.019
Quercétine	5.232	64.752
Thymol	13.515	2.445

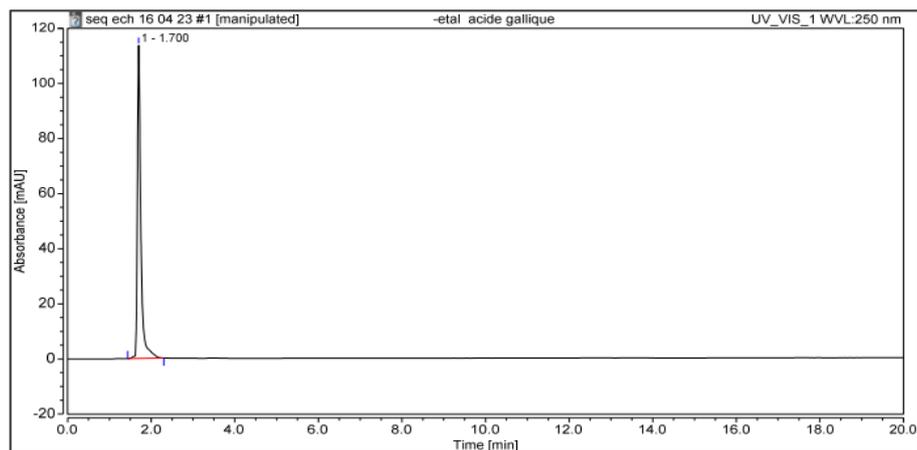
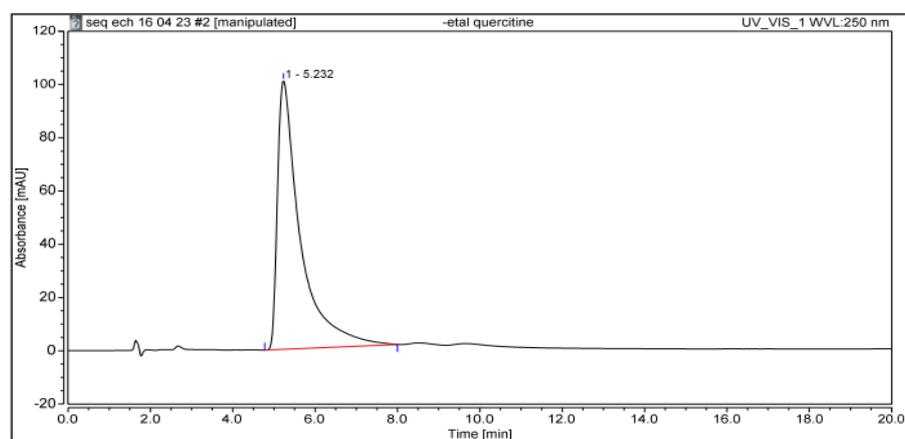
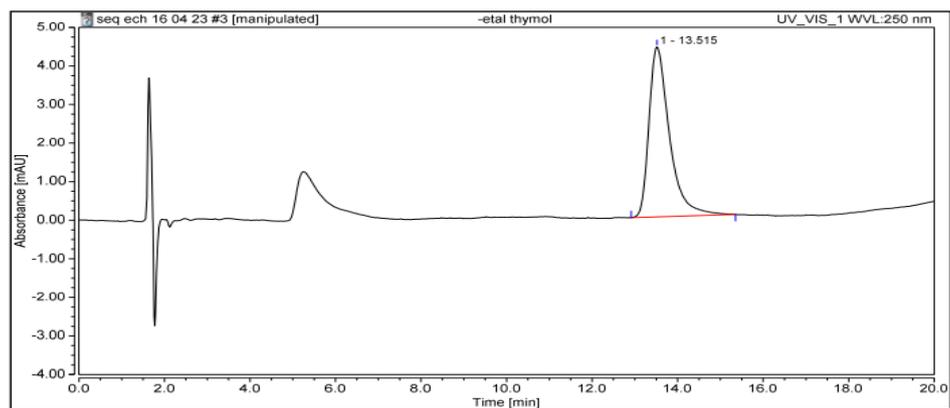
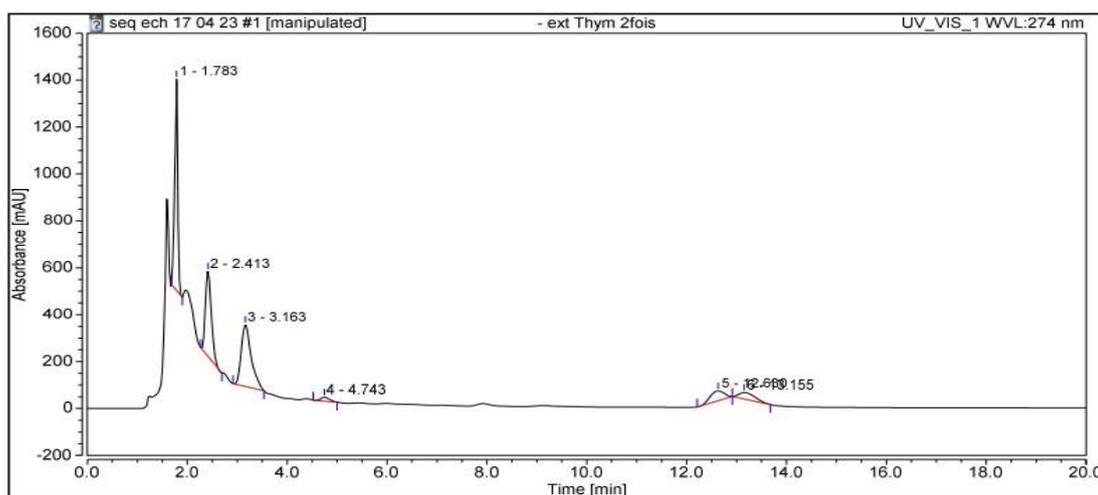
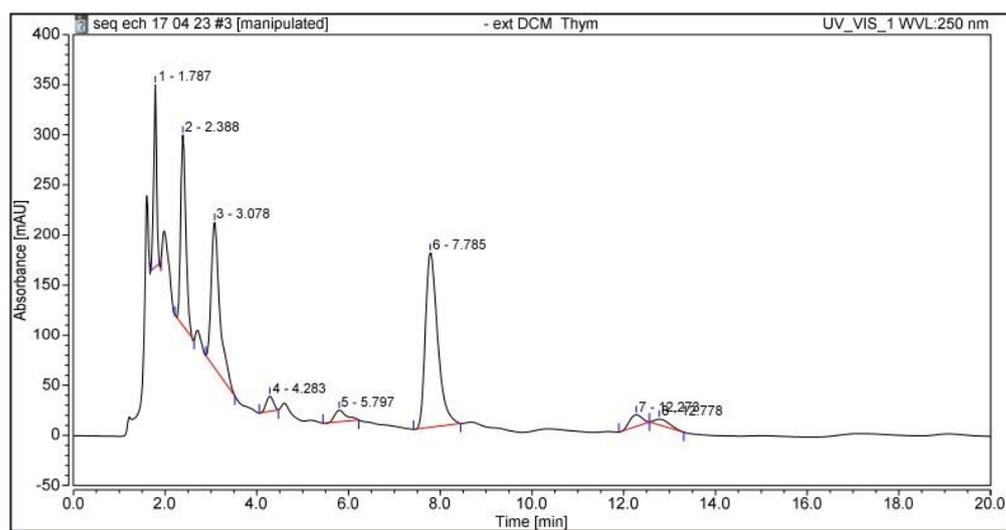
**a. acide gallique****b. Quercétine****c. Thymol****Figure IV.6 : les chromatogrammes des standards**

Tableau IV.3: Temps de rétentions et aires des pics des principes actifs des extraits de *Thymus L. officinalis*.

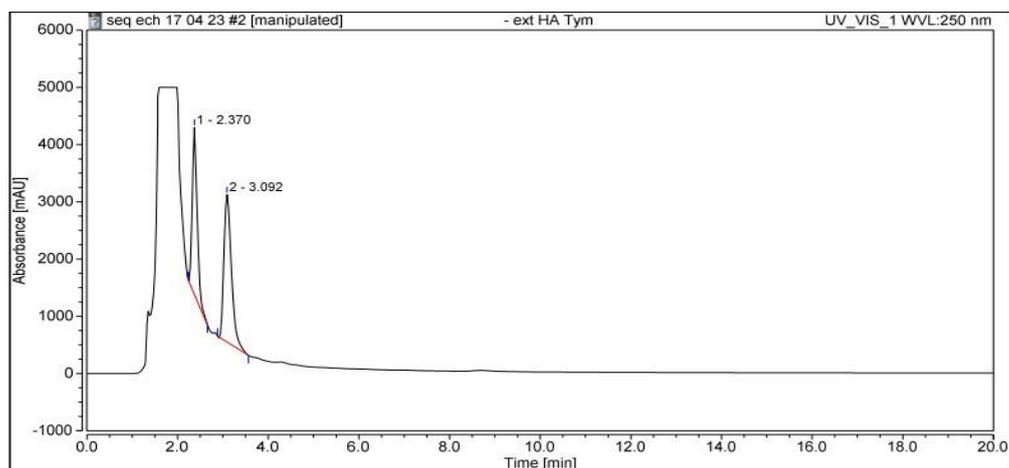
Extrait Standard	Temps de rétention			Aire de pic		
	Extrait brut	HA	DCM	Extrait	HA	DCM
Acide gallique	1.783	1.620	1.787	62.863	2365.699	13.129
Quercétine	4.743	3.092	5.797	3.324	491.049	3.368
Thymol	13.155	-	12.778	10.634	-	2.289
Carvacrol	12.63	-	12.273	13.785	-	3.629



a. Extrait thym



b. Extrait HA



C. Extrait DCM

Figure IV.7 : les chromatogrammes des extraits.

Dans notre étude, on a utilisé une phase stationnaire (colonne C18) apolaire, et une phase mobile polaire et protique (eau, méthanol, acide acétique).

L'ordre d'affinité est que les composés les plus polaires et protiques, qui vont migrer en premier, avec des temps de rétentions plus faibles comme la quercétine. Par contre les composés les moins polaires ayant une affinité vis-à-vis à la phase stationnaire vont migrer plus lentement, et avec des temps de rétentions plus grands (carvacrol, thymol). Ce qui signifie, le thymol et le carvacrol sont les deux composés phénoliques (isomères) qui contiennent

un seul OH et plus de substituant alkyles (isopropyl, méthyles) auront des temps de rétentions plus élevés et proche de 13.155 et 12.630 min respectivement [158]

L'acide gallique possède plusieurs groupes hydroxyles (OH) et une fonction acide, ce qui lui permet de migrer plus rapidement que le thymol, et la quercétine, qui est très polaire car elle possède plus de groupement OH (5), mais de poids moléculaire beaucoup plus élevé que celui de l'acide gallique. Ce qui fait, cet ordre d'élution suit le principe de la séparation par chromatographie à phase inverse, où la polarité et le poids moléculaire influencent l'ordre de séparation, tel que les composés sont séparés dans le sens croissant de leurs poids moléculaires et décroissant de leurs polarités.

Pour déterminer les teneurs en différents principes actifs, nous avons utilisé la relation chromatographique de quantification qui suit, fondée sur la comparaison des aires des pics, standards et extraits et de leurs concentrations par rapport à la même substance ou pour une même famille de composés. Les résultats sont consignés dans le tableau IV.4 et représentés par la figure IV.

$$C(\text{extrait}) = \frac{A \text{ extrait}}{A \text{ étalon}} \times C_e \times F$$

Où,

A extrait : aire de pic du composé dans l'extrait (mAU*min)

A étalon : aire de pic du standard (AG : 2mg/ml ; Qr : 1mg/ml ; Thym : 1mg/ml) (mAU*min)

C_e : la concentration du standard (mg/ml)

F : facteur de dilution (2)

Tableau IV.4 : concentrations des extraits de *Thymus L. Officinalis* par HPLC

	Les extraits	HA	DCM	Ext
Concentration (mg/ml)	Polyphénols : Acide gallique	858.77	4.76	22.82
	Flavonoïdes : Quercétine	15.17	0.104	0.102
	Huiles essen- tielles : Thymol	0	1.87	8.70
	Carvacrol	0	2.97	11.28

❖ Interprétation des résultats :

Les résultats montrent que l'extrait HA est le plus riche en polyphénols (858.77 mg/ml), suivi de l'Extrait brut (22.82 mg/ml), tandis que l'extrait DCM est le moins riche en polyphénols (4.76 mg/ml). L'extrait HA renferme le de quercétine (15.17 mg/ml), alors que les extraits DCM et brut en contiennent les mêmes quantités mais à très faibles concentrations (0.104 et 0.102 mg/ml). Ce qui prouve que l'extrait HA est le plus riche en flavonoïdes.

Contrairement à ceci, l'extrait brut (E) est le plus riche en thymol (8.7 mg/ml) et carvacrol (11.28 mg/ml), qui sont les principaux principes actifs de la plante de thymus. Tandis que dans l'extrait HA, les concentrations en huiles essentielles sont nulles, et elles sont nettement plus faibles dans l'extrait de DCM.

Les valeurs de concentration varient d'un extrait à l'autre, ce qui propose une répartition différente de ces composés selon le solvant utilisé pour l'extraction liquide-liquide.

Il est important de noter que la concentration est exprimée en mg/ml, ce qui donne une indication de la quantité de chaque composé dans un millilitre d'extrait. Cette mesure permet de comparer les extraits entre eux et d'évaluer leur potentiel biologique ou leurs applications potentielles.

Il serait intéressant de comparer ces résultats avec d'autres études ou avec des échantillons de référence, pour évaluer les concentrations de tous les polyphénols et flavonoïdes pouvant exister dans les extraits. De plus, il est possible de réaliser des tests complémentaires ou des analyses chimiques supplémentaires pour approfondir la caractérisation des extraits et mieux comprendre leur composition.

Ces résultats soulignent l'importance de l'extrait brut comme une source potentiellement prometteuse de thymol et de carvacrol, que nous allons sélectionner pour réaliser la formulation par microencapsulation.

IV.4. La microencapsulation :**IV.4.1. Réalisation des essais et analyse statistique**

Le plan factoriel pour trois facteurs et deux réponses expérimentales (taux d'encapsulation en polyphénols et en flavonoïdes), composé de 10 essais dont deux au centre du domaine (essais 9,10) est représenté par le Tableau IV.5.

Tableau IV.5 : Matrice du Plan factoriel avec les réponses expérimentales

Essai N°	X1	X2	X3	EEP%	EEF%
1	-1	-1	-1	79.22	50.00
2	1	-1	-1	92.15	62.17
3	-1	1	-1	77.37	42.32
4	1	1	-1	93.72	54.36
5	-1	-1	1	83.84	88.31
6	1	-1	1	93.65	55.46
7	-1	1	1	83.84	91.49
8	1	1	1	87.25	68.95
9	0	0	0	91.92	75.10
10	0	0	0	91.92	75.48

L'évaluation statistique des données et la représentation graphique des résultats ont été réalisées par le logiciel MINITAB version 2017.

❖ Utilisation du logiciel

Les logiciels de plan d'expérience possèdent des bibliothèques de plan classiques et ils permettent aussi de construire les plans particuliers. Le logiciel choisi dans cette étude est le Minitab. Il est programmé pour calculer les réponses dans tous les domaines d'étude, pour effectuer les analyses de variance, pour tracer les courbes d'iso-réponses, pour construire les surfaces de réponse et pour déterminer les zones d'intérêt.

Pour réaliser un plan d'expériences à l'aide du logiciel Minitab, il faut définir les réponses, les facteurs et leurs niveaux, les modalités d'introduction de ces données sont pratiquement les mêmes pour tous les plans.

Le modèle mathématique postulé est un modèle du second degré et degrés 2 d'interactions par rapport à chaque facteur : $Y = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + a_3 x_3 + a_{12} x_1 x_2 + a_{13} x_1 x_3 + a_{23} x_2 x_3 + e$

Où :

Y : est le vecteur de réponse.

a_0 : est la valeur de la réponse au centre du domaine d'étude.

a_i : est l'effet (ou effet principal) du facteur X_i .

e : est le vecteur de l'écart.

a_i ($i=1, 2, 3$) représente le coefficient des facteurs X ($i=1, 2, 3$).

($i=1, 2, 3$) représente l'effet du changement d'un facteur du niveau bas vers le niveau haut.

L'interaction X_iX_j , représente l'effet de deux facteurs en même temps sur la réponse.

Dans ce cas, les réponses Y_i correspondant aux : taux des polyphénols (EEP%) et taux de flavonoïdes (EEF%) encapsulés, en fonction des facteurs étudiés sont données par les équations suivantes ((1) ; (2)).

IV.4.1.1. Taux d'encapsulation en polyphénols EEP% :

1. Analyse de la variance et équation du modèle pour EEP % :

L'analyse statistique permet d'évaluer les écarts de la valeur de la réponse donnée par le modèle, par rapport à la valeur expérimentale pour chaque terme de l'équation du modèle ainsi que son ajustement. Elle donne l'estimation de la probabilité p-value à un intervalle de confiance de 95%, que la valeur prédite ne s'écarte pas plus de 5% de la valeur expérimentale. Les erreurs et l'ajustement des valeurs sont soumis aux tests de Student (t) (écart de la droite de la valeur prédite en fonction de la valeur expérimentale par rapport à l'origine) et de Fisher F (écart du modèle par rapport à la linéarité, écart de la valeur ajustée par rapport à la valeur moyenne). Les paramètres du contrôle statistique ainsi que leurs valeurs sont présentés dans le tableau IV.6. L'équation du modèle linéarisé qui prédit le mieux la réponse EEP% en variables codées est :

$$EEP (\%) = 86,380 + 5,313 X_1 - 0,835 X_2 + 0,765 X_3 - 0,373 X_1 * X_2 - 2,008 X_1 * X_3 - 0,765 X_2 * X_3 + 5,54 Ct Pt..... (1)$$

Tableau IV.6 : analyse statistique de la variance pour la réponse EEP%

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Modèle	7	323,180	46,169	7,66	0,120
Linéarité	3	236,041	78,680	13,05	0,072
X1	1	225,781	225,781	37,46	0,026
X2	1	5,578	5,578	0,93	0,438
X3	1	4,682	4,682	0,78	0,471
Termes d'interaction	3	38,032	12,677	2,10	0,338
X1*X2	1	1,110	1,110	0,18	0,710
X1*X3	1	32,240	32,240	5,35	0,147
X2*X3	1	4,682	4,682	0,78	0,471
Erreur	2	12,054	6,027		
Manque d'ajustement	1	12,054	12,054		
Total	9	335,234			
Validation du Modèle	R² (%) = 96,40			R² ajusté (%) = 83,82	

La valeur du coefficient de détermination $R^2 = 96,40\%$ est acceptable et $R^2_{\text{ajusté}} = 83,82$ est assez bon, ce qui indique que 3,6% n'est pas expliqué par le modèle.

2. Diagramme de Pareto pour EEP% :

L'analyse de graphe de Pareto (**Figure IV.8**) nous permet d'évaluer les effets principaux des paramètres ainsi que ceux de leurs interactions sur le facteur étudié. Le diagramme de Pareto est l'un des moyens simples pour classer les paramètres par ordre d'importance. Le graphe de Pareto correspondant montre que les facteurs qui sont les plus significatifs et ont les effets les plus importants sur la réponse (EEP%) est le facteur A (X1=dose en PP), suivi du terme d'interaction AC (X1.X3= Dose. PH). Les colonnes qui dépassent le trait en pointillé rouge à **4,303** sont considérées comme étant statistiquement significatives et permettent de prédire la réponse. Le terme d'interaction AB (dose, Rp) est celui qui a le moins d'influence sur la valeur de la réponse EEP. X1 et X3 influencent synergiquement (augmentent) les valeurs du taux, tandis que X2 et les termes d'interaction influencent négativement les taux EEP.

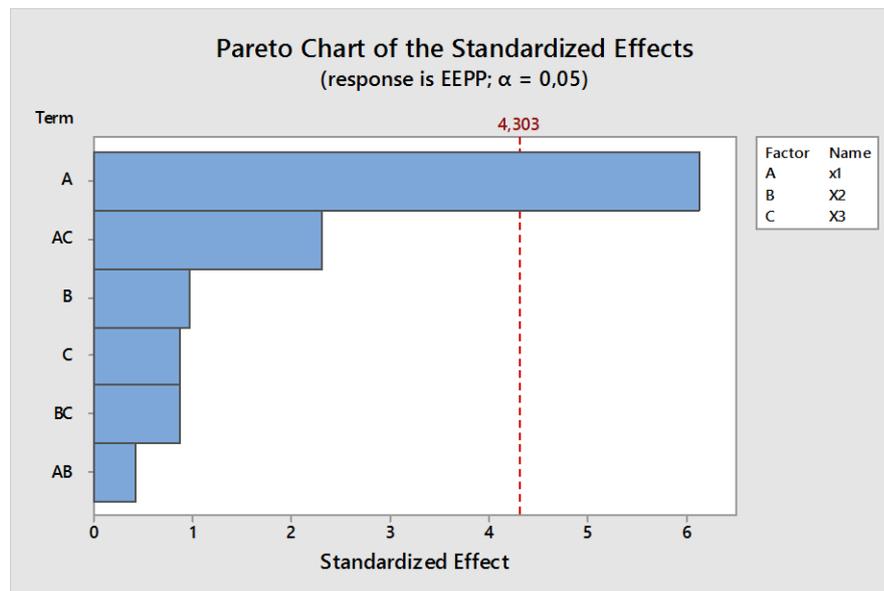


Figure IV.8 : Diagramme de Pareto pour la réponse EEP%.

3. Optimisation de la réponse EEP% :

Cette partie a pour but de déterminer analytiquement les valeurs optimales des paramètres opératoires, ayant une influence sur le taux d'encapsulation des polyphénols (EEP%). Le graphe d'optimisation est représenté sur la **Figure IV.9**.

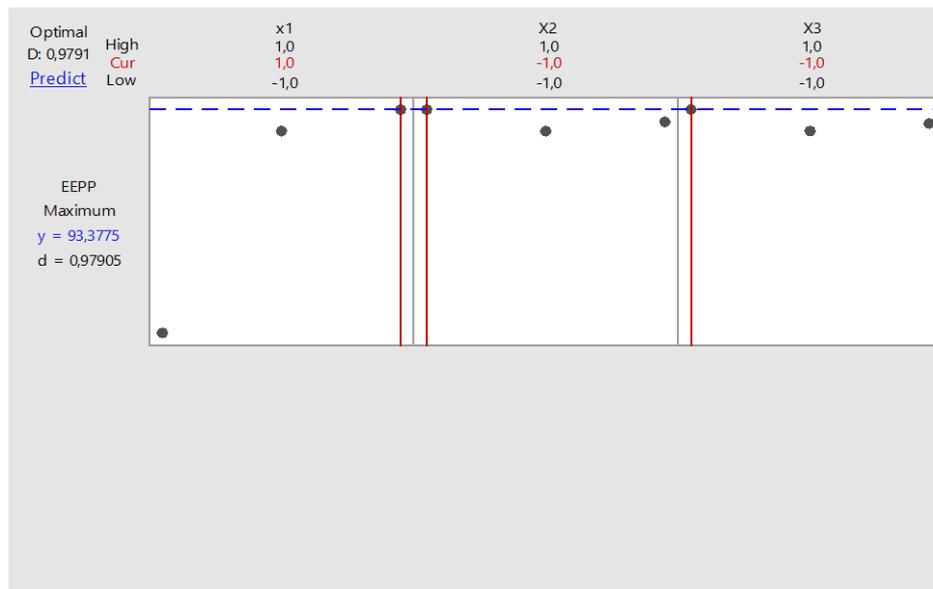


Figure IV.9 : Optimisation de la réponse pour EEP %

Celle-ci donne les niveaux des facteurs qui maximisent la réponse EEP % (les niveaux sont colorés en rouge et la réponse en bleu). Pour atteindre le meilleur taux d'encapsulation en polyphénols EEP%= 93,3775%, on doit assurer les conditions suivantes :

- La dose au niveau +1 : D= 12mg (dose maximale)
- Le RP au niveau -1 : RP= 2 ($m_{Dex} = 300mg$; $m_{PEG} = 150mg$)
- Le pH au niveau -1 : pH= 4 (acide).

4. Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEP% :

Le diagramme des effets des principaux facteurs (Figure IV.10) nous renseigne sur l'influence simultanée de tous les facteurs sur le taux d'encapsulation en polyphénols (EEP%) :

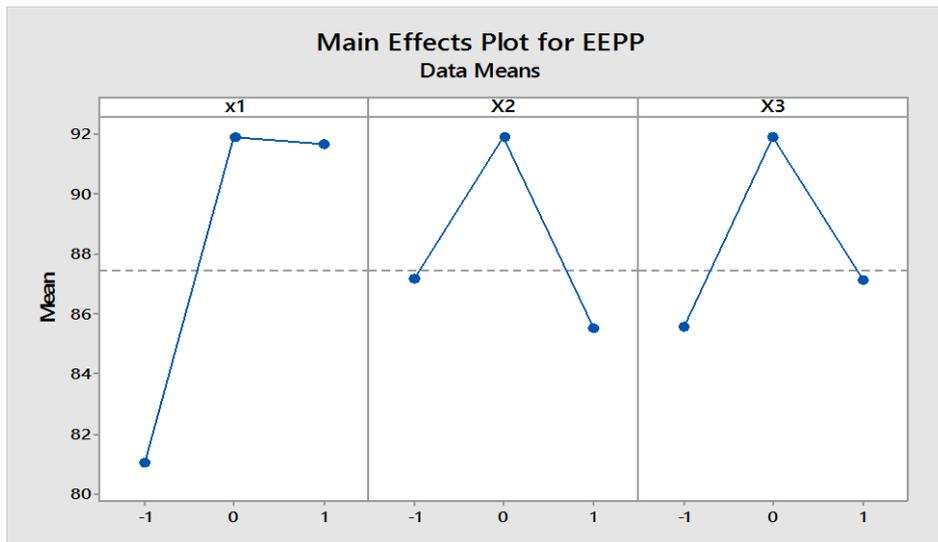


Figure IV.10: Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEP%

D'après la **figure IV.10** on remarque que :

- Plus la dose s'approche de la valeur de 8mg au niveau 0 plus le taux d'encapsulation en polyphénols est meilleur jusqu'à ce qu'il soit maximal pour une Dose=8mg, puis diminue un peu pour une dose maximale D=12mg.
- Le taux d'encapsulation augmente en augmentant le RP en partant de 2 au niveau -1 jusqu'à 4 au niveau 0 puis il diminue en augmentant le RP.
- Le taux d'encapsulation en polyphénols augmente pour un Ph allant de 4 jusqu'à 6 puis diminue jusqu'à atteindre un pH = 8.

5. Les diagrammes surface-réponse ou contours pour EEP% :

La **figure IV.11** représente les graphiques de contours qui illustrent l'évolution de la réponse (Taux d'encapsulation en polyphénols EEP%) en fonction des niveaux des facteurs.

Le diagramme de contour des deux facteurs dose et pH. Les deux facteurs nous renseignent sur l'évolution de la réponse qui est représentée par une région verte foncée prise dans un intervalle de pH entre 4 et 5 et une dose de 10.5mg à 12mg. Pour les facteurs Rp et pH, la réponse est optimale avec un Rp allant de 2 à 5,5 et un pH compris dans le domaine [5,8- 8]. En ce qui concerne la réponse du système pour les facteurs Rp et D, cette dernière est optimale avec une dose variant entre 10,5 et 12mg et le Rp de 2 à 2,8. Lorsque les facteurs RP, D, pH sont respectivement fixés à ces valeurs, nous avons observé un taux d'encapsulation en polyphénols (EEP%) supérieure à 92%.

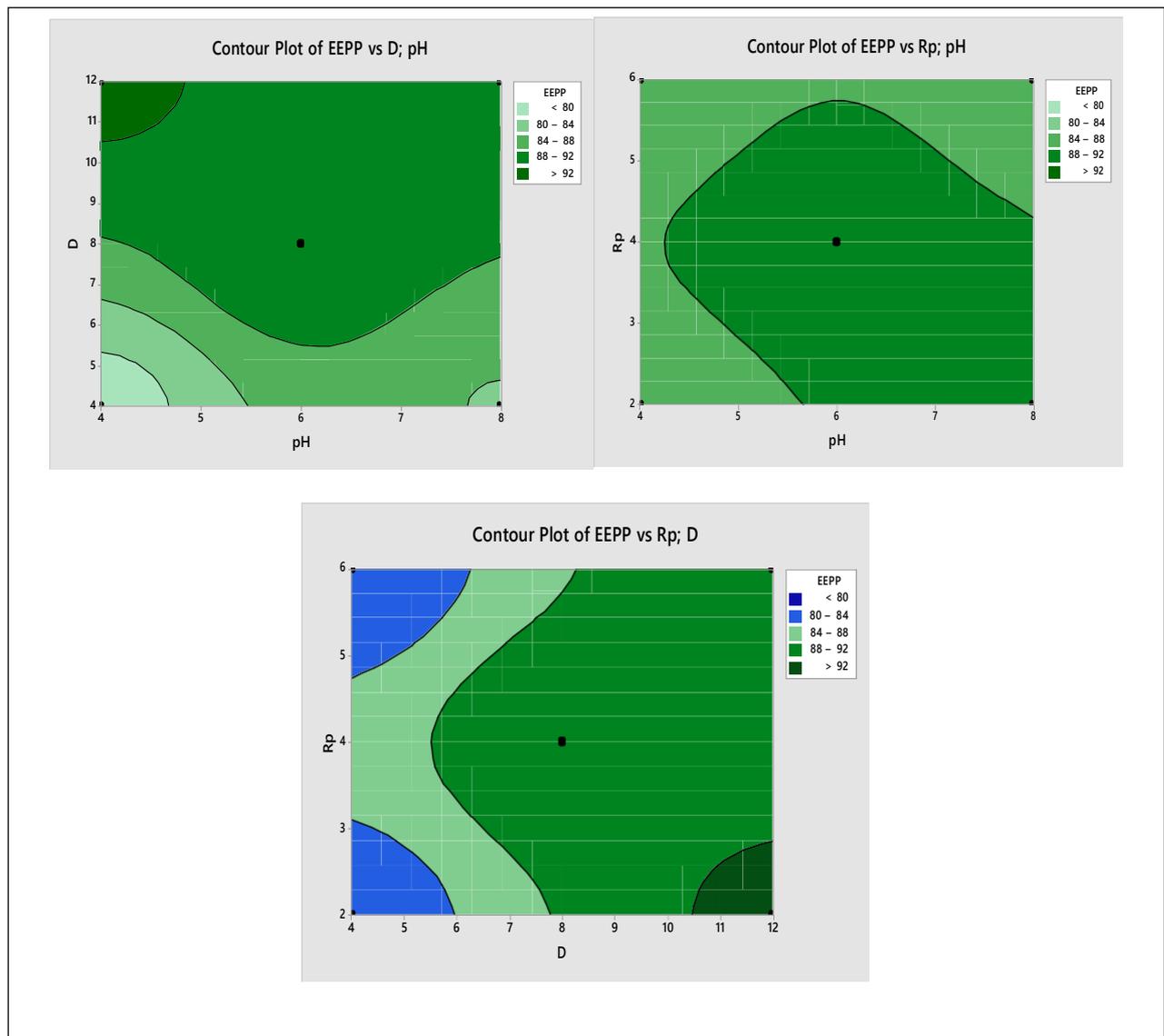


Figure IV.11 : les diagrammes surface-réponse et contour pour EEP%

IV.4.1.2. Taux d'encapsulation des flavonoïdes :

1. Analyse de la variance et équation du modèle pour EEF % :

Les paramètres du contrôle statistique ainsi que leurs valeurs sont présentés dans le tableau IV.7. L'équation du modèle linéarisé qui prédit le mieux la réponse EEF% en variables codées est exprimée ainsi :

$$\text{EEF (\%)} = 64,133 - 3,897 X_1 + 0,147 X_2 + 11,920 X_3 + 1,272 X_1.X_2 - 9,950 X_1.X_3 + 4,020 X_2.X_3 + 11,16 \text{ Ct.Pt}$$

Tableau IV.7 : analyse statistique de la variance pour la réponse EEF%

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Modèle	7	2391,83	341,69	49,89	0,020
Linéarité	3	1258,39	419,46	61,25	0,016
X1	1	121,52	121,52	17,75	0,052
X2	1	0,17	0,17	0,03	0,888
X3	1	1136,69	1136,69	165,98	0,006
Termes d'interaction	3	934,26	311,42	45,47	0,022
X1*X2	1	12,95	12,95	1,89	0,303
X1*X3	1	792,02	792,02	115,65	0,009
X2*X3	1	129,28	129,28	18,88	0,049
Erreur	2	13,70	6,85		
Manque d'ajustement	1	13,62	13,62	188,70	0,046
Total	9	2405,53			
Validation du Modèle	R² (%) = 99,43			R²_{ajusté} (%) = 97,44	

La valeur du coefficient de détermination est très élevée estimé à $R^2 = 99,43\%$ et $R^2_{\text{ajusté}} = 97,44\%$ est également très important, ce qui montre que l'équation du modèle pour EEF permet de mieux prédire la valeur de la réponse et il est bien expliqué. Donc il existe une bonne corrélation entre les valeurs mesurées et les valeurs calculées.

2. Diagramme de Pareto pour EEF% :

Le diagramme représenté sur la **Figure IV.12**, permet d'extraire les paramètres les plus importants. Les barres qui représentent les facteurs C ($X_3 = \text{pH}$) et AC ($X_1 X_3 = \text{dose. PH}$) sont les plus significatifs dans l'intervalle de confiance de 95% correspondant à la $p\text{-value} = 0.05$, suivis du terme d'interaction BC ($X_2 X_3 = \text{Rp. PH}$) se trouve à la limite. Les autres termes A ($X_1 = \text{dose}$), AB ($X_1 X_2 = \text{dose. Rp}$) et B ($X_2 = \text{Rp}$) ne sont pas statistiquement significatifs, du fait qu'ils sont inférieurs à la limite indiquée par le diagramme de Pareto. Les termes X2, X3 et d'interaction X1.X2 et X2.X3 influencent synergiquement la réponse (coefficients positifs), tandis que les termes X1 et d'interaction X1.X3 font au contraire diminuer (coefficients négatifs) le taux d'encapsulation des flavonoïdes (EEF%).

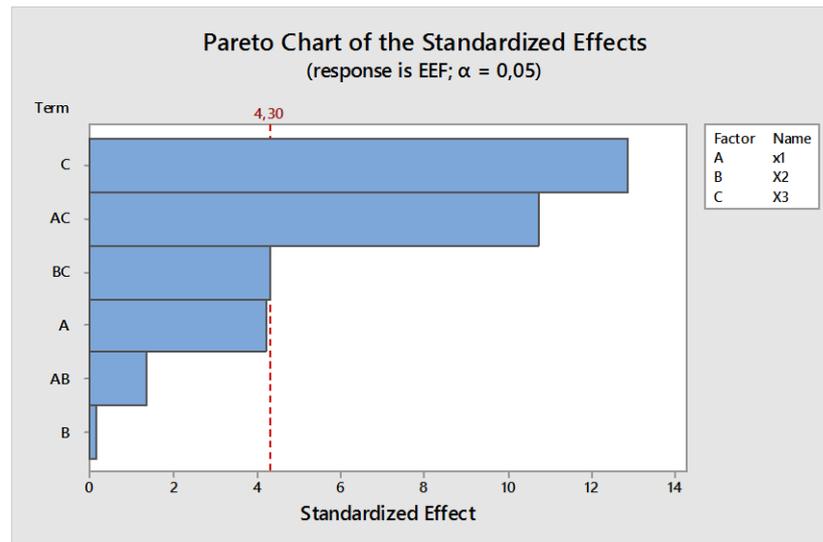


Figure IV.12 : Diagramme de Pareto pour EEF%.

3. Optimisation de la réponse EEF% :

D'après la **figure IV.13**, on conclut que pour avoir le meilleur taux d'encapsulation en flavonoïdes $y = 92,7950\%$, on doit fournir ces valeurs des 3 paramètres :

- La dose au niveau -1 : Dose = 4mg (dose minimale)
- Le RP au niveau +1 : RP = 6 ($m_{Dex} = 300\text{mg}$; $m_{PEG} = 50\text{mg}$)
- Le pH au niveau +1 : pH = 8 (basique).

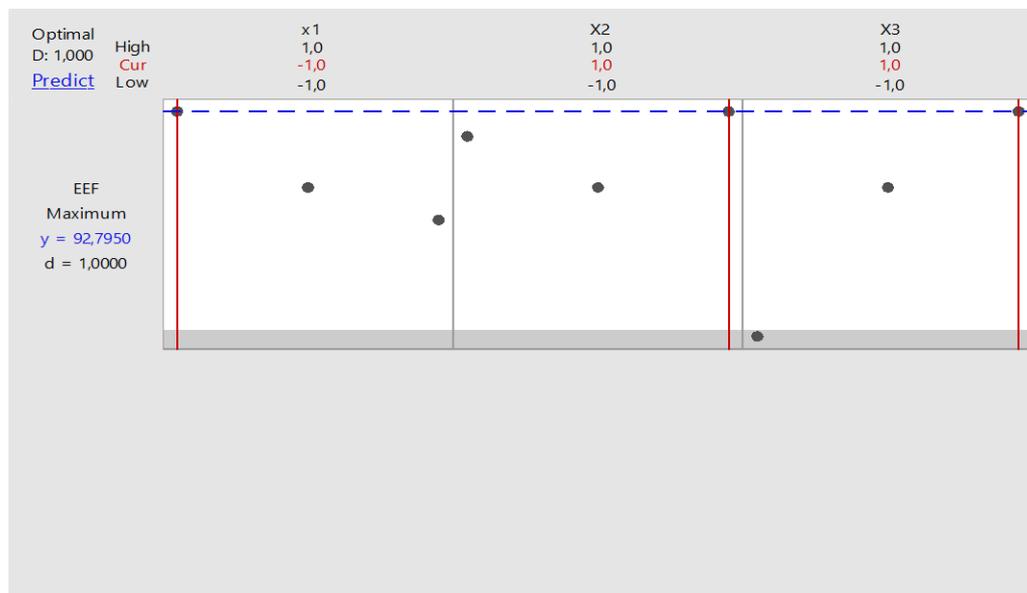


Figure IV.13 : Optimisation de la réponse pour EEF%.

4. Diagramme des effets des principaux facteurs pour EEF% :

D'après la **Figure IV.14** on remarque que :

- Le taux d'encapsulation en flavonoïdes augmente pour une dose allant de 4 mg au niveau -1 jusqu'à 8 mg au niveau 0, puis diminue jusqu'à atteindre une dose $D=12$ mg au niveau 1.
- Même observation pour R_p , le taux d'encapsulation augmente avec la valeur de R_p de 2 (-1) à 4 (0), puis diminue à 6 (1).
- On remarque que le taux d'encapsulation en flavonoïdes augmente aussi avec le pH, cette augmentation est plus importante entre le $pH=4$ (-1) et $pH=6$ (0), mais elle est négligeable jusqu'à la valeur maximale du $pH=8$ (1).

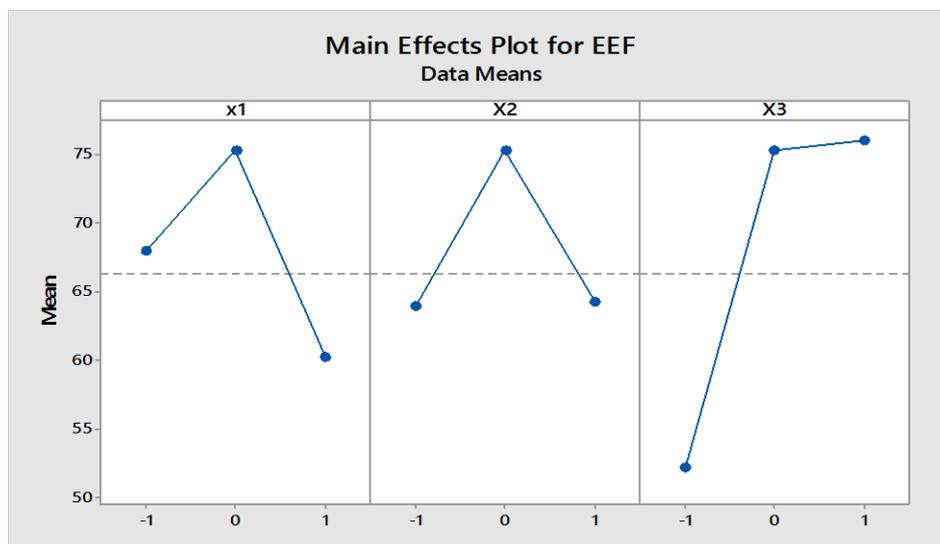


Figure IV.14 : Diagramme des effets des principaux facteurs sur la réponse EEF%.

5. Les diagrammes surface-réponse ou contours pour EEF% :

La réponse du système pour les facteurs R_p et D conjugués, est optimisée avec une dose variant entre 5 à 10,5 mg et un R_p de 2,5 à 5. Pour les facteurs PH et R_p , cette réponse est optimisée quand les deux facteurs sont élevés. Enfin, concernant la réponse du système pour les facteurs D et PH , cette dernière est optimisée avec un PH variant entre 6,8 et 8 et une dose de 4 à 6,5 mg (**Figure IV.15**).

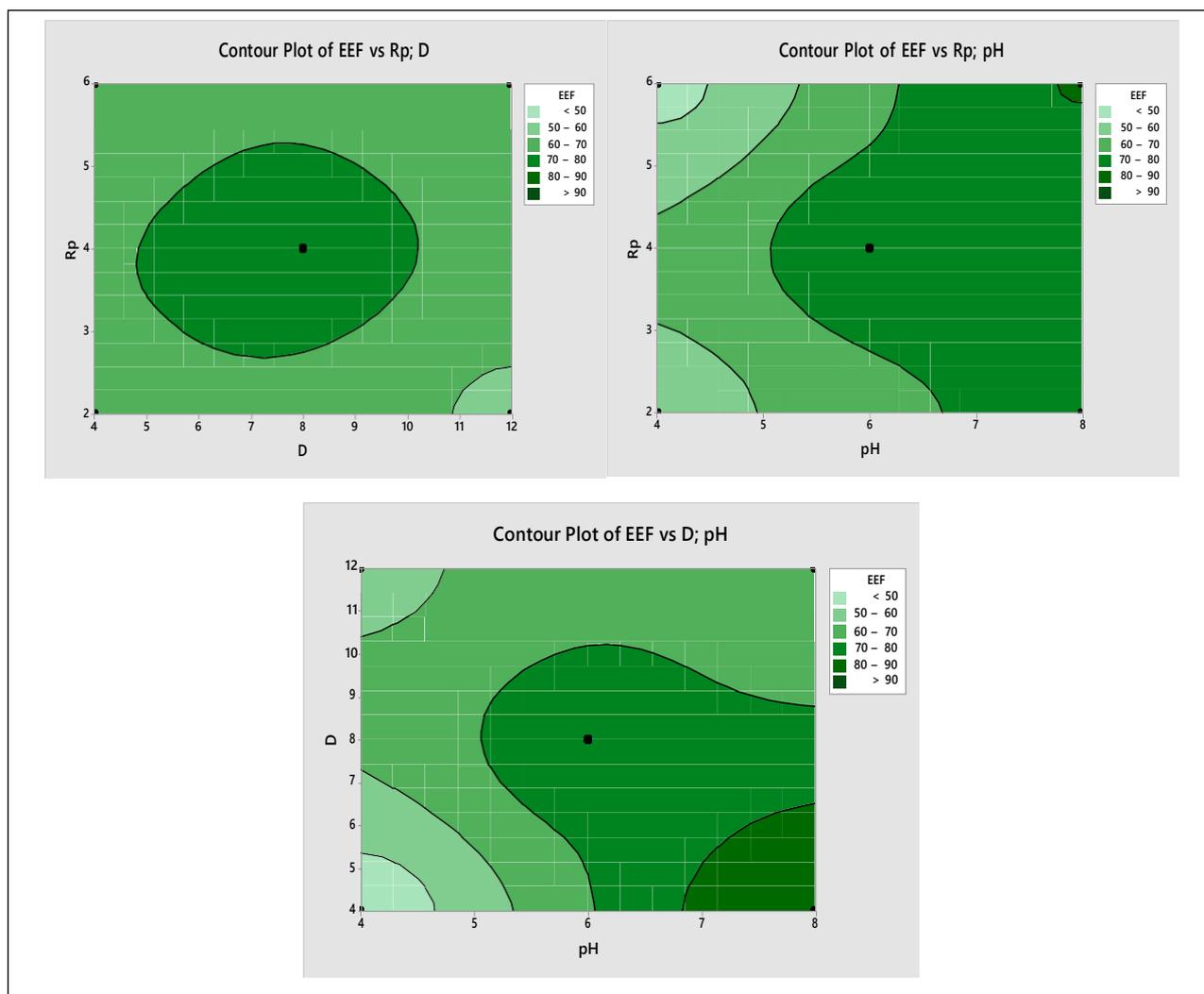


Figure. IV.15 : diagrammes surface-réponse ou contour pour EEF%.

IV.5. Etude de libération in vitro des principes actifs encapsulés dans les microparticules de PEG / Dextrine.

La cinétique de libération des principes actifs (Polyphénols, Flavonoïdes et thymol) à partir des microcapsules de PEG / Dextrine, a été étudiée dans le milieu intestinal. On a fait l'étude sur la meilleure formulation, correspondant au meilleur taux d'encapsulation en polyphénols et en flavonoïdes optimisés par plan d'expérience.

IV.5.1. Profil de libération dans le milieu intestinal.

Le **Tableau IV.8** représente le taux de libération des polyphénols, flavonoïdes et l'inhibition du radical DPPH dans le milieu intestinal en fonction du temps, des microparticules préparées dans les conditions optimales.

Tableau IV.8 : taux de libération des polyphénols, flavonoïdes et l'inhibition de radical DPPH en fonction du temps des microparticules de PEG / Dextrine préparées dans les conditions optimales, dans le milieu intestinal (pH= 6.8).

t (min)	2	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
C (mg/ml) PP	1.86	1.60	1.64	1.54	1.53	1.68	1.54	2.08	1.63	1.88	1.56	1.64	1.64
Taux de libération Polyphénols (%)	50.68	43.60	44.69	41.96	41.69	45.78	41.96	56.67	44.41	51.23	42.51	44.69	44.69
C (mg/ml) flavonoïde	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Taux de libération flavonoïde (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inhibition de DPPH (%)	5.28	35.47	4.62	0.99	0	0	4.95	5.78	9.9	2.47	5.47	7.59	10.06

- D'après la **Figure IV.16** on remarque que la libération des polyphénols est très rapide pendant les premières minutes, suivies d'une décroissance de la vitesse à partir de 20min et tend à former un palier de saturation avec un taux de 56.67% à 70min, et juste après on remarque une décroissance de la vitesse à la fin de la dissolution (120 min).
- Pour les flavonoïdes, on observe une absence totale de libération dans un milieu intestinal pendant 2h. Cela signifie que la libération des flavonoïdes peut suivre un modèle cinétique de libération à effet retard. La libération des flavonoïdes peut commencer après 2h ou plusieurs jours.

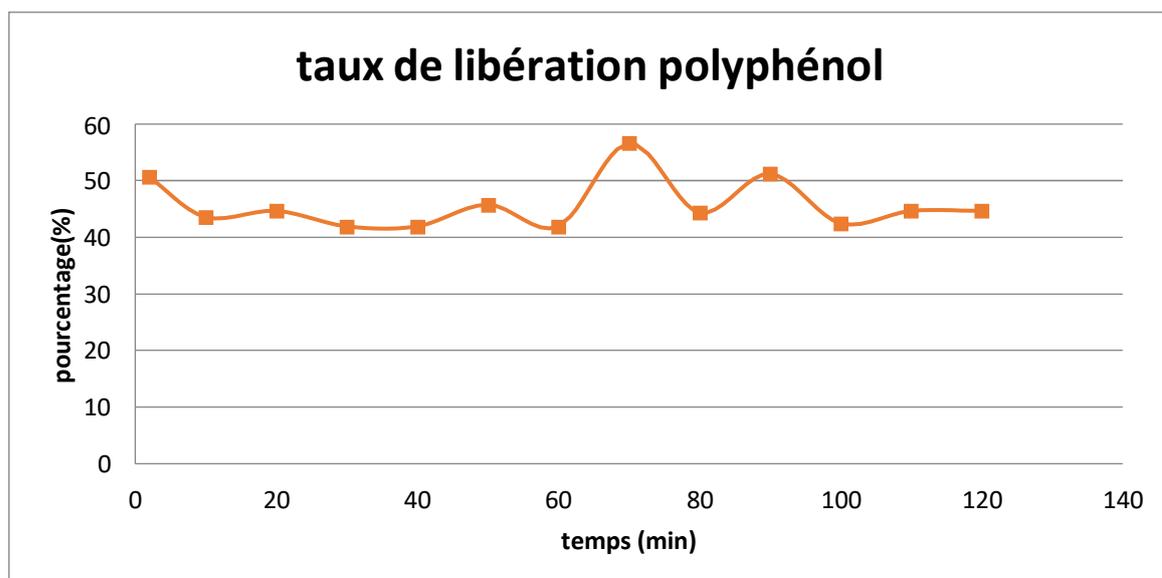


Figure IV.16 : Courbe de la cinétique de libération des polyphénols dans le milieu intestinal (PH=6.8)

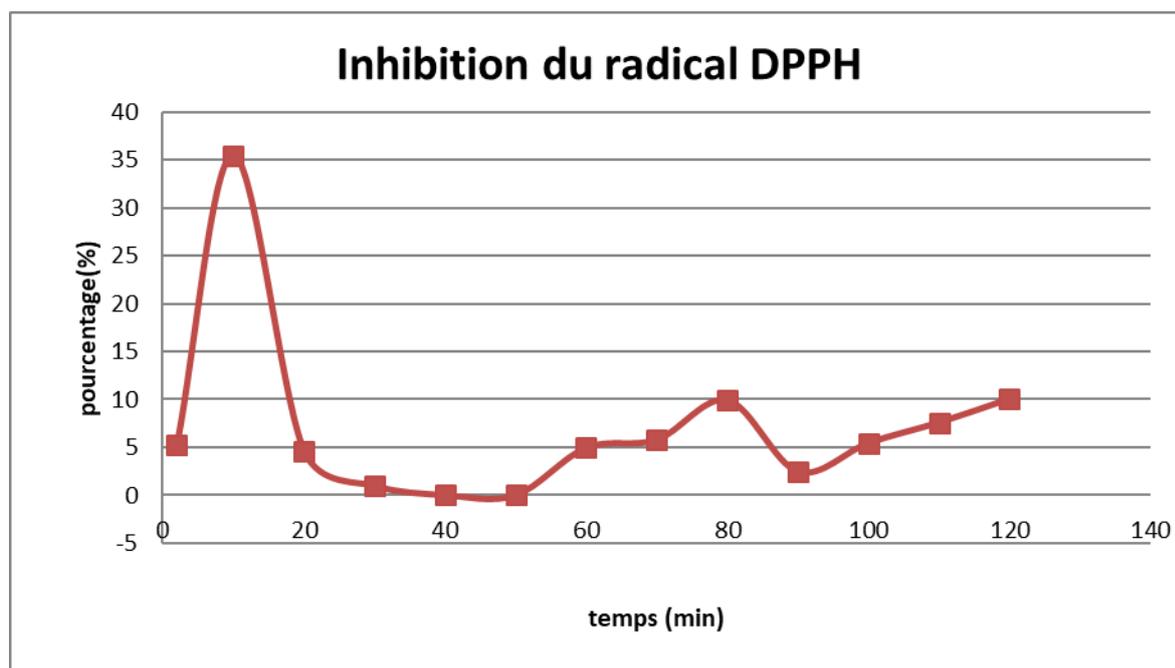


Figure IV.17 : Profil de la variation du taux d'inhibition du radical DPPH en fonction du temps des microparticules PEG / Dextrine, dans le milieu intestinal (pH=6.8).

Les résultats obtenus (**Figure IV.17**), montrent que les variations de l'activité antioxydante par DPPH en fonction du temps varient comme suit :

De 2min à 10min, on observe une augmentation de l'activité antioxydante de 5.28% jusqu'à 35.47%, puis on remarque une forte décroissance de 10min à 30min. L'activité antioxydante est nulle entre 30 et 50 minutes, puis le pourcentage d'inhibition augmente progressivement pour atteindre 10.06% à 120min.

Ces résultats peuvent être expliqués par l'existence d'autres principes actifs (tanins) dans les extraits, qui peuvent se libérer et influencer l'activité antioxydante. De plus, il se peut que le milieu physiologique intestinal dégrade en partie les polyphénols et les flavonoïdes au cours de leur libération.

IV.6. Caractérisation par infrarouge FTIR

Les spectres IR de l'extrait brut (E) de *thymus L. officinalis* après évaporation sec et des microcapsules de Dex/PEG/Extrait thymus obtenus, ont été enregistrés dans le domaine des nombres d'onde [4000-400cm⁻¹]. L'analyse des spectres IR (IV.22, IV.23) par comparaison avec les spectres des références (standards) (Figure IV.16, IV.17, IV.18, IV.19, IV.20, IV.21), qui sont l'acide gallique, la quercétine, la dextrine, le glutaraldéhyde, le PEG6000 et le thymol.

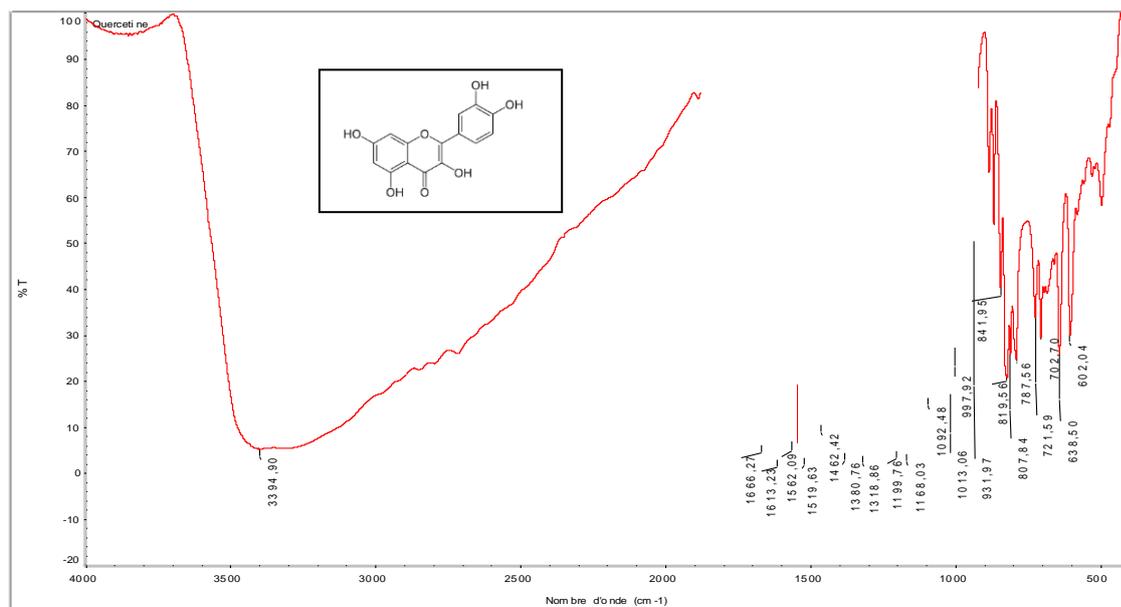


Figure IV.18 : spectre infrarouge IRFT de la quercétine dans le KBr.

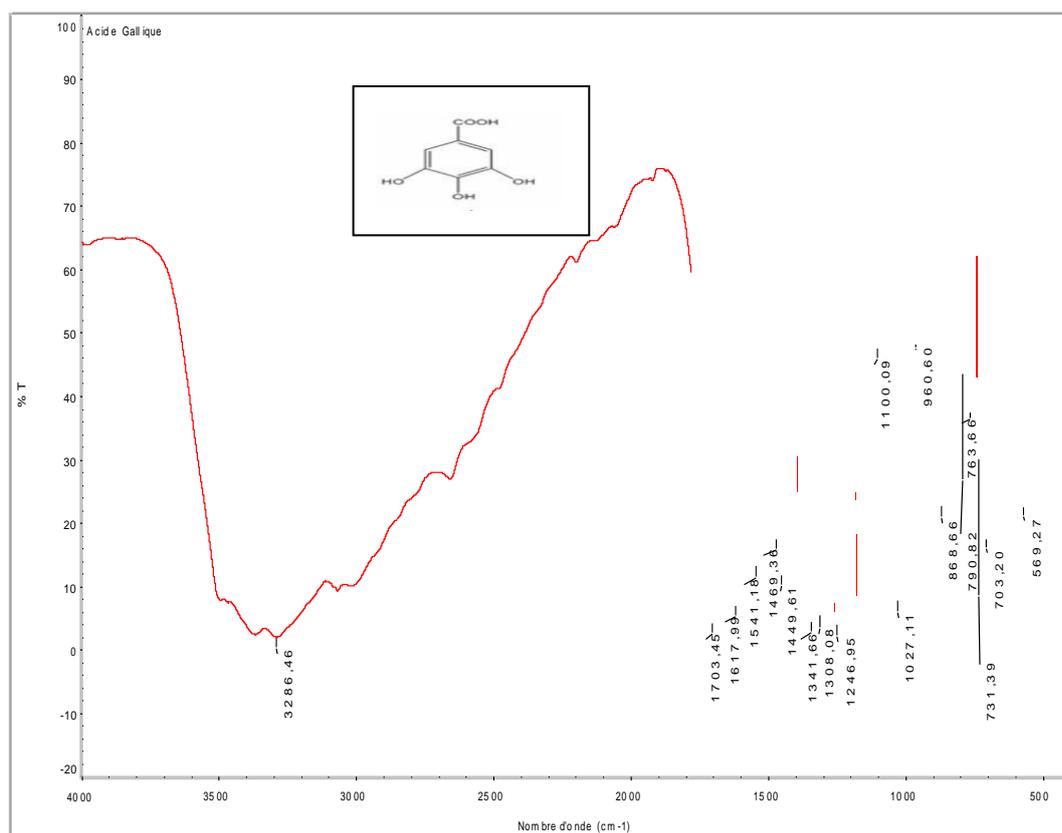


Figure IV.19 : Spectre infrarouge IRFT de l'acide gallique dans le KBr

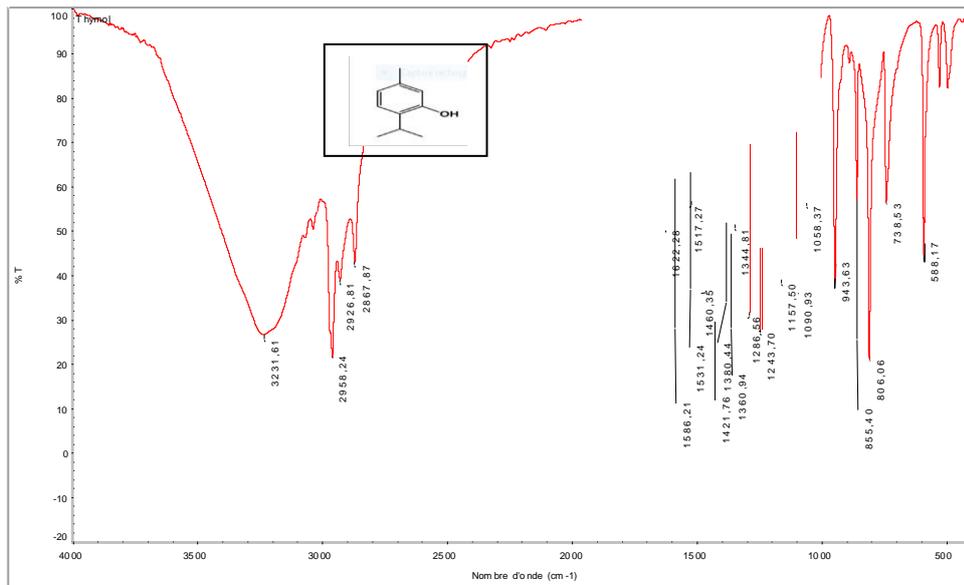


Figure IV.20 : Spectre infrarouge IRFT du thymol dans le KBr

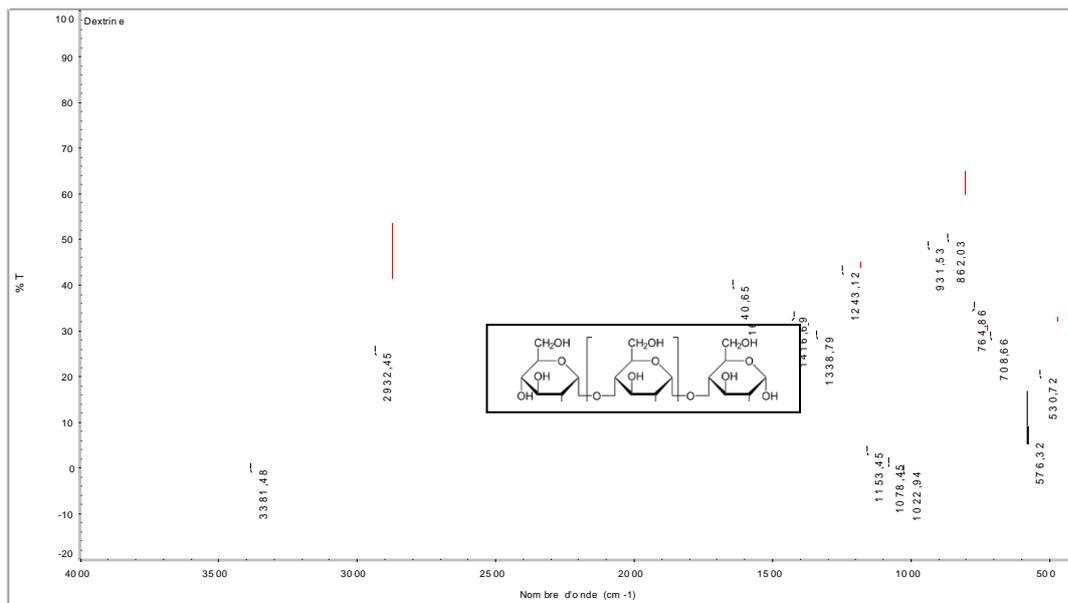


Figure IV.21 : Spectre infrarouge IRFT de dextrine dans le KBr.

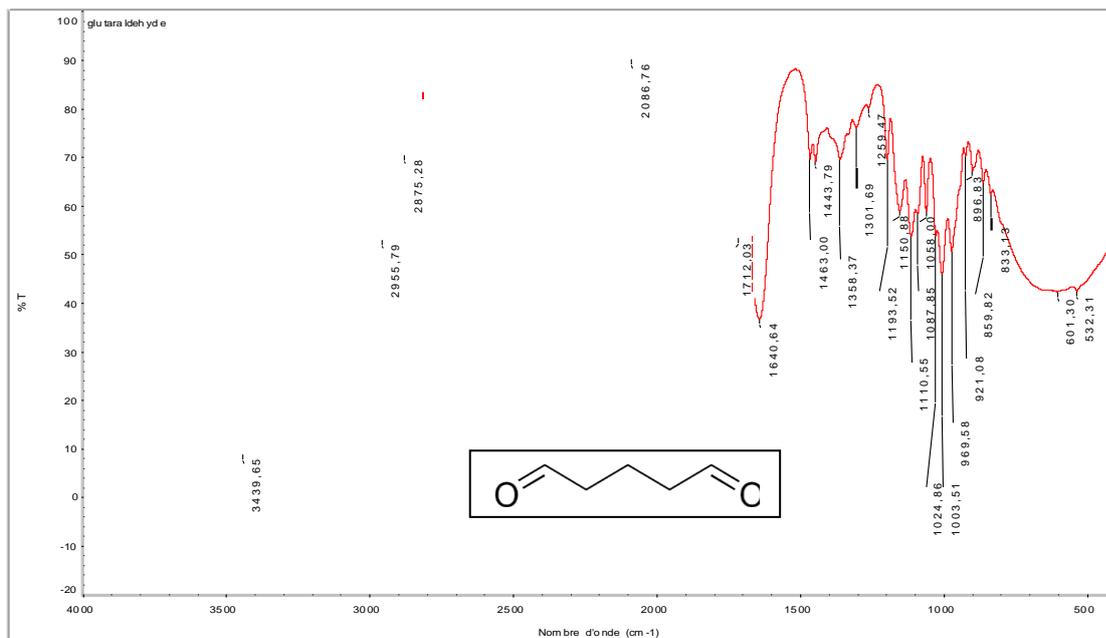


Figure IV.22 : Spectre infrarouge IRFT du Glutaraldéhyde dans le KBr.

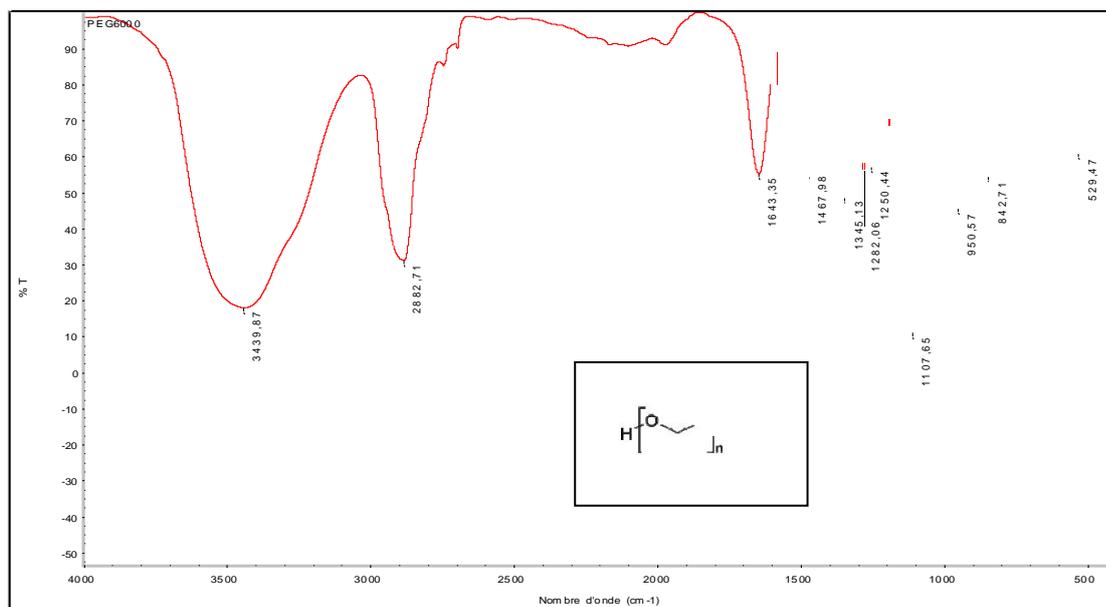


Figure IV.23 : Spectre infrarouge IRFT du PEG6000 dans le KBr

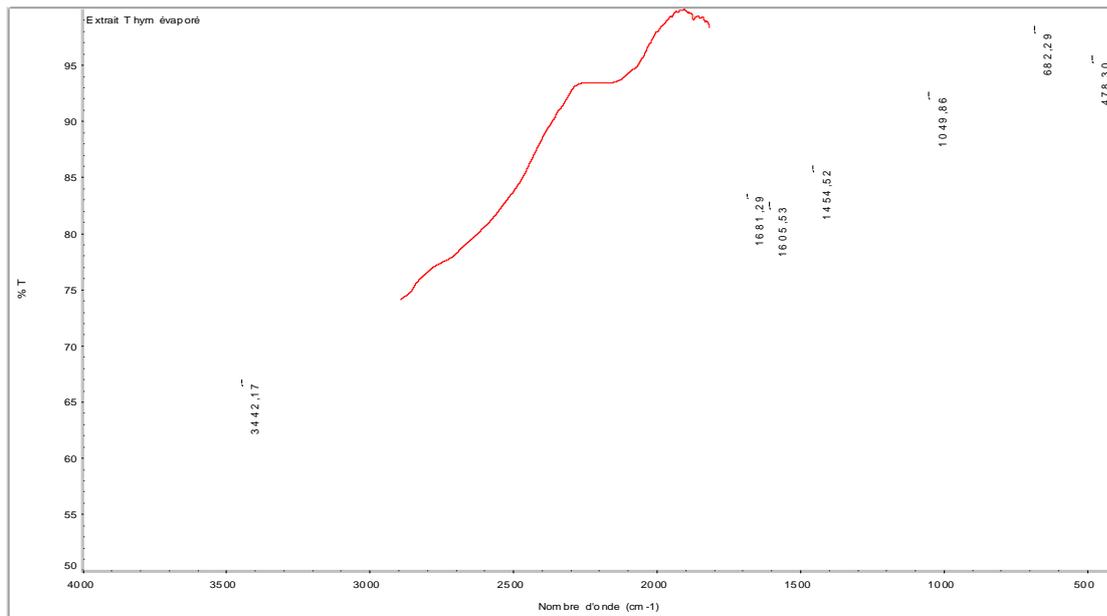


Figure IV.24 : Spectre infrarouge IRFT d'extrait de thymus sec dans le KBr.

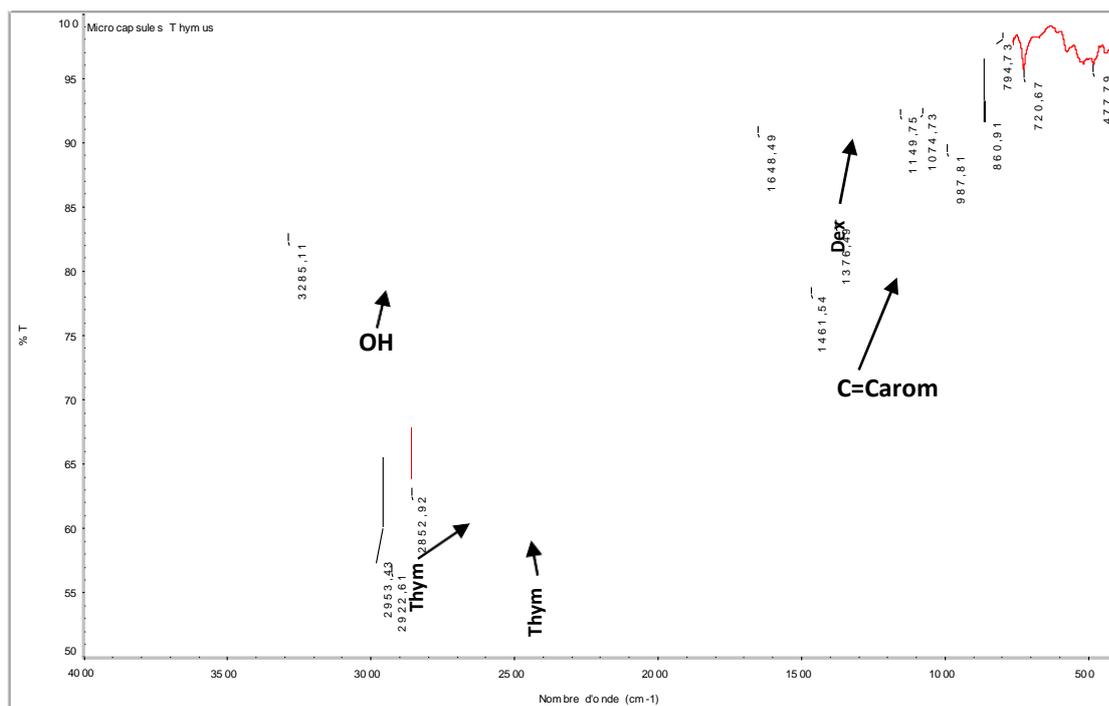


Figure IV.25 : Spectre infrarouge IRFT microcapsules Dex/PEG de l'extrait de thymus dans le KBr.

Tableau IV.9 : Les principales bandes d'absorption infrarouge identifiées sur les spectres IR de l'extrait brut, des microcapsules et des standards.

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Types de liaisons ou groupement chimique	Echantillon	Composés
3500-3250 1700-1740 1620-1450 1350-1000 950-600	OH(acide) C=O (acide) C=C (aromatique) C-O (alcool) C-H (aromatique)	Standard	Acide gallique
3600-3250 1650-1730 1620-1450 1400-1100 1000 950-600	OH(alcool) C=O (cétone) C=C (aromatique) C-O (des alcools) C-O-C (cycle) C-H (aromatique)	Standard	Quercétine
3500-3250 2800-3000 1620-1450 1400-1100 1000 950-600	OH(alcool) C _{tét} -H C=C (aromatique) C-O (des alcools) C-O-C (cycle) C-H (aromatique)	Standard	Glutaraldéhyde
3500-3250 2800-3000 1650-1700 1400-1100 950-600	OH(alcool) C _{tét} -H C=C (Alcène) C-O (des alcools) C-H (aromatique)	Polymère	Dextrine
3500-3250 2800-3000 1620-1450 1400-1100 950-600	OH(alcool) C _{tét} -H C=C (aromatique) C-O (des alcools) C-H (aromatique)	Polymère	PEG
3500-3250 2950-2850 1620-1450 1400-1100 950-600	OH (alcool) CH ₃ ,CH ₂ C=C (aromatiques) C-O (des alcools) C-H (aromatique)	Standard	Thymol
3500-3250 1620-1400	COOH (acide) C=C (aromatique)	Extrait thymus évaporé	Acide gallique
1000 950-600	C-O-C (cycle) C-H (aromatique)		Quercétine
3500-3250 2950-2850	OH (alcool) CH ₃ ,CH ₂	microcapsule thymus	Thymol, carvacrol
2800-3000	C _{tét} -H		PEG
1650-1700	C=C (Alcène)		Dextrine
1400-1100	C-O (des alcools)		Acide gallique
1000	C-O-C (cycle)		Quercétine
950-600	C-H (aromatique)		

Dans le **Tableau IV.9**, nous avons résumé les principales bandes d'absorption IR caractéristique des liaisons chimiques des composés existant dans l'extrait de thymus brut évaporé et microcapsules de thymus dans les polymères Dex/PEG, comparés à celles des standards de références. Nous concluons, d'après les résultats des analyses infrarouges, que l'extrait est plus riche en thymol et carvacrol (bandes IR à 2953 cm^{-1} et à 2852 cm^{-1} caractéristiques des vibrations de valence antisymétrique de CH_2 et de CH_3), les autres bandes IR de l'acide gallique et de la quercétine sont masquées par celles des deux polymères, qui sont plus intenses et majoritaires dans les microcapsules. Néanmoins, nous observons une forte bande d'élongation OH entre 3500 et 3200 cm^{-1} , pouvant être attribuée aussi aux OH de l'acide gallique et de la quercétine.

Conclusion générale

De nos jours, la recherche biomédicale s'est fortement intéressée à l'utilisation des plantes médicinales dans l'industrie pharmaceutique. Ces plantes constituent une source inépuisable de substances naturelles bioactives, offrant ainsi une opportunité de recherche des traitements plus doux et dépourvus d'effets secondaires indésirables. Les produits naturels dérivés des plantes ferment une variété de composés phénoliques et d'huiles essentielles, connus pour leurs propriétés inhibitrices contre les microorganismes et les virus, ainsi que pour leurs propriétés antioxydantes qui aident à contrer le stress oxydatif, causé par les radicaux libres, souvent associés au cancer. Parmi celles-ci, le *thymus*, centre d'intérêt de notre travail, est connu pour ses vertus curatives.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressées à l'activité antioxydante des extraits de thymus dans différents solvants. Une formulation pharmaceutique des extraits par microencapsulation dans des polymères biodégradables a été faite, suivie d'une étude de la cinétique de libération des substances actives dans le milieu physiologique.

Au cours de notre étude, nous avons obtenu un rendement massique de 25.21% en appliquant la méthode de macération, pour extraire les principes actifs de la poudre de thymus. Par la suite, nous avons effectué une extraction en utilisant divers solvants organiques tels que l'éther de pétrole(EP) le Dichlorométhane(DCM) et l'éthanol.

- ✓ L'évaluation quantitative des polyphénols totaux a révélé la présence de quantités importantes de polyphénols dans les extraits de la plante étudiée. Cependant, l'extrait brut (E) (2,89 mg EqAG/ g Ex Sec) est le plus riche en polyphénols que les autres extraits (HA, DCM, EP).

En parallèle, la quantification des flavonoïdes a permis de conclure que l'extrait DCM (0,047mg Eq Q / g Ex Sec)est le plus riche en flavonoïdes que les autres extraits (E, EP, HA).

- ✓ L'activité antioxydante des extraits de *thymus* a été évaluée par la méthode de piégeage de radical libre DPPH. Les résultats ont montré que les extraits possèdent une activité antioxydante élevée. L'extrait DCM à 800µl (77,73%) a montré un meilleur effet de piégeage des radicaux DPPH.
- ✓ En ce qui concerne les huiles essentielles de thymus, l'extrait brut est plus riche en thymol et carvacrol d'après les résultats obtenus par HPLC (8.70, 11.28 mg/ml) respectivement.

- ✓ La préparation des microparticules par double émulsion H/E/H du principe actif de l'extrait brut en utilisant des polymères biodégradables, la Dextrine et le PEG qui sont atoxiques, biocompatibles et biodégradables.

Afin de développer la meilleure formulation, une étude d'optimisation par un plan d'expérience factoriel à 3 facteurs est préalablement effectuée, pour rechercher les meilleures conditions de microencapsulation, telles que la dose de PA, le rapport massique des polymères, le pH de la phase continue.

Les résultats de la caractérisation par UV-visible nous ont permis de conclure que les meilleurs taux d'encapsulation pour les polyphénols et les flavonoïdes sont 91.92% et 75.48% respectivement correspondant aux conditions optimales : dose= 8 mg/ml, Rp= 4, pH= 6.

Les résultats obtenus par la modélisation ont confirmé l'existence des interactions réelles entre les différents paramètres, lesquelles influencent les paramètres et permettent de prédire les réponses spécifiques aux polyphénols (EEP%) et aux flavonoïdes (EEF%).

- ✓ Nous avons étudié la cinétique de libération in vitro par dissolutes dans un milieu physiologique (intestinal pH=6.8). Les résultats de cette étude ont montré que la libération pendant 2h est plus rapide pour les polyphénols que pour les flavonoïdes (effet retard).

En perspectives, il serait bien de poursuivre ce travail en :

- Utilisant d'autres méthodes d'extraction à chaud, ou par extraction de Soxhlet.
- Evaluer les activités antioxydantes des composés phénoliques des autres parties de cette plante (racines et fleurs)
- Evaluation de l'activité biologique : Il est important de mener des études in vivo pour obtenir une évaluation plus précise de l'activité antioxydante des extraits testés, car il est possible qu'une substance qui présente une forte activité in vitro puisse perdre cette activité une fois qu'elle pénètre dans l'organisme vivant.
- Refaire l'étude cinétique de libération pour des temps prolongés à plus de 2h ou pour quelques jours, et dans d'autres milieux physiologiques, gastriques et sanguins.
- Faire une étude de stabilité des microparticules

Références bibliographiques

- [1] : **GAMAZ I et BOUTCHICHE M, (2022)**. Contribution à l'évaluation du pouvoir antioxydant de feuilles *thymus vulgaris*, mémoire fin de cycle en biologie, option : infectiologie
- [2] : **Favier A., 2003**. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'Actualité chimique, Vol.39 : 108-117.
- [3] : **Iserin P. (2001)**. Encyclopédie des plantes médicinales. Ed: Larousse Bourdasse.Paris. P335.
- [4] : **Richard .J, Benoit .J-P, (2000)**. « Microencapsulation, techniques de l'ingénieur », J-2210.1-20,
- [5] : **Farnsworth, N., Akerele, R., Bingel, O., A.Soejarto, D. D., ET Guo, Z. (1986)**. Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. Bulletin de l'organisation mondiale de la santé 64 (2) :159-164.
- [6] : **Elqaj, M., Ahami, A., Belghyti, D., 2007**. La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires. Journée scientifique "Ressources naturelles et antibiotiques". Maroc.
- [7] : **Farnsworth, N.R et Soejarto, D.D, (1985)**. Potential consequence of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. *Economic Botany*, 39: 231-240.
- [8] : **MAKHLOUFI Z & MAMERI C, (2022)**. Extraction et évaluation des propriétés antioxydantes et antibactérienne de la plante *thymus vulgaris*. Application à la formation d'un pommade, mémoire fin de cycle en génie des procédés, option : génie pharmaceutique.
- [9] : **Arrassi S et Djaoudi S, (2021)**. Etude des propriétés antioxydants et antifongiques des extraits de la plante de *thymus vulgaris L.officinalis*, mémoire fin de cycle en génie des procédés, option : génie pharmaceutique.
- [10] : **Morales, R. (2002)**, the history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme:The genus Thymus*. Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43.
- [11] : **Pariante, L. (2001)**. Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique.2ème Ed. Académie nationale de pharmacie. Paris 1643 p..
- [12] : **Couplan, F. (2000)**. Dictionnaire d'étymologie de botanique : comprendre facilement tous les noms scientifiques. Edition Lausanne : Del chaux et Nestlé, Paris, 238 p.

- [13] : **Harley R.M., Atkins S., Budantsev A., Cantino P.H., Conn B., Grayer R., Harley M.M., Kok R., Krestovskaja T., Morales A., Paton A.J., Ryding O., Upson T., Labiatae.** In: **Kadereit, J.W. 2004**, the families and genera of vascular plants (Kubitzki, K: Ed). Volume 7, p 167-275
- [14] : **Özcan, M., et Chalcha, J. C. (2004)**. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L growing wild in Turkey. Bulgarian journal of plant physiology. 30 (3-4): 68-73.
- [15] : **Kitajima, J., Ishikawa, T., Urabe, A., Satoh, M. (2004)**. Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochemistry*.65:3279-3287.
- [16] : **Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., Vergnes, MF. (2008)**. Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne-Phytothérapie ; Vol. 6 ; pp 160- 164.
- [17] : **Poletti, A. (1988)**. Fleurs et plantes médicinales. 2^{ème} Ed. *Delachaux & Niestlé S.A.* Suisse. Pp : 103 et 131.
- [18] : **ABED S, MESSAADIA B, DJESSAS M, (2021)**. Etude des propriétés physicochimique et biologique de *thymus vulgaris* L, mémoire fin de cycle en science biologique, option : toxicologie.
- [19] : **Benazzedine, S. (2010)**. Activité insecticide de cinq huiles essentielles vis-à-vis de *Sitophilis oryzae* (Coleoptera ; cuculionidae) et *Tribolium confusum* (Coleoptera ; Tenebrionidae). Mémoire on line, Ecole nationale supérieure agronomique, El Harrach, Algérie.
- [20] : **Kabouche, A. (2005)**. Etude photochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiacées. Thèse de Doctorat d'état en chimie, Université Mentouri Constantine, p 277
- [21] : **Lavergne, D. (2012)**. Guide technique des plante à parfum aromatiques et médicinales (PAM) en bio, rédaction : AGROBIO 47 Association de Développement de l'Agriculture Biologique.
- [22] : **Teuscher E., Anton R., Lobstein A. (2005)**. Plantes aromatiques Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, p 521.
- [23] : **Eberhard, T., Robert, A., Annelise, I. (2005)**. Plantes aromatiques p 475-480.
- [24] : **Mabberley D.J, (1997)**, the plant-book: A portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, 858p.
- [25] : **Morales R, (1997)**, Synopsis of the genus *Thymus* L. in the Mediterranean area.

Lagascalìa, 19(1- 2), 249-262p.

[26] : **Peter, K.V. (2004)**. Handbook of herbs and spices. Elsevier, 376p.

[27] : **Wilson R, 2002**, Aromatherapy: Essential oils for vibrant health and beauty. Penguin edition, 340p

[28] : **Raghavan, S. (2006)**. Handbook of spices, seasonings, and flavourings. 2 nd edition. CRC Press, 330p.

[29] : **Stahl-Biskup, E et Saez, F. (2002)**. Thyme: The genus *Thymus*. London; New York, USA: Taylor & Francis.

[30] : **Hammaz, F et Nafa, S. (2017)**. Contribution à l'essai de fabrication de pâté de volaille à base de conservateurs naturels. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, Algérie.

[31] : **Quezel P., Santa S. (1962-1963)**. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales, Vol. 1-2. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique CNRS. Paris, 1170p.

[32] : **Amiot, J. (2005)**. *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires (Doctoral dissertation, Ecole nationale supérieure agronomique (Montpellier).

[33] : **Farrell K.T. (1998)**. Spices condiments and seasonings. 2ème édition springer sciences & business media. 414p. Cite par ABDELLI wafae thèse présentée pour l'obtenir du diplôme de DOCTORAT 3ème cycle LMD par thèse Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologique des huiles. (Année 2016-2017).

[34] : **Morimitsu Y., Yoshida K., Esaki S., Hirota, A. (1995)**. Protein glycation inhibitors from thyme (*thymus vulgaris*). Biosci. Biotechn. 59: 2018-2021.

[35] : **LALAMI, A.E.O., Fouad, E. A., OUEDRHIRI, W., CHAHDI, F.O., GUEMMOUH, R., & GRECHE, H. (2013)**. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *thymus vulgaris* et *thymus satureoidis*. *Les technologies de laboratoire*, 8(31).

[36] : **Labiad, M. H., Harhar, H., Ghanimi, A., & Tabyaoui, M. (2017)**. Phytochemical screening and antioxidant activity of Moroccan thymus satureioides extracts. *Journal of Materials and Environmental Science*, 8(6), 2132-2139.

[37] : **Ghelichnia, H. (2016)**. ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF THREE SPECIES OF THYMUS GROWING WILD ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF THREE SPECIES OF THYMUS GROWING WILD IN MAZANDARAN.

- [38] : **Mebarki, N. (2010)**. Extraction de l'huile essentielle de thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse –antimicrobienne. Thèse de doctorat, Université M'Hamed Bougera, Boumerdes, Algérie.
- [39] : **Jun W.J. ; Han B. K. ; Yu K.W. ; Kim M. S. ; Cang I.S ; Kim H. Y. ; (2001)**. Food chem. And Soxhlet extraction of essential oils of origanum. Vol 75. P, 439-444.
- [40]: **Djafri B et felkaoui Y**, Mémoire de fin de cycle 2007, Quantification et étude de L'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque de thymus vulgaris.
- [41] : **ADWAN, G. M., Abu-Shanab, Adwan, K., & Abu-Shanab, F. (2007)**. Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Turkish Journal of Biology*, 30(4), 239-242.
- [42] : **Righi H et Boukhalat N (2021)**. Mémoire master académique, Phytochimie et activité antioxydante du genre *Thymus* (synthèse théorique),
- [43] : **Renneberg R**. Biotechnology pour des débutants. Elsevier, 2008 ; Pp. 92-138.
- [44] : **Shastri V**. Industrial Biotechnology. Maison d'édition de Gyan, 2006 ; Pp. 1-38.
- [45] : **Abderrazak M., Joel R., (2007)**. La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. Pp.177.
- [46] : **Maamri S, (2008)**. « Etude de Pistacia atlantica de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens », Thèse pour l'obtention du diplôme de Magister (Université M'HAMED BOUGARA Boumerdes),.
- [47] : **Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J.,(2005)** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes.pp 121-216.
- [48] : **WALTON N.J. et BROWN D.E.; (1999)**. Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products; Ed: WORLD SCIENTIFIC; p: 1-14.
- [49] : **DAAYF F. et LATTANZID V.(2008)**. Recent Advances in Poly phenol Research 1; Ed: WILEY-BLACKWELL; p:1- 24
- [50] : **Laraoui Habiba, (2007)**, étude phytochimique de l'extrait chloroformique de *Bulpleurumatlanticum*, Thèse de Magister, Université El Hadj Lakhdar Batna, Option : chimie organique, 35.
- [51] : **Dave-Oomah. B, (2003)**, Bulletin IBP, numéro 1, Canada.
- [52] : **Ghedira, K. (2005)**. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et employs en thérapeutique. Phytothérapie, Vol 3(4); pp 162-169.
- [53] : **Beecher, G. R. (2003)**. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J. Nutri.*, 133 (10), 3248S-3254S.

- [54] : **Benayache, F. (2005)**. *Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre Genista (Fabaceae) : G. saharae, G. ferox*. Thèse de Doctorat en chimie organiques. Université Mentouri-Constantine, Algérie, 199p.
- [55] : **Lhuillier A,(2007)**. « Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauria salicifolia hook*. *F ex oliver*, *agauria polyphylla baker (ERICACEAE)*, *tambourissatrichophylla baker (monimiaceae)* et *embelia concinna baker (myrsinaceae)* », Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat (Ecole doctorale de Toulouse), , P20.
- [56] : **Ayad, R. (2008)**. Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *zygophyllum cornutum*, Mémoire magister En Chimie Organique. p 35-39, 40, 47.
- [57] : **Ali S et Abdou D, (2020)**. Etude de quelques activités biologiques de l'extrait aqueux de l'écorce de la grenade, mémoire fin de cycle en chimie des produits naturels, option : chimie organique et matériaux organiques.
- [58]: **Edwin Haslam, (1996)**. *J. Nat. Prod*, 59, 205-215.
- [59] : **REMMAN & BOUABDELLI H, (2019)**. *Extraction des principes actifs des grains de *Ridolfia segetum* avec d'évaluation de l'activité antioxydant*, mémoire fin de cycle en génie des procédés, option : génie chimique.
- [60] : **Sahraoui. (2011)**. UN1901 Laboratoire de pharmacognosie univency eduation. Com/uploads/1/3/1/0/13102001/ pharm 3an_pharmacognosie 19-alcaloides.pdf.
- [61] : **Macheix, J-J, Fleuriet, A., Jay- Allemand, C. (2005)**. Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Suisse : Lausanne ; Presses polytechniques et universitaires Romandes.
- [62] : **Bruneton, J. (1999)**. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. 3^{ème} Ed. Paris : Tec & Doc Lavoisier, P. 207- 211.
- [63] : **Yahyaoui, N. (2005)**. Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Mentha Spicata L* sur *Rhyzoperlhu dominicu (F.) (Coleoptera, Bostrychidae)* et *Triboium Confusm (Duv.) (Coleoptera, Tenebrionidae)*. Thèse de Magister : Institut National d'Agronomie, El- Harrach.207p.
- [64] : **Sutour, S. (2010)**. Etude de la composition chimique d'huile essentielles et d'extraits de menthes de corse et de Kumquats. Thèse de doctorat : Université de corse, page 222.
- [65] : **Benabdelkader,T, T. (2012)**. Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandou stoechas sensu lato*, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Mémoire de doctorat, Ecole Normale supérieure, Kouba-Alger, Algérie.

- [66] : **Ouis, N. (2015)**. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de Doctorat, Université d'Oran I, Algérie.
- [67] : **KRIFFI, F et BOUALAM, K. (2021)**. Extraction et caractérisation de quelques huiles essentielles de plantes utilisées dans la thérapie grippale (thymus lanceolatus, Eucalyptus globulus)
- [68] : **Elhaib, A. (2011)**. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytiques, Thèse du doctorat, Université de Toulouse.
- [69] : **Boutamani, M. (2013)**. Etude de la variation du rendement et de la composition chimique du Curcuma longa et Myristica fragrans en fonction du temps et de la technique utilisée. Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger.
- [70] : **Vigan, M. (2010)**. " Essential oils : renewal of interest and toxicity." European Journal of Dermatology 20 (6): 685.
- [71] : **Soualeh, N. And R. Soulimani (2016)**."Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts." Phytothérapie 14(1) : 44-57.
- [72] : **Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., Vergnes, MF. (2008)**. Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibactérienne-Phytothérapie ; Vol.6 ; pp 160-164
- [73] : **Pauli, A., Knobloch, K. (1987)**. Inhibitory effects of essential oil components on growth of food-contaminating fungi-Z Lebensm Unters Forsch; Vol. 185; pp 10-13.
- [74] : **Touhami, A. (2017)**. Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres thymus récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement , Thèse de doctorat , Université badji mokhtar annaba , algérie, 173p.
- [75] : **De vincenzi, M., Stammati, A., Vincenzi, A.D., and Silano, M. (2004)**. Constituents of aromatic plants: Carvacrol. Fitoterapia, 75: 801-804.
- [76] : **Gerschaman, R., Gilbert, DL, Nye, SW., et al. (1954)**. Oxygen poisoning and X- irradiation: a mechanism in common. Science, 119, 623-626.2.
- [77] : **Harman, D. (1956)**. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Geront, 11; 298-300.3.
- [78] : **Mc Cord, JM., Fridovich, I. (1969)**. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocytes (hemocuprein). J Biol Chem, 244, 6049-6055.

- [79] : Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, JO., Charlier, C., & Chapelle, J.P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de liege*, 62(10) ,628-38.
- [80] : Jacques B, and André R. (2004). Biochimie métabolique Ed ellipses. Paris. Pp : 217-219-220-223-225.
- [81] : Boudjouref, M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L.
- [82] : Nkhili E.Z.,(2009). Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant.Thèse de Doctorat en sciences des aliments. Université Casi Ayyad, Marrakech. Maroc. 327p.
- [83] : Arockiaraj J., Easwvaran S., Vanaraja P., Singh A., Goudable J. et Favier A., 1997. *Radicaux libres oxygénés et antioxydants*. Ed. Nutr Clin, Métabol, 330 p.
- [84] : Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeaux, K., & Defraigne, J. O.(2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4) ,233-239.
- [85] : CHOUHA O et HOUACINE A, (2018), Contribution à l'évaluation de l'activité antioxydante des deux plantes médicinales : *thymus hirtus* et *Rosmarinus tournefortii* ; mémoire fin de cycle en science alimentaires, option : qualité des produits et sécurité des aliments.
- [86] : Gutteridge, JM. (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence .Free Radic Res Commun; 19:0141-58.
- [87] : Coyle, P., Philcox, JC, Carey, LC, Rofe, AM. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*; 59:627-47.
- [88] : Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, U.K.: Oxford University Press.
- [89] : Knight, JA. (2001). the biochemistry of aging. *Adv Clin Res* 2001;35:01-62.
- [90] : Martinez-Cayueta M., 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochem .*, Vol.77:147-161.
- [91] : Pasquier C., 1995. Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, Vol. 276 : 87-92.
- [92] : Cotelle, N. (2001).Rôle of flavonoids in oxidative stress.*curr top Med Chem*. 1: 569-590

- [93] : **Hozawa, A., Jacobs, D., Steffes, M., et al.(2007)**. Relationships of circulating carotenoid concentrations with several markers of inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA)/ YOUNG Adult Longitudinal Trends in Antioxidants (YALTA) Study. Clin chem. 53-19.
- [94] : **Ayhar A et Yacoubi S, (2022)**. Evaluation de l'activité biologique de l'extrait hydro-méthanolique de *Thymus ciliatus*. Mémoire fin de cycle en science biologique, option : infectiologie.
- [95] : **Arockiaraj J., Easwaran S., Vanaraja P., Singh A., Goudable J. &Favier A, (1997)**. Radicaux libres oxygénés et antioxydants .Ed. Nutr Clin, Métabol, 330 p.
- [96] : **Defraigne, J-O. (2005)**. Un mécanisme physiopathologique central à l'origine de la complication du diabète, Rev Med Liege, 60, 472-478.
- [97] : **Neve J., Vermongen F., Carpentier Y-A. (1989)**. Valeurs usuelles du sélénium et de la glutathion peroxydase dans une population belge, Ann. Biol . Clin. Vol 47 :43-138.
- [98] : **Gardes-Albert M, Dominique Bonnefont- Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D. (2003)**. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique. Pp : 91-96.
- [99] : **Jacotot B., (1997)**. Vitamine E et athérosclérose .Rev . Méd. Interne. Vol.15 : 627-629.
- [100] : **Hanifi N, (1991)**. Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication des actes éditions, Vol 16 :47-49
- [101] : **Cholewa J., Poprz ecki S., Zajac A. Et Waskirwicz Z, (2008)**. Impact de la supplémentation en vitamine C sur les paramètres du stress oxydatif dans le sang des basket-teurs d'élite lors d'un effort maximal, science & sports, vol .23 : 176-182
- [102] : **Meddour A., Yahia M., Benkiki N., Ayachi A, (2011)**. Etude de l'activité antioxydant et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du capparispinosa L. lebanese Science Journal 14 (1) : 49-60.
- [103] : **thomas, D. (2016)**. Les antioxydants de nos jours : définition et applications (doctoral dissertation, thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de limoges

- [104] : **Ben Latreche A & Ait Kaci Arab B, (2021)**. Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *thymus vulgaris*. Mémoire fin de cycle en biologie, option : biochimie appliqué.
- [105] : **Moure, A.Cruz, J.M., Franco, D., Manuel Dominguez, J., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez M.J., Carlos Parajo, J,(2001)**. Natural antioxydants from résiduel sources. *Food Chemistry*; 72(2) : 145-171.
- [106] : **Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F. ; Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., & Prost, M, (2001)**. Stress oxidant et pathologies humains: Bilan et perpectives preventives. *La presse médicale*, 30(2), 1076-1081.
- [107] : **Pastre, J. (2005)**. Intérêt de la supplementations en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques (Doctoral dissertation).
- [108] : **Attou A.(2011)**. Contribution à l'étude photochimique et activités biologiques des extraits de la plante *ruta chalepensis (fidjel)* de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.
- [109] : **Meziti A. (2009)**. Activité antioxydant des extraits des graines de *Nigella sativa L* : étude in vitro et in vivo. Mémoire de magister. Université El-Haj Lakhdar. Batna.
- [110] : **Johnson, D.R., Gu, L.C.(1988)**. *In Autoxidation and Antioxidants, John Wiley, New York*, pp433-448.
- [111] : **Gagnault (G.A), (1982)**. Principe de la recherche du médicament, Edition Masson
- [112] : **Gouraud A. (2012)**. Généralité sur la pharmacologie et les médicaments, pp : 8-42-43348.
- [113] : **Talbert M. Willoquet G. et Labayle D, (2001)**. Guide pharmaco, Edition Lamare, France, pp : 25-44.
- [114] : **Pacificchristophe, (2006)**. Les forms pharmaceutiques.
- [115] : **White M.A., the chemistry behind carbonless copy paper, J. chem. Ed., 1998, 75, p 1119.**
- [116] : **J.Bill**, Micro encapsulation d'agent antimicrobien pour le développement de conditionnements primaires fonctionnalisés. Chimie théorique et/ ou physique, université Claude Bernard-Lyon, **2015**.
- [117] : **S.Rabeau**, étude d'un procédé continu de microencapsulation basé sur un micro mélangeur, Thèse de doctorat, l'institut national Polytechnique de lorraine, France, **2009**

- [118] : **Theron. F, conception** et mise en œuvre d'un procédé intensifié continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale, université de Toulouse, **2009**.
- [119] : **Y. Nafti, (2008)**. « Contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif : oxacilline sodique encapsulé en vue de déterminer les conditions de conservation », Mémoire d'ingénieur d'état, université Ziane Achour de Djelfa,
- [120] : **Hachemoui.W, Amirouche. L, (2017)** : microencapsulation d'un principe actif (Amlodipine) dans la matrice chitosane/ HPMC réticulé par le TPP par le procédé de double émulsion H/E/H », université de Bejaia.
- [121] : **Kerdudo A., Kerdudo A., De O., Kerdudo A ., Antipolis N.S &Directeur C., (2015)**. Optimisation de la conservation des cosmétiques : impact de la formulation, recherche de nouveaux conservateurs naturels, encapsulation, thèse
- [122] : **M. Devassine, (2005)**. «La microencapsulation: une nouvelle approche », conférence carma, IB.SUD,
- [123] : **OUARET M & IKHLEF M., (2017)**. Elaboration des microcapsules à base d'un mélange PHBV/PCL pour une libération contrôlée de la metformine. Mémoire fin de cycle en génie des procédés, option : Science et technologie du médicament.
- [124] : **J. Djeu, (2007)**. « Films de deux polymère auto-assembles : Chlorhydrate de polylyamine (PHA) et polystyrène sulfonate de sodium (PSS) ; mécanisme de croissance et stabilité », thèse de doctorat, université de Franche-Comté,
- [125] : **HE. Peiyuan, (2009)**. « Conception et réalisation d'un système microfluidique pour la production de gouttes calibrées et leur encapsulation », thèse de doctorat, université de Technologie de Compiègne,
- [126] : **T.Félicie, (2009)**. « Conception et mise en œuvre d'un procédé intensifié continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale», thèse de doctorat, université de Toulouse,
- [127] : **Agnihotri N, Mishra R, Goda C, Arora M, (2012)**. «Microencapsulation-A. Novel approach in drug delivery », A review, Indo Glub, J.pharm.sci 2(1), 1-20, .
- [128] : **B.O. Mashkevich, (2007)**. «Drug delivery research advances», Nova science publishers, Inc, New York
- [129] : **B. Abdelhakim, (2010)**. « Méthodologie de la formulation d'une forme orale solide à libération prolongée », thèse de doctorat, université de Toulouse,
- [130] : **J.P Benoit, S. Briançon, E. Fattal, H. Fessi, P. Legrand, C. Passirani, (19 May 2009)**. Sphéroïdes et formes vectorisées HAL-00385473,

- [131] : **R. Kieffer, (2008)**. « Contacteurs à membrane pour la précipitation du sulfate de baryum ; simulations numériques et résultats expérimentaux », thèse de doctorat, université Claude Bernard Lyon,
- [132] : **J. Gruery, (2006)**. « Émulsion doubles cristallisables : stabilité, encapsulation et relargage », thèse de doctorat, université de Paris VI
- [133] : **M. Socha, (2008)**. « Apport des nanotechnologies dans le domaine des peptides et des protéines ; application à l'absorption par voie orale et à la furtivité », thèse de doctorat, université Henri Poincaré-Nancy 1,
- [134] : **Joly .N, (2003)**. « Synthèses et caractérisation de nouveaux films plastique obtenue par acylation et réticulation de la cellulose », thèse de doctorat, université de Limoges,
- [135] : **L.Z. Kaestli, Nicole Vogt, (2005)**. Bulletin d'information du CAPP, Gérontopharmacologie : 68 565 60, N°36, CAPP-INFO.
- [136] : **N. Agnihotri, R. Misha, C. Goda, M. Arora, (2012)**. « Microencapsulation-A novel Approach in drug delivery », a review indo glob.J.pharm.sci; 2(1),1-20, .
- [137] : **Jalil R, Nixon JR, (1990)**. Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co- glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques release properties, J Microencapsulation, 7(3), 297-325.
- [138] : **Patel K.R, Patel M.R, Mehta T.J, Patel A.D, Patel N.M, (2011)**. « microencapsulation » review on novel approaches, Int J .pharm.technol; 3(1),894-911
- [139] : **B. Belloncle, (2008)**. « Synthèses, dégradation et bio-propriétés du polyglyoxylate d'éthyle », institut national des sciences appliquées de Rouen,
- [140] : **L. Hassaini, (2016)**. « Étude de la morphologie et des propriétés de biocomposites poly (3-hydroxybutyrate-Co-3-hydroxyvalérate) (PHBV)/ Farnie de Grignons. D'olive », thèse de doctorat, université de Bejaia,
- [141] : **Bouriche. S, (2013)**. « Encapsulation de la metformine dans des polymères biodégradables », mémoire de master, université de Bejaia,
- [142] : **Goupy. J, (2006)**. Les plans d'expériences, Revue Modulad 38, 13-36.
- [143] : **Marianne HEMOUS (s.d.)**, les plans d'expériences : maximiser la connaissance en un minimum d'expériences, Consulté à l'adresse <https://www.see-d.fr>.
- [144] : **Vivier. S, (2002)** : Stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences, et Application aux dispositifs électrotechniques modélisés par Eléments Finis, Université des Sciences et Technologie de Lille- Lille I
- [145] : « **C9 : PLANS À PLUSIEURS FACTEUR** » publié le **lundi 27 octobre 2014**, consulté à l'adresse <https://www.unipsed.net/ressource/c9-plans-à-plusieurs-facteur>

- [146] : Que sont les plans de surface de réponse, les plans composites centrés et les plans de box-behnken ? Consulté à l'adresse <https://support.minitab.com>.
- [147] : **Ono, Y, Shikata, T, (2005)**. Dielectric behavior of aqueous micellar solution of betaine-type surfactants. *Journal of physical Chemistry B*, 109, 7412-7416,6.
- [148] : plans d'expériences : plan 3 (k-p), plans de box-behnken et plans factoriels mixtes à 2 et 3 niveaux, consulté à l'adresse <https://www.statsoft.fr>
- [149] : **Clemence Rosine. Dongmo Momo. (2009)**. Clinique et pharmacologie Evaluation de l'activité antidermatophytique des l'extraits au methanol et fraction d'acalyphamanniana (euphobiacees) et tristemma hirtum (melastomataceesà. Universite de Dschang-Master en biochimie P34.
- [150] : **Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela- Raventos, R.M. (1999)**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152-178.
- [151] : **Boizot, N., & Charpentier, J.P. (2006)**. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un forestier. Le cahier des techniques de l'Inra, 79-82.
- [152] : **Gomez-Caravaca, A.M., Gomez-Romero, M., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez- Gutierrez, A.(2006)**. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharmaceutical and Biomédical Analysis*. 41: 1220-1234.
- [153] : **Amaroweiz, R., Troszynska, A., Shahidi, F.(2005)**. Antioxidant activity of almond seed extract and its fractions. *J food lipids*.12: 344-358.
- [154] : **Idrissou H & Kacimi K (2013)**. « Formulation d'un système matriciel à libération par microencapsulation de l'amlodipine (bésylate) dans HPMC- Eudragit® - PEG »
- [155] : **Collins, J.S., & Goldsmith, T.H.(1981)**. Spectral properties of fluorescence induced by glutaraldéhyde fixation. *Journal of histochemistry & cytochemistry* 29(3), 411-414.
- [156] : **Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro., E. & Dominguez, H.(2009)**. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry* .114(3).806-812
- [157] : **Ribéreau- Gayon, P et Gautheret, R.J. (1986)**. Les composés phénoliques des végétaux. *Végétaux*. Edition : Dund, paris, 273p.
- [158] : **Merken, H.M., Beecher, G.R.(2000)**. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoids aglycones, *J Chromatography A*.

Annexes

1. Matériels et réactifs utilisés

Verrerie	Réactifs	Appareillages utilisés
<ul style="list-style-type: none"> -Eprouvettes graduée, pipette graduée, Erlenmeyer, Fioles jaugées, Béchers ; -Verres de montre, Entonnoirs, spatules, barreau magnétique, pissette, tubes à essais ; -cuves en quartz pour l'UV -Boîtes pétries -papier absorbant, papier aluminium, papier wattman, para film ; -poires d'aspiration ; -Mortier, tamis de 100um ; 	<ul style="list-style-type: none"> -Eau distillé ; -Ether de pétrole (EP) ; -Dichlorométhane (DCM) ; -Méthanol (MeOH) ; -Ethanol ; -Acide acétique ; -Standards (acide gallique, quercétine, thymol) ; -Folin Ciucaleu ; -DPPH (2,2-déphényl-1-picrylhydrazyle) ; -Chlorure d'aluminium (AlCl_3) ; -Carbonate de sodium (NaCO_3) ; -Huile de vaseline -PEG, Dextrine, -Glutaraldéhyde ; -HCl ; -NaOH. 	<ul style="list-style-type: none"> -Spectrophotomètre UV-visible ; - Balance analytique de précision à 4 chiffres ; - PH-mètre ; - Dissolutest ; - HPLC ; - Spectrophotomètre IR ; - Etuve memmert ;

2- Cinétique de libération

2.1. Les valeurs des absorbances des polyphénols, flavonoïdes et l'activité antioxydant :

T (min)	Abs (nm) polyphénols	Abs (nm) flavonoïdes	Abs (nm) DPPH
2	0.033	0.023	0.574
10	0.001	0.013	0.319
20	0.013	0.051	0.578
30	0.004	0.018	0.600
40	0.003	0.018	0.613
50	0.017	0.014	0.611
60	0.004	0.009	0.576
70	0.053	0.012	0.751
80	0.012	0.009	0.546
90	0.035	0.004	0.591
100	0.006	0.019	0.573
110	0.013	0.006	0.560
120	0.013	0.012	0.545

3- Appareils utilisés



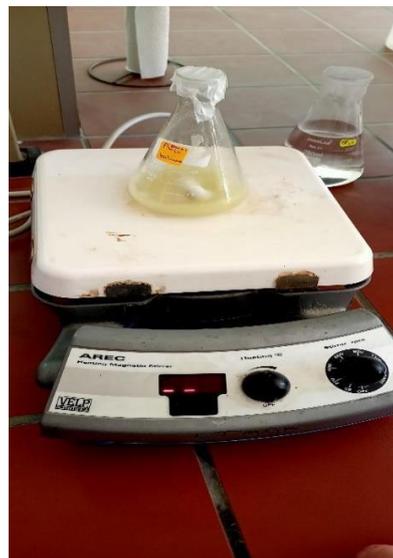
UV-visible



PH-mètre



Balance électronique



plaque d'agitation magnétique



Dissolutest

Résumé

Le thym (*thymus vulgaris*) est une des plantes médicinales les très connues, les extraits de cette plante contiennent une variété de composés auxquels sont attribués diverses activités biologiques. Dans cette étude nous avons tenté d'évaluer l'activité antioxydant et la composition phytochimique d'une variété d'extraits préparés à partir des feuilles de *thymus vulgaris* (Extrait brut, EDCM, EEP, HA).

D'après l'analyse de l'HPLC, nos résultats montrent que l'extrait brut est le plus riche en thymol et carvacrol, pour cela nous l'avons choisi comme principe actif dans la microencapsulation. L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence de milieu physiologique intestinal (PH=6.8) sur la cinétique de libération in vitro de principe actif « thymol » encapsulée par deux polymères biodégradables (PEG / Dextrine). Nous avons réalisé une encapsulation de principe actif « thymol » par le procédé de double émulsion, en optimisant plusieurs facteurs (Dose, PH, RP) à travers une modélisation par le plan d'expérience factoriel afin d'obtenir un taux maximal d'encapsulation en polyphénols et flavonoïdes. Pour cela on a étudié à travers le logiciel MINITAB la variance dans le but de savoir quel est le facteur le plus significatif et leurs influences sur le taux d'encapsulation des polyphénols et flavonoïdes.

Mots clés : Thymus, Activité antioxydant, Formulation, Microencapsulation, Dextrine, PEG

Abstract

Thyme (*Thymus vulgaris*) is one of the well-known medicinal plants, and extracts from this plant contain a variety of compounds that have been attributed to various biological activities. In this study, we attempted to evaluate the antioxidant activity and phytochemical composition of a variety of extracts prepared from *Thymus vulgaris* leaves (Crude extract, EDCM,,EEP,HA).

According to the HPLC analysis, our results show that the crude extract is the richest in thymol and carvacrol, which is why we chose it as the active ingredient for microencapsulation. The objective of this work is to study the influence of the physiological intestinal medium (pH=6.8) on the in vitro release kinetics of the encapsulated active ingredient "thymol" using two biodegradable polymers (PEG/Dextrin). We performed the encapsulation of the active ingredient "thymol" using the double emulsion process, optimizing several factors (dose, pH, RP) through factorial experimental design modeling to obtain a maximum rate of encapsulation in polyphenols and flavonoids. To achieve this, we used the MINITAB software to study the variance in order to determine the most significant factor and its influence on the encapsulation rate of polyphenols and flavonoids.

Keywords: Thymus, Antioxidant activity, Formulation, Microencapsulation, Dextrin, PEG