

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira – Bejaïa

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE Master

Domaine : Science et Technologie

Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie Pharmaceutique

Thème

*Encapsulation d'extrait de la propolis par des Liposomes, Niosomes et étude
de leurs impacts sur la conservation spermatique*

Réalisées par :

- Harcheche Sylia
- Lamamra Sabrine

Soutenus devant le jury :

Nom et prénom	grade		
Mr M. AZZOUG	MCA	Université de Bejaia	Président
Mm N. CHIBANI	MCA	Université de Bejaia	Examinatrice
Mr FATMI Sofiane	MCA	Université de Bejaia	Encadreur
Mlle TOUTOU Zahra	Doctorante	Université de Bejaia	Co- Encadreur

Promotion 2022/2023

Remerciements

Nous remercions Dieu, de nous avoir donné la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer nos gratitude, à notre encadreur **Dr. FATMI Sofiane** pour avoir bien voulu à diriger ce travail et d'avoir partagé son savoir et connaissances.

Nos vifs remerciements vont également à mademoiselle **TOUTOU Zahra** qui nous a orienté, nous faisant profiter de son savoir, et nous offrant sa présence tout aux longs de ces longs mois de travail et d'efforts.

Nous remercions infiniment, **Pr. IGUEROUADA Mokrane** pour nous avoir accordé l'opportunité de travailler dans le laboratoire M.E.A.

Nous remercions aussi Madame **Inouri.Iskounen Ahlam** de nous avoir aidé à réaliser la partie biologique.

Merci pour l'ensemble des membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'examiner et D'évaluer notre travail.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance et nos plus profonds remerciements envers Monsieur **DJERMOUNE Atmane** chef de section et responsable DRX.

On remercie tout le personnel du département de Génie des procédés du pôle universitaire de Bejaia.

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut....

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance.

Aussi, ce n'est tout simplement que :

Je dédie ce travail à...

A mes très chers parents

Aucune dédicace n'est assez forte, aucun mot n'est assez éloquent pour exprimer ce que je ressens. Mais à travers ce travail, couronnement de vos efforts conjugués, je voudrais vous dire mon estime et mon respect inégalés, ma gratitude infinie et surtout mon immense amour filial.

Puisse Dieu vous accorder longue vie, santé et bonheur.

A ma très chère sœur Sara

A mes très chers frères : Samir et Salem

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès

A mon défunt grand-père paternel

A ma grand-mère paternelle

Et mes grands-parents maternels

A mes oncles et mes tantes leurs époux et épouses

A mes chers cousins cousines

A tous les autres membres de ma famille

Que je n'ai pas cité, mais qui n'en demeurent pas moins chères.

A mon meilleur binôme sabrine

Pour son entente et sympathie je souhaite que l'amitié que nous a réunie persiste pour toujours et que nous arrivions à réaliser nos rêves...

A mes très chères amies Zahra, Soussou et Houssem

Je vous remercie beaucoup pour votre aide, veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère... En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

Recevez ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond estime.

A tous mes chères amies sans exception

A tous ceux qui ont contribué, de près et de loin, à L'élaboration de ce travail.

Sylia

Je dédie ce travail:

A mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis Pour mon instruction et mon bien-être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours. Puisse Dieu, vous accorder santé, bonheur, longue vie

A mon cher frère Hachemi

A ma chère sœur Sihame

A ma copine Sylia

Pour tous les efforts qu'elle a fournis durant la réalisation de ce travail

A mes copines

A tous mes adorables amis

Pour leur amour, aide et encouragement

A mon cher oncle et chères tantes

Et tous ceux qui me sont chers.

Sabrine

Liste des tableaux**Liste des figures****Liste des abréviations****Introduction générale.....1****Chapitre I : La propolis**

I.1. Introduction.....	3
I .2. Historique.....	3
I.3. Ethimologie du mot propolis.....	3
I.4. Définition.....	4
I.5. Origines.....	5
I.5.1. Origine botanique.....	5
I.5.2. Animal.....	5
I.5.3. Matières secondaires.....	5
I.6. Composition de la propolis.....	6
I.6.1. Polyphénols.....	7
I.7. Utilisation de la propolis.....	8
I.7.1. Par les abeilles.....	8
I.7.2. Par l’homme.....	8
I.7.2.1. Utilisation en cosmétique.....	8
I.7.2.2. Utilisation en médecine.....	9
I.7.2. 3. La propolis comme complément alimentaire chez les patients diabétiques.....	9
I.8. Récolte de la propolis.....	9
I.8.1. Par l’abeille.....	9
I.8.2. Par l’homme.....	10
I.9. Les propriétés de la propolis.....	11
I.9.1. Les propriétés physico-chimiques.....	11
I.9.2. Caractéristiques organoleptiques.....	11
I.10. Les propriétés biologiques.....	12
I.10.1. Les propriétés antifongiques.....	12
I.10.2. Les propriétés antivirales.....	12
I.10.3. Les propriétés immunologiques.....	12

I.10.4. Les propriétés anti-inflammatoires et antirhumatismales.....	12
I.10.5. Les effets de la propolis sur le corona virus.....	13
I.10.7. Effets contre les affections bucco-dentaire.....	13
I.10.8. Activité antibactérienne.....	13
I.10.9. Activités anticancéreuse.....	14
I.10.10. Autres propriétés.....	14
I.11. Les type de médicaments de la propolis.....	14
I.12. Conservation.....	15
I.13. Propriétés de la propolis de melbou.....	15
I.13. Conclusion.....	16

Chapitre II : Les liposomes

II.1. Introduction.....	17
II.2. Historique.....	17
II.3. Définition et structure des liposomes.....	17
II.4. Les constituants des liposomes.....	18
II.4.1. Phospholipides.....	18
II.4.1.1. La phosphatidylcholine (PC).....	19
II.4.1.2. La phosphatidylsérine (PS).....	19
II.4.2. Cholestérol.....	19
II.4.3. Matériau polymère.....	20
II.4.4. PEG.....	20
II.4.5. Autre constituant.....	20
II.5. Préparation des liposomes.....	21
II.5.1. Méthode de préparation.....	21
II.5.1.1. Méthode d'injection d'éthanol.....	21
II.2. Les méthodes utilisant des liposomes préformés : La congélation-décongélation.....	22
II.3. La méthode d'Evaporation en phase inverse.....	22
II.5.2. Les facteur influent sur la propriété les liposomes.....	22
II.5.2.1. L'influence de la vitesse d'injection.....	22
II.5.2.2. La vitesse d'agitation.....	23
II.5.2.3 L'influence de la concentration de ce type de lipide.....	23

II.5.2.3. Influence de l'osmolalité.....	23
II.5.2.4. Influence du volume d'éthanol.....	23
II.5.2.5. L'influence du pH de la phase aqueuse.....	23
II.5.2.6. L'influence de la viscosité de la phase aqueuse.....	23
II.5.2.7. L'influence de type de principe actif.....	23
II.6. Classification.....	23
II.7. Domaine d'application.....	24
II.7.1. Pharmaceutique.....	24
II.7.2. Cosmétologie.....	25
II.7.3. Alimentaire.....	25
II.8. Avantage et inconvénient.....	26
II.9. Encapsulation d'un principe actif dans liposome.....	27
II.9.1. Encapsulation passive.....	27
II.9.2. Encapsulation active.....	27
II.10. Conclusion.....	27

Chapitre III : Les cyclodextrines

III.1. Introduction.....	28
III.2. Historique.....	28
III.3. Définition.....	28
III.4. Structure chimique.....	29
III.5. Cyclodextrines Modifiées.....	31
III.6. Caractéristique physico-chimique des cyclodextrine	32
III.6.1. Solubilité.....	32
III.6.2. Stabilité.....	33
III.6.3. Amphiphile.....	33
III.6.4. Caractère basique.....	33
III.6.5. Enantiosélectivité.....	33
III.7. Toxicité.....	33
III.8. Complexe d'inclusion.....	34
III.8.1. Préparation de complexe d'inclusion.....	34
III.8.1.1. Coévaporation.....	35

II.8.1.2. Traitement par micro-ondes.....	35
III.8.2. Méthode de caractérisation de complexe d'inclusion.....	35
III.8.3. Mécanisme de formation de complexe.....	35
III.9. Domaine d'application.....	36
III.10. Conclusion.....	37

Chapitre IV : les plans d'expériences

IV.1. Introduction.....	38
IV.2. Définition.....	38
IV. 3. L'intérêt.....	38
IV.4. Principe.....	39
IV.5. La démarche de planification expérimentale.....	39
IV.5.1. Les facteurs.....	39
IV.5.2. Les réponses.....	39
IV.5.3. Domaines expérimental.....	39
IV.6. Méthodologie des plan d'expérience.....	40
IV.6.1 Recherche des facteurs d'influence.....	41
IV.6.2. Modélisation.....	41
IV.6.3. Optimisation.....	41
IV.6.3.1. Eléments d'optimisation.....	41
IV.7. Type de plans d'expérience.....	43
IV.7.1 Plans factoriel.....	43
IV.7.2. Plan composite centré.....	43
IV.7.4. Plan de mélange.....	43
IV.8. Définition du plan de D-optimal.....	43
IV.9. Avantage des plans d'expérience.....	44
IV.10. Conclusion.....	44

Chapitre V : les niosomes

V.1. Introduction.....	45
V.2. Définition.....	45
V.3. Structure.....	45
V.4. Composition.....	46

V.4.1. Surfactant.....	46
V.4.2. Cholestérol.....	47
V.4.3. Molécule de charge.....	47
V.4.4. Hydratation medium.....	48
V.5. Types de niosomes.....	48
V.6. Méthodes de préparation de niosome.....	48
V.7. Les facteurs influencent sur la préparation de niosome.....	49
V.7.1. Type de surfactants.....	49
V.7.2. Structure géométrique de surfactant.....	49
V.7.3. Équilibre hydrophile-lipophile (HLB).....	50
V.7.4. Température de transition gel-liquide (Tc).....	50
V.7.5. La nature de médicaments.....	51
V.7.6. Cholestérol.....	51
V.8. Les méthodes de caractérisation de niosome.....	51
V.9. Stabilité de niosomes.....	52
V.10. Toxicité de niosome.....	53
V.11. Les avantages de niosomes.....	53
V.12. Les inconvénients de niosomes.....	54
V.13. Pharmaceutique applications de niosomes.....	54
V.14. Comparaison entre niosomes et liposome.....	54
V.14. Conclusion.....	55

Chapitre VI : Matériels et méthodes

VI.1. Optimisation d'un procédé d'encapsulation de la propolis par les liposomes.....	56
VI.1.1. Introduction.....	56
VI.1.2. Préparation des suspensions propolis-liposome avec les conditions optimales.....	56
VI.1.2.1. Plans d'expériences.....	56
VI.1.2.2. Matériels.....	57
VI.1.2.3. Produits chimiques.....	57
VI.1.2.4. Appareillages.....	57
VI.1.2.5. Méthode.....	58
VI.2. Optimisation d'un procédé d'encapsulation de la propolis par les Niosomes.....	58

VI.2.1. Introduction.....	58
VI.2.2. Préparation des suspensions propolis-Niosome avec les conditions optimales.....	58
VI.2.3. Matériels.....	59
VI.2.4. Produits chimiques.....	59
VI.2.5. Appareillages.....	59
VI.2.6. Méthode.....	59
VI.3. Détermination de la taille des solutions niosomales.....	60
VI.3.1. Principe.....	60
VI.3.2. Appareillage.....	60
VI.3.1.3. Produits chimiques.....	60
VI.4. Détermination du taux d'encapsulation.....	60
VI.4.1. La centrifugation de la solution niosomale optimale.....	60
VI.4.1.1. Matériels.....	60
VI.4.1.2. Appareillage.....	60
VI.4.1.3. Produits chimiques.....	61
VI.4.1.4. Méthodes.....	61
VI.4.2. L'identification, la séparation et le dosage avec hplc.....	61
VI.4.2.1. Principe.....	61
VI.4.2.2. Matériel.....	62
VI.4.2.3. Produit chimique.....	62
VI.4.2.4. Conditions d'analyse.....	62
VI.4.3. Analyse par spectroscopie UV-visible.....	62
VI.4.3.1. Principe.....	62
VI.4.3.2. Produit chimique.....	63
VI.4.3.3. Méthode.....	63
VI.5. Préparation de l'optimum.....	63
VI.6. caractérisations de l'optimum.....	63
VI.6.1. Analyse par spectroscopie infrarouge IR.....	63
VI.6.1.1. Principe.....	63
VI.6.1.2. Produits chimiques.....	64
VI.6.1.3. Appareillage.....	64

VI.6.1.4. Méthode.....	64
VI.6.2. Diffraction des rayons X.....	64
VI.6.2.1. Méthode.....	64
VI.7. Test de motilité des spermatozoïdes (déterminations de VSL) après réfrigération.....	65
VI.7.1. Réfrigération du sperme.....	65
VI.7.1.1. Matériels.....	65
VI.7.1.2. Appareillages.....	65
VI.7.1.3. Produits chimiques.....	65
VI.7.1.4. Méthode.....	65

Chapitre VII : Résultats et discussions

VII.1. Détermination des réponses du plan expérimental.....	66
VII.1.1. Détermination de la taille des suspensions liposomes.....	66
VI.1.1.1. Résultats.....	66
VI.1.1.2. Observation et interprétation.....	67
VII.2. Détermination de la taille et de taux d'encapsulation des suspensions niosomes.....	67
VII.2.1. Analyse par spectroscopie UV-visible.....	67
VII.2.1.1. Résultats.....	67
VII.2.1.2. Observation et interprétation.....	68
VII.2.2. Détermination de taux d'encapsulation et de la taille.....	69
VII.2.2.1. Résultats.....	69
VII.2.2.2. Observation et interprétation.....	69
VII.2.3. Identification des composés phénoliques des extraits éthanoliques de la propolis des différentes formulations de niosome par HPLC.....	70
VII.2.3.1. Résultats.....	70
VII.3. Détermination de la meilleure formulation (optimum).....	70
VII.4. Analyse par spectroscopie infrarouge IR.....	72
VII.4.1. Résultats.....	72
VII.4.2. Observation et interprétation.....	72
VII.5. Diffraction des rayons X.....	74
VII.5.1. Résultats.....	74
VII.5.2. Observation et interprétation.....	74

VII.6. Test spermatique.....	75
VII.6.1. Analyse statistique.....	75
VII.6.1.1. Résultats I.....	75
VII.6.1.1.1. Observation et interprétation.....	75
VII.6.1.2. Résultats II.....	76
VII.6.1.2.1. Observation et interprétation.....	76

Conclusion générale.....	77
---------------------------------	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

PA : Principe actif.

PC : phosphatidylcholine.

PG : phosphatidylglycérol.

PS : phosphatidylsérine.

PE : phosphoéthanolamine.

Tc : température de transition.

PEG : polyéthylène glycol.

SUV : Petites vésicule uni-lamellaires.

LUV : Vésicules uni-lamellaires géantes.

MLV : Vésicules Multi-lamellaires.

PDI : polydispersité.

CD : Cyclodextrine.

α -CD: alpha- cyclodextrine.

β -CD: bêta-cyclodextrine.

γ -CD: gamma-cyclodextrine.

HLB : équilibre hydrophile-lipophile.

CPP : paramètres d'emballage critiques.

PLN : niosomes chargés de propolis.

HPLC : La chromatographie en phase liquide.

UV : spectroscopie UV-visible.

IR : spectroscopie infrarouge.

DRX : Diffraction des rayons X.

VAP : vitesse moyenne de la trajectoire.

VCL : vitesse curviligne.

Liste des tableaux

Tableau I.1. Différentes classes de polyphénol

Tableau I.2. Les formes commercialisées de la propolis

Tableau I.3. Les propriétés biologiques de la propolis de Melbou

Tableau II.1. Type le liposome

Tableau II.2. L'avantage et inconvénient

Tableau III.1. Propriété physico-chimique des CD native

Tableau III.2. Les propriétés améliorent dans les domaines industrielles après utilisations des cyclodextrines

Tableau V.1. Les paramètre d'évaluation des niosomes

Tableau V.2. Une comparaison entre liposome et niosome

Tableau V.1. Matrice d'expérience

Tableau V.2. Formulations de préparation des niosomes

Tableau VII.1. Résultats expérimentaux de la matrice

Tableau VII.2. La concentration équivalente de la quercétine dans chaque formulation

Tableau VII.3. La taille et le taux d'encapsulation de nos formulations

Tableau VII.4. . Détermination de la meilleure formulation

Liste des figures

Figure I.1. L'aspect de la propolis

Figure I.2. Propolis brute

Figure I.3. Abeilles porteuse de propolis dans la colonie

Figure I.4. Peuplier

Figure I.5. Pin

Figure I.6. Composition de la propolis

Figure I.7. Récolte de propolis par l'abeille

Figure I.8. Butineuses de propolis dans la ruche

Figure I.9. Récolte par grille

Figure I.10. Récolte par grattage

Figure I.11. Différentes couleurs de propolis

Figure I.12. Mécanisme d'action de la propolis comme un agent antibactérien

Figure II.1. Liposome et phospholipide

Figure II.2. Structure de phospholipide

Figure II.3. La méthode d'injection

Figure III.1. Schéma d'une "capsule" cyclodextrine montre les régions hydrophobes et hydrophiles

Figure III.2. Schéma de la structure chimique de α -, β - et γ cyclodextrines

Figure III.3. Structure générale de cyclodextrine (n=nombre d'unité de glucose : n= 6, 7 et 8 pour α -, β - et γ -CD)

Figure III.4. Formation de complexe d'inclusion

Figure III.5. Stœchiométrie des complexes

Figure IV.1. Entrées et sorties d'une expérience

Figure IV.2. Démarche de mise en œuvre des plans d'expériences

Figure IV.3. Eléments indispensables à toute optimisation

Figure IV.4. Déroulement d'une optimisation

Figure V.1. Structure niosome

Figure VI.1. Solutions liposomales

Figure VI.4. A. Niosome-blanc, B. Niosome-propolis

Figure VII.2. Niosome-propolis observé par un microscope optique

Figure VII.3. Niosome-blanc observé par un microscope optique

Figure VII.5. Analyse spectrale FTIR de : Niosome blanc, extrait de propolis, propolis-Niosome

Figure VII.6. Analyse DRX

Figure VII.7. Diagramme de la vitesse curviligne (VCL), et la vitesse moyenne de la trajectoire(VAP) de la cryoconservation des spermatozoïdes en fonction du temps éclaté par le traitement.

Figure VII.8. Diagramme de la vitesse la vitesse curviligne (VCL) et la vitesse moyenne de la trajectoire VAP de la cryoconservation des spermatozoïdes en fonction de temps éclaté par le traitement après dilution

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques sans danger. Actuellement, la plupart des médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont des substances d'origines biologiques extraites des êtres vivants tels que les végétaux, les animaux et les micro-organismes. Les scientifiques s'intéressent particulièrement aux produits naturels en raison de leur diversité chimique et de leur potentiel thérapeutique qui sont souvent efficaces et présentent moins de toxicité, pour traiter des maladies complexes et améliorer la santé humaine.

Les produits de la ruche sont parmi les substances naturelles les plus utilisés par l'homme, ils ont une importance historique et économique considérable, ils jouent un rôle vital dans différents domaines de l'industrie et de la santé. Leur utilisation assure un bon marché et constitue une source de revenus supplémentaires pour les apiculteurs. Parmi ces produits, la propolis d'abeille qui est utilisée depuis des siècles dans la médecine traditionnelle. Elle présente une composition complexe, riche en flavonoïdes, les acides phénoliques, les terpénoïdes et d'autres composés bioactifs, qui lui confèrent des propriétés biologiques et pharmacologiques, y compris l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, antioxydante et anticancéreuse... [1 ; 2]

Cependant, malgré ses nombreux avantages thérapeutiques, la propolis présente une faible solubilité dans l'eau, limitant ainsi son utilisation pratique, son absorption et son efficacité biologique, ainsi que sa formulation dans divers produits pharmaceutiques. Par conséquent, il est essentiel de développer des stratégies visant à améliorer la solubilité de cette substance afin de maximiser son potentiel thérapeutique. Pour remédier à ce problème, de nombreuses alternatives ont été explorées, et l'une d'entre elles est l'encapsulation en utilisant des vecteurs ou transporteurs parmi lesquels : les niosomes, les liposomes et les cyclodextrines, en raison de leur capacité à encapsuler divers composés hydrophobes et hydrophiles.

Ce travail a été effectué à l'aide d'un plan d'expérience (modèle 06), dans le cadre d'optimiser un procédé d'encapsulation, avec les niosomes et le liposome en fixant le taux d'encapsulation et la taille comme réponses.

L'étude de ce travail a été divisée en deux parties. La première partie est constituée d'une recherche bibliographique. Elle est répartie en cinq chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à la propolis son historique, ses origines, sa récolte, sa composition chimique et ses différentes propriétés biologiques.
- Le deuxième chapitre sur les liposomes, leur composition, structure, et leurs avantages d'utilisation.
- Le troisième chapitre sur les cyclodextrines, leur historique, ses propriétés physico-chimiques, et leurs domaines d'application.
- Le quatrième chapitre comporte des généralités les plans d'expériences, et les différents plans existants.
- Le cinquième chapitre est consacré sur les niosomes, leurs définitions, structure chimique, et leurs intérêts.

La deuxième partie est l'étude expérimentale, elle est subdivisée en :

- Matériels et méthodes utilisés pour effectuer cette étude, dont on peut citer les plans d'expériences, et les différentes techniques de caractérisations des différentes formulations préparées, et d'étudier leurs impacts sur la cryoconservation des spermatozoïdes.

A la fin, une discussion des résultats obtenus sera exposée.

Chapitre I : La propolis

I.1. Introduction

En général, quand on parle de ruches, on pense immédiatement à la production de miel. Cependant, ce n'est pas la seule substance produite par les abeilles. En plus du nectar, les abeilles récoltent également du pollen et de la propolis. Elles produisent également de la cire, le venin et de la gelée royale.

La propolis est l'un des sous-produits les plus précieux de la ruche, c'est une substance végétale récoltée par les abeilles et considérée comme une source de thérapie. Les abeilles utilisent cette résine comme anti-infectieux pour protéger les entrées des colonies d'abeilles des corps étrangers et pour maintenir la ruche stérile [3].

Marie-Paule Rolin et Yves Donatieu la définissent comme « une substance résineuse, gommeuse ou balsamique à consistance collante récoltée par les abeilles sur certaines parties des plantes » [4].

I.2. Historique

La propolis est un remède naturel utilisé depuis l'Antiquité comme une thérapie contre les maladies de la peau, les plaies et les abcès.

Les premières traces de propolis proviennent de l'Égypte antique, qui était utilisée par les grands prêtres de l'époque pour embaumer les momies et vendu plus chère que le miel.

Les Arabes connaissaient aussi la propolis, Avicenne parlait de deux types de cire : claire et noire, cette dernière étant probablement de la propolis. Il a dit : « elle a les propriétés d'enlever les pointes de flèches et les épines, se dilue, se nettoie facilement et adoucit grandement ».

Au 11^{ème} siècle, les blessures causées par les flèches recommande la propolis pour les désinfestations. En France, on trouve des traces de son utilisation aux XVIII^e et XIX^e siècles dans le traitement des plaies. Mais surtout pendant la guerre des Boers en Afrique du Sud, il a atteint son apogée [5].

I.3. Etymologie du mot propolis

Le mot propolis est d'origine grecque et diviser en deux parties : « pro » de face et de côté « polis », ceci est observé par les apiculteurs qui voient cette résine « en face » à l'entrée de la ruche.

Son étymologie dérive également du verbe propolire, signifiant "couvrir". En effet, l'abeille enduirait l'intérieur de son abri avec cette résine pour se protéger des attaques microbiennes [6].



Figure I.1. L'aspect de la propolis

I.4. Définition de la propolis

C'est une matière résineuse, gommeuse, visqueuse et collante d'une couleur variable comme le jaune clair ou noir, le vert ou le brune, extraite par les abeilles de l'écorce et des pousses de certaines plantes par exemple : peuplier, bouleau, saule, orme, épicéa, sapin, cocotier, etc. Auxquels elles ajoutent leurs propres sécrétions (salive et enzymes) [7].

Dans la ruche, les abeilles modifient sérieusement ces résines avec leurs propres sécrétions en propolis, leur diversité d'espèces rend la standardisation plus difficile [3], leur utilisation par les abeilles sert à éloigner les micro-organismes pathogènes et les insectes. En mélangeant cette résine avec de la cire et des enzymes sécrétées par leur système glandulaire, ils obtiennent une sorte de colle qu'on appelle : la propolis. [8].

Plusieurs auteurs ont observé qu'un très petit nombre d'abeilles dans la ruche sont impliquées dans l'absorption de résine et la production de propolis [9].



Figure I.2. Propolis brute



Figure I.3. Abeilles porteuse de propolis

Dans la colonie

I.5. Origine de la propolis

La composition de la propolis est issue de trois sources :

I.5.1. Origine botanique

Il existe différents types de propolis produits en fonction de la zone géographique de la ruche, des plantes présentes dans cette zone, de leur disponibilité au cours de la saison et du type d'abeille. Les principales espèces d'arbres connues pour produire de la propolis sont divers conifères (pin, sapin, épicéa) et plusieurs espèces de peupliers (qui semblent être la source la plus riche).

I.5.2. Animal

Des substances produites par les abeilles (la cire, la salive...).

I.5.3. Matières secondaires

Elles sont ajoutées pendant la production de la propolis comme le pollen, le nectar ou le miel, selon l'origine de la plante récoltée par les abeilles [3].

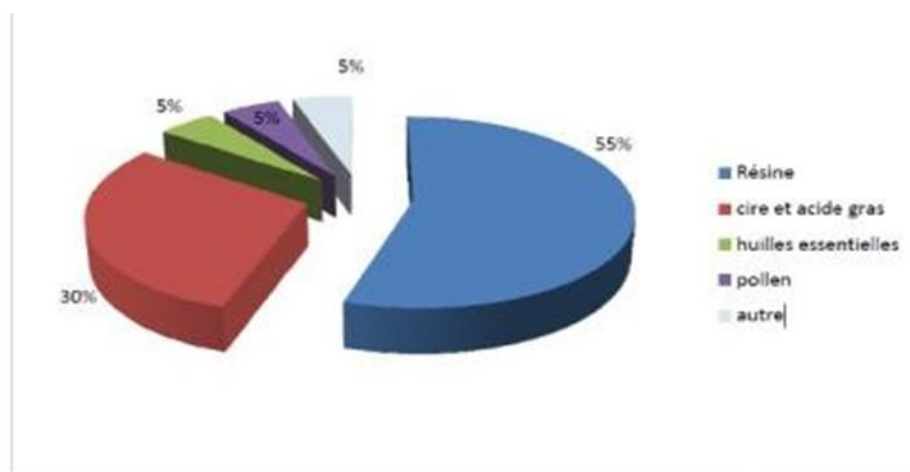
**Figure I.4.** Peuplier**Figure I.5.** Pin

I.6. Composition de la propolis

La composition chimique de la propolis est très complexe et comprend près de 150 composants différents. Cependant, cela peut varier considérablement d'une espèce à une autre [3].

La propolis collectée par les abeilles contient les constituants suivants :

- Résines et baumes 50 à 55%
- Cire 30 à 40%
- Huiles volatiles ou essentielles 5 à 10%
- Pollen 5%
- Matières diverses 5%

**Figure I.6.** La composition chimique de la propolis

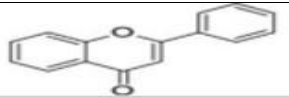
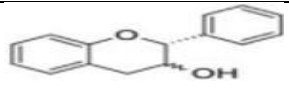
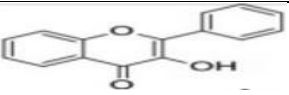
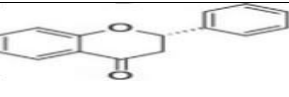
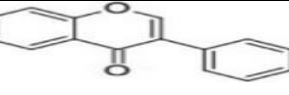
I.6.1. Polyphénols

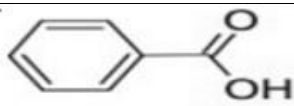
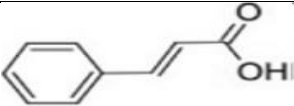
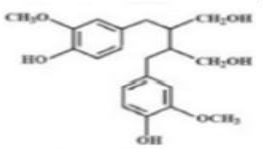
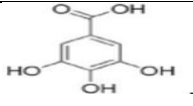
La propolis contient aussi de nombreux autres composants tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les acides organiques, les oligo-éléments et de différentes vitamines [7].

Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, sont des substances organiques les plus courantes en propolis. Ces composés organiques sont responsables des effets biologiques de la propolis et sa capacité à piéger les radicaux libres. On peut distinguer différentes classes de polyphénols [5].

Quelques principales classes des polyphénols sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau I.1. Différentes classes de polyphénols

classes	Sous-classes	Exemples	Structures basiques
Flavonoïdes	Flavones	Chrysine, Acacétine	
	Flavanols	Catéchine, Epicatéchine	
	Flavonols	Myricétine, Quercétine	
	Flavanones	Naringénine, Naringine	
	Isoflavones	Génistéine, Glycitéin	

Non flavonoïdes	Les phénols simples et les acide phénolique	Acide hydroxy- benzoïque	Acide gallique, Acide vanilique, Acide salicylique	
		Acide Hydroxy- cinnamique	Acide cinnamique, Acide p-coumarique Acide caféique	
	Lignanes et lignines		Pinorésinol, Podophillotoxine, Steganacin	
	Tannins		Castaline, Glucose	

I.7. Utilisation de la propolis

I.7.1. Par les abeilles

Généralement, la propolis est utilisée dans la ruche comme ciment, mastic ou peinture et scellant, la propolis sert à colmater les fissures et crevasses de la ruche pour la rendre plus hermétique. Les abeilles l'utilisent naturellement aussi pour assainir leur milieu de vie et éviter la contamination dans la ruche. Au début de l'hiver, les abeilles réduisent le trou de passage pour éviter la pénétration du froid et assurer une meilleure thermorégulation dans la ruche.

Immédiatement derrière le port, les abeilles construisent de véritables forteresses de propolis pour empêcher les gros animaux indésirables de pénétrer dans la ruche [8].

I.7.2. Par l'homme

La propolis est un produit très utilisé par l'homme. En particulier dans divers domaines, tels que :

I.7.2.1. Utilisation en cosmétique

La propolis et ses extraits sont beaucoup utilisés en dermatologie et en cosmétique. Dans de nombreuses études, les scientifiques se sont concentrés sur l'effet de la propolis sur la régénération et le renouvellement des tissus. En raison de ses propriétés bactéricides et fongicides, elle offre de nombreux avantages dans diverses applications cosmétiques.

Des études ont montré qu'il peut agir comme un agent de protection solaire et peut donc être utilisé comme ingrédient dans les crèmes solaires.

I.7.2.2. Utilisation en médecine

Aujourd'hui, la propolis est utilisée comme aliment en médecine traditionnelle, en apithérapie. De plusieurs études mettent en avant ses propriétés antibactériennes, antifongiques, antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses etc.

La Propolis est utilisée pour traiter de nombreuses maladies comme :

- Les problèmes cardio-vasculaires.
- Les infections de l'appareil respiratoire.
- Les Soins dentaires.
- Les ulcères.
- Les infections des muqueuses et des lésions.
- Le cancer.

Elle est également utilisée pour soutenir et renforcer le système immunitaire [5].

I.7.2.3. La propolis comme complément alimentaire chez les patients diabétiques

Le traitement à la propolis peut être utile comme complément alimentaire chez les patients atteints de diabète de type II en améliorant l'état glycémique, en réduisant la résistance à l'insuline et en améliorant le statut antioxydant. Ce complément alimentaire sans effets secondaires peut augmenter l'efficacité de médicaments contre le diabète sur ordonnance et peut être utilisé dans les matériaux d'emballage pour les animaux domestiques en technologie alimentaire [8].

I.8. Récolte de la propolis

I.8.1. Par l'abeille

La propolis est le résultat de nombreuses opérations successives :

D'abord l'abeille collecte la substance résineuse dans les bourgeons de certains arbres, l'abeille enlève de petits morceaux de résine des bourgeons avec ses mandibules. Elle utilise ses pattes pour prélever le butin des mandibules pour les empiler dans les corbeilles à pollen des pattes

postérieures. Après l'abeille transporte sa récolte de résine à la ruche. Certaines abeilles sont donc chargées de vider les corbeilles à pollen.

Les ouvrières doivent attendre que la résine se soit un peu ramollie à la température de la ruche pour pouvoir l'extraire des corbeilles à pollen dans lesquelles elle est emprisonnée. Pour accélérer l'échauffement de la résine, les ouvrières l'enrichissent alors de leur sécrétion de leur salive. Sa richesse enzymatique conduit à la transformation de la matière première résineuse extraite dans les bourgeons [3].



Figure I.6. Récolte de la propolis

par l'abeille



Figure I.7. Butineuses de propolis

Dans la ruche

I.8.2. Par l'homme

Il existe diverses techniques de récolte. La quantité de propolis peut être distinguée selon les techniques utilisées.

- La technique classique la plus utilisée consiste à racler et gratter les cadres ou les parois de la ruche, de préférence à température assez basse, la propolis est donc dure et cassante, après récolte il faut la nettoyer avant utilisation (enlever les morceaux de bois, abeille pattes ou ailes, cire, etc.)
- Une technique de grille développée à cet effet. Ce processus produit une propolis de meilleure qualité qui contient moins d'impuretés [3].



Figure I.8. Récolte par grille



Figure I.9. Récolte par grattage

I.9. Les propriétés de la propolis

I.9.1. Propriétés physico-chimique

- **Consistance** : La Propolis est une matière de consistance différente selon la température :
 - 15°C, elle est dure et friable.
 - 30°C, elle est douce et malléable.
 - Entre 30°C et 60°C, elle est fin et collant.
- **Le point de fusion** : Il est variable, et se situe entre 60 et 70 °C, mais peut atteindre 100 °C et plus [10].
- **La Solubilité** : elle est très peu soluble dans l'eau, partiellement soluble dans l'alcool, acétone...
- **La Densité** : elle est de 1,2 (plus que l'eau) [7].

I.9.2. Caractéristiques organoleptiques :

La propolis est une substance résineuse d'aspect hétérogène aux propriétés suivantes :

- **Odeur** : Elle a une odeur différente selon l'origine, généralement avec un agréable arôme sucré mêlé à l'arôme du miel, de la cire et d'autres produits.
- **Goût** : Elle est piquant, parfois amer, qui engourdit la muqueuse buccale.
- **Couleur** : varie selon l'origine, du jaune clair au brun très foncé, presque noir, en passant par toutes les nuances de brun (ocre, vert-brune et rouge-brune) [10].



Figure I.10. Différentes couleurs de propolis

I.10. Propriétés biologiques

I.10.1. Propriétés antifongiques

La propolis a montré un effet contre divers champignons. Elle a été testée pour inhiber les champignons aflatoxygéniques et pour réduire la croissance des conidies chez *Aspergillus flavus*. La propolis est efficace contre *Candida albicans*. Dans une autre étude, la propolis française a été utilisée efficacement contre les pathogènes fongiques humaines tels que : *Candida albicans* et *Candida glabrata* [5].

I.10.2. Propriétés antivirales

Des études ont montré que la propolis et/ou ses composants sont efficaces contre les virus. La propolis et certains de ses constituants ont un effet prophylactique contre le virus de la grippe et réduisent ses symptômes. Il a été démontré que les crèmes à base de propolis réduisent la durée des lésions et soulagent la douleur [8].

I.10.3. Les propriétés immunologiques

La propolis augmente le nombre d'anticorps et la résistance de l'organisme aux infections [7].

I.10.4. Les Propriétés anti-inflammatoires et antirhumatismales

L'activité antiinflammatoire de la propolis est proche à celle de l'aspirine. L'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les flavonoïdes lui confère un effet utile dans l'inflammation de la cornée, de la trachée, du pharynx et de la polyarthrite rhumatoïde [3].

I.10.5. Les effets de la propolis sur le corona virus

Des études précliniques ont montré que la propolis inhibe l'inflammation (en régulant les cytokines pro-inflammatoires) typiquement observée dans les formes plus virulentes de Covid-19. De plus, selon des modèles informatiques, elle pourrait avoir un effet bloquant sur une enzyme essentielle qui contribue à la réplication de SARS-COV2 [3].

I.10.6. Effets contre les infections bucco-dentaire

La propolis est connue pour ses propriétés désinfectantes et cicatrisantes, elle peut être utilisée pour soigner les aphtes, elle aide aussi au nettoyage de la bouche. Elle a un effet préventif sur les micro-organismes responsables des caries et aide à soulager la gencive [5].

I.10.7. Activité antibactérienne

La propolis a un effet significatif sur les bactéries. Le mode d'action de la propolis repose sur l'interaction de composés phénoliques avec d'autres composés. La propolis a un effet bactéricide en bloquant la division cellulaire, en perturbant le cytoplasme et en inhibant la synthèse des protéines [5].

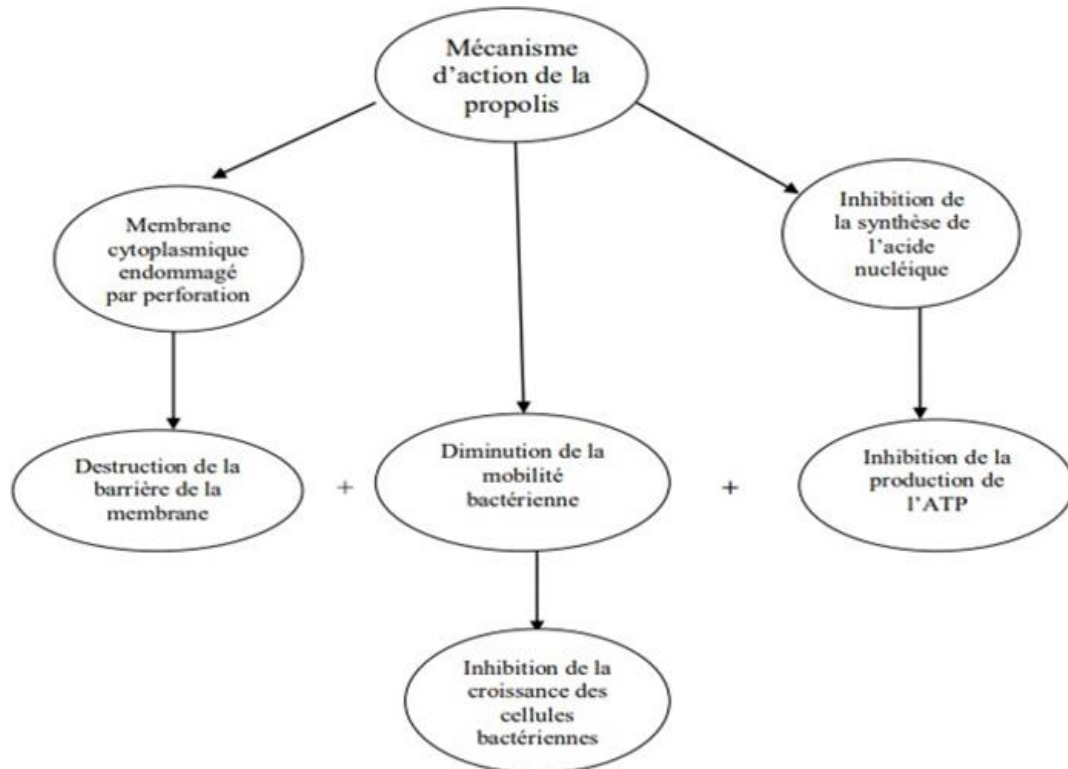


Figure I.11. Mécanisme d'action de la propolis comme un agent antibactérien

I.10.8. Activité anticancéreuse

Selon les recherches avancées, l'extrait de propolis a la capacité de combattre le cancer dans quatre lignées cellulaires cancéreuses à différentes concentrations, elle peut induire l'apoptose et la cytotoxicité de ces cellules tumorales. Les flavonoïdes contenus dans la propolis ont un effet positif sur le cancer du sein, du poumon, de la cavité buccale, de l'estomac, du rectum et de la peau [11].

I.10.9. Autres propriétés






Voici quelques autres propriétés biologiques de la propolis [3] :

- Action analgésique.
- Effet protecteur sur la muqueuse gastrique.
- Effet anti-UV.
- Effet laxatif.
- Effet hépatoprotecteur.

I.11. Les types de médicaments à base de la propolis

Commercialement, la propolis se présente sous de nombreuses formes, le plus souvent sous forme de spécialités parapharmaceutiques ou en combinaison avec d'autres produits à usage thérapeutique ou cosmétique. Le tableau suivant illustre les formes commercialisées de la propolis [8].

Tableau I.2. Les formes commercialisées de la propolis.

Nom commercial	La forme galénique	Applications	Figures
Propolis bio	Sirops	Maux de gorge ou de toux.	
Abi propolis 100 ml	Crème	Irritation cutanée et petites plaies	
Activox propolis miel citron arkopharma	Comprimés	Adoucit la gorge	
Dentolis pâte dentifrice propolis	Pâte dentifrice	Protection des gencives	
Propolis spray nasal bio	Spray	Nettoyage nasale et rhinite.	

I.12. Conservation

Il semble préférable de stocker la propolis dans des récipients opaques pour la protéger de la lumière. Ses constituent doivent être fermés et protégés de la chaleur et de l'humidité [4].

I.13. Propriétés biologique de la propolis de melbou

Les propriétés de la propolis de melbou sont dans le tableau suivant [97]:

Tableau I.3. Différentes propriétés de la propolis de melbou

Propriétés biologiques	
1	Un fort effet contre les bactéries S. aureus et C. albicans
2	Un pourcentage élevé d'inhibition de la dénaturation de la protéine BSA
3	Une meilleure préservation antioxydante et de cryoconservation des spermatozoïdes

I.14. Conclusion

La propolis est une alternative thérapeutique utilisable contre plusieurs pathologies humaines, tant bénignes que morbides. Le fait que les composés chimiques de la propolis soient isolés cela permet de les quantifier et de les identifier [4].

Chapitre II : Les liposomes

II.1. Introduction

Les liposomes sont des vésicules sphériques ayant un noyau hydrophile entouré des bicouches lipidiques. La vectorisation des médicaments a une grande importance dans la recherche en pharmacie galénique, Pour atteindre l'efficacité thérapeutique des médicaments les chercheurs ont développé plusieurs méthodes de préparation des liposomes. Ces médicaments ont été proposé pour améliorer la pénétration intracellulaire de la substance active dans l'organisme, bien précisément dans les sites d'action (cellules cibles, tissus), la distribution sera indépendante, le PA sera protégé, la biodisponibilité vas être meilleure. Le liposome est aussi utilisé dans la fabrication des vaccins, en dermatologie, cosmétologie et en alimentaire [12].

II.2. Historique

Le biophysicien britannique Dr Alec Douglas Bangham a été la première personne à introduire le terme "Liposomes" en 1961, à l'Institut de Cambridge en Angleterre. Ils sont été explorés lorsqu'il étudiait avec son collègue Robert W Horne qui est un virologue et expert en microscopie électronique, les phospholipides et la coagulation du sang au microscope électronique. Les images microscopiques ont constitué la première preuve possible de la structure lipidique bicouche de la membrane cellulaire.

Pendant les années 1970 plusieurs chercheurs ont consacré leur temps et effort pour étudier et déterminer les paramètres physico-chimique et les méthodes de préparations des liposomes.

Depuis 1990 jusqu'à nos jours les liposomes sont utilisés dans plusieurs domaines d'études scientifiques, la chimie, la biologie, biochimie et biophysique. Des médicaments via liposome ont été commercialisés après la validation des essais cliniques [13; 14].

II.3. Définition et structure des liposomes

Le terme 'Liposome' dérive de deux mots Grecque 'Lipo' qui veut dire gras et 'Soma' qui signifie corps.

Le liposome est défini comme une vésicule sphérique ainsi qu'une membrane composée de bicouches de phospholipides similaires à celle des membranes cellulaires et du cholestérol. Ils peuvent encapsuler des substances hydrophiles dans la cavité centrale aqueuse et des substances hydrophobes au niveau des chaînes lipidiques lipophiles, les liposomes sont donc amphiphiles [13].

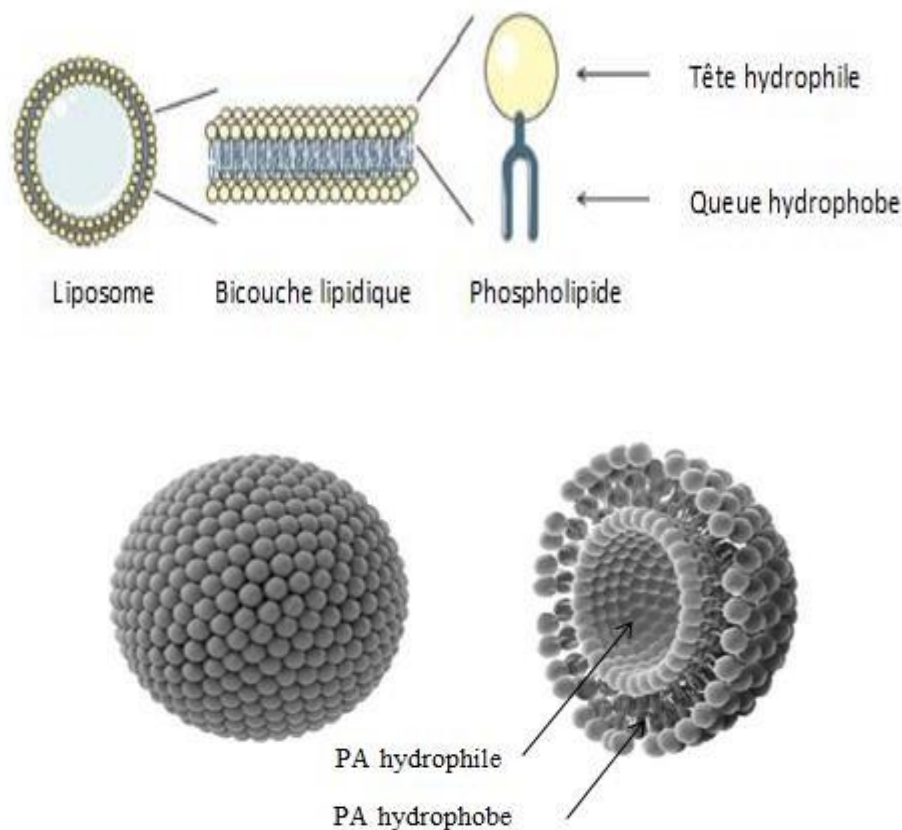


Figure II.1. Liposome et phospholipide

II.4. Les constituants des liposomes

Les constitutions majeures des liposomes sont :

II.4.1. Les phospholipides

Les phospholipides sont des poudres ou grain blanc parfois des solutions incolores à base de chloroforme. Ils peuvent être d'origine naturelle telle que soja, ou modifiés chimiquement. Ils résultent de l'estérification du glycérol par deux acides gras et par l'acide phosphorique. Ce sont des molécules amphiphiles, avec une tête polaire (hydrophile) formée d'un groupe de phosphate et du glycérol liée à une chaîne apolaire hydrophobe (queue) constituée de deux chaînes aliphatiques (acide gras) (chaîne carbone), caractérisées par leur longueur et leur degré d'insaturation (sature ou insaturé), soluble dans les solvants organiques. Les phospholipides sont les principaux composants des membranes biologiques, ce sont les éléments constitutifs des liposomes. On distingue : phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycérol (PG), du glycérol phosphatidylsérine (PS), et du glycérol phosphoéthanolamine (PE),

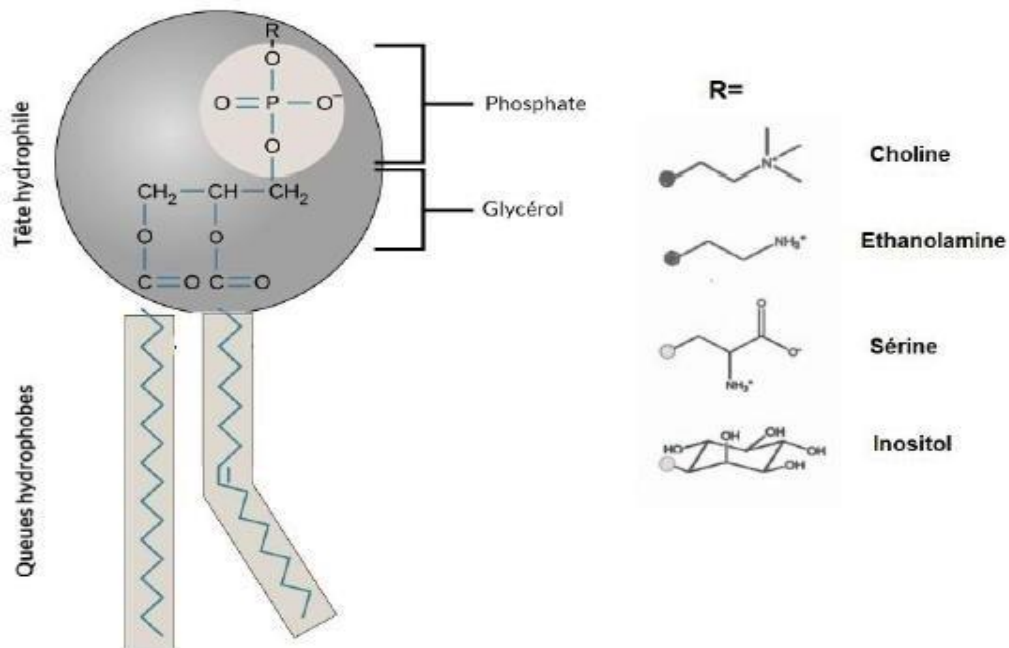


Figure.II.2. Structure de phospholipide

II.4.1.1. La phosphatidylcholine (PC)

Les phosphatidylcholines sont des molécules non solubles dans l'eau. Elles développent une configuration d'une bicouche plane dans les milieux aqueux afin de diminuer les interactions indésirables entre les milieux aqueux de masse ainsi que dans l'acide gras non estérifié. Les feuilles sont ensuite pliées en capsules fermées.

II.4.1.2. La phosphatidylsérine (PS)

Les phosphatidylsérines sont comptées parmi l'ensemble des phospholipides. Elle se produit naturellement dans les membranes cellulaires internes, en particulier dans les cellules du système nerveux. C'est le principal phospholipide qui existe dans le cerveau. Elle améliore la mémoire et la cognition dans les premiers stades de la maladie d'Alzheimer, la gestion du stress chronique, de la dépression et des troubles de la mémoire. Elle a également été utilisée pour augmenter les performances des athlètes. C'est l'une des rares substances qui peuvent sans difficulté traverser la barrière hémato-encéphalique.

II.4.2. Le cholestérol

La qualité de l'encapsulation des liposomes varie en fonction des variations de la composition de la bicouche phospholipidique. Généralement, les liposomes préparés en utilisant uniquement des phospholipides ne sont pas suffisamment rigides. Lors du conditionnement, ces liposomes laissent échapper le médicament encapsulé.

Afin d'éviter ces fuites on utilise le cholestérol qui est en effet un composant absolument vital (indispensable essentiel) des bicouches lipidiques naturelles et sa présence dans les liposomes induit une modification drastique (radicale) de leurs caractéristiques. L'empilement compact des bicouches (occupe moins d'espace) augmente la rigidité et réduit la perméabilité des molécules hydrosolubles. En réduisant la perméabilité des bicouches, le cholestérol améliore la durabilité des médicaments hydrophiles. Le cholestérol réduit la fluidité au-dessus de la température de transition de phase (T_c) pour rendre la bicouche plus ordonnée.

II.4.3. Matériau polymère

Les phospholipides synthétiques avec un groupe diacétylène dans la chaîne hydrocarbonée sont polymérisés sous l'influence de la lumière UV, entraînant la formation de liposomes polymérisés. Les lipides polymérisables contiennent un diène conjugué ou un méthacrylate.

II.4.4. PEG

Lipides PEG ont une structure similaire à celle des phospholipides, mais à la place de la première chaîne hydrocarbonée acyle, ils ont une chaîne polyéthylène glycol (PEG). Le glycérol fournit le squelette et les deux chaînes hydrocarbonées R1 et R2 peuvent varier en longueur. La taille de la chaîne PEG peut être de 8 à 45 sous-unités (n). La taille de la tête du PEG par rapport à la longueur de la chaîne hydrophile est la propriété fondamentale qui permet la formation de liposomes. Ce groupe de nouveaux lipides possède des propriétés qui permettent la formation de liposomes thermodynamiquement stables. Les lipides PEG prolongent la demi-vie plasmatique des médicaments encapsulés. L'enrobage des surfaces des liposomes avec du PEG supprimerait l'absorption du médicament par le réticulo-endothélial.

II.4.5. Autres constituants

Divers autres lipides ou d'agents de surface sont utilisés pour former des liposomes. De nombreux tensioactifs à chaîne unique ou lipides non ioniques peuvent former des liposomes lorsqu'ils sont mélangés avec du cholestérol. Une variété d'amphiphiles mono et dialkyles polyglycérolés et polyéthoxylés sont principalement utilisés dans les préparations cosmétiques. Les lipides à chaîne unique et à double chaîne ayant des chaînes fluorocarbonées peuvent former des liposomes très stables. La stéarylamine et le phosphate de diacétyle sont incorporés dans les liposomes pour leur conférer des propriétés conservatrices ou protectrices [15.16 ; 17 ; 18 ; 19].

II.5. Préparation des liposomes

II.5 .1. Méthode de préparation

Les liposomes sont préparés par plusieurs méthodes le choix de la méthode de préparation dépend de la nature de liposome qu'on veut produire.

II.5.1.1. Méthode d'injection éthanolique

Dans cette méthode consiste à dissoudre les constituants hydrophobes dans la solution organique, la solution lipidique d'éthanol est rapidement injectée directement à travers une aiguille fine dans un vaste excès d'eau distillée (milieux aqueux) ou dans une solution tampon. L'incorporation du médicament dans la vésicule liposome dépend de son caractère hydrophile/hydrophobe. Cette technique simple a mise en œuvre en utilisant un solvant non nocif qui est l'éthanol, et peut être éliminer par évaporation. Il est difficile d'éliminer tout l'éthanol, ce qui peut conduire à la formation d'un azéotrope avec l'eau. En présence d'éthanol même à faibles quantités il est tout à fait possible que plusieurs macromolécules biologiquement actives soient inactivées. [20 ; 21].

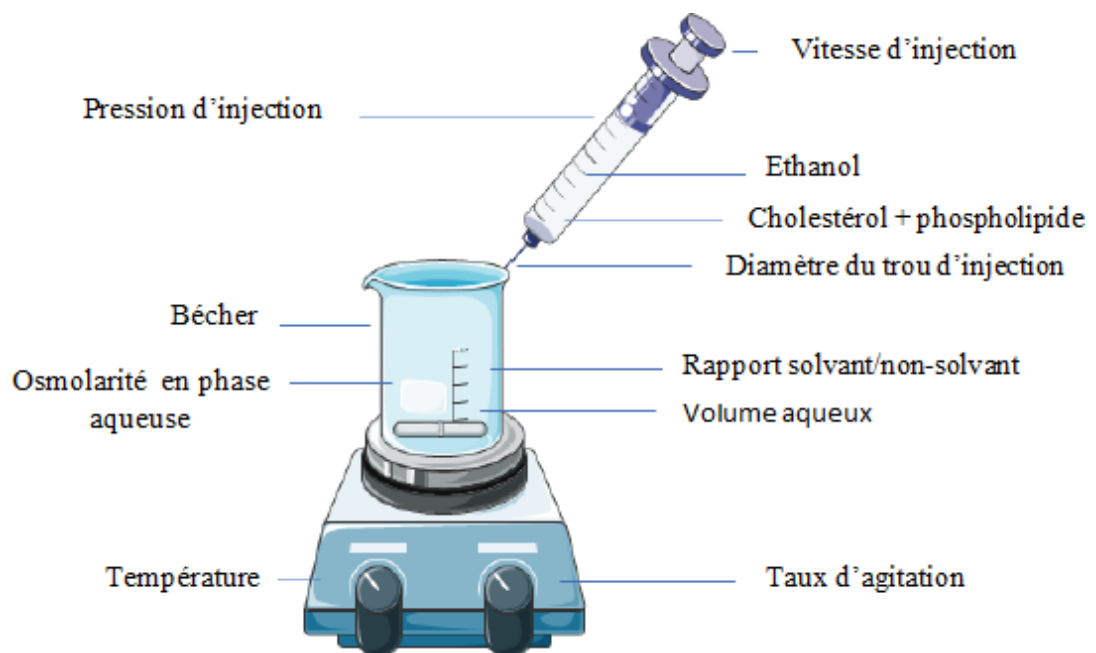


Figure.II.3. La méthode d'injection.

II.5.1.2. Les méthodes utilisant des liposomes préformés : La congélation-décongélation

A partir d'une suspension de liposomes SUV ou MLV, cette procédure est répétée avec plusieurs cycles de congélation dans l'azote liquide suivis d'une décongélation dans l'eau chaude. Les LUV représentent le résultat d'une fusion des SUV d'origine ou d'une dissolution MLV [22].

II.5.1.3. La méthode d'Evaporation en phase inverse

C'est la méthode la plus simple de fabrication des liposomes, dans laquelle les lipides sont dissous puis remis en suspension dans un solvant aqueux. Ce processus doit avoir lieu dans des conditions de température selon le type de lipide choisi, en effet les liposomes ne se forment que dans une température plus élevée de leur transition de phase.

Ce procédé permet d'obtenir des liposomes monocouches à grande cavité aqueuse LUV, également appelés "Reverse Phase Evaporation Vésicules". Dans cette phase, les phospholipides sont placés à l'interface entre les 2 phases non miscibles. Après sonication pendant plusieurs minutes, ils forment une émulsion huile-eau dans laquelle les phospholipides s'organisent en micelles inverses entourant les compartiments aqueux. L'élimination lente du solvant organique par évaporation sous pression réduite rapproche ces micelles inverses et forme un gel. La pression est encore réduite pour permettre une évaporation complète de l'éther et provoquer la rupture du gel. Enfin, les monocouches de phospholipides fusionnent pour former des liposomes. Les vésicules résultantes ont un volume d'encapsulation aqueux quatre fois le volume des MLV obtenues par hydratation d'une membrane lipidique et 30 fois le volume des SUV obtenues par sonication. Ce procédé permet d'obtenir une encapsulation maximale de la phase aqueuse pour encapsuler une variété de macromolécules solubles dans l'eau avec des rendements élevés. Le principal inconvénient de cette technique est le contact des particules à encapsuler avec le solvant organique [22 ; 23].

II.5.2. Les facteurs influent sur la propriété des liposomes

Il existe plusieurs paramètres qui influent les caractéristiques des liposomes produits soit à échelle laboratoires ou à l'échelle industrielle, comme la vitesse d'injection, le pH la concentration en lipide, la température, et l'osmolarité.

II.5.2.1. L'influence de la vitesse d'injection

La vitesse d'injection a un effet mineur (n'influence pas) sur la taille des particules des liposomes, elle affecte sur l'indice de polydispersité (PDI).

II.5.2.2. La vitesse d'agitation

Plusieurs études ont montré que le temps d'agitation peut influencer la taille de la particule.

II.5.2.3 L'influence de la concentration

La concentration est le principal facteur qui influence la taille des vésicules, son augmentation entraîne une augmentation de la taille de la particule du liposome à cause de la viscosité élevée qui ralentit la vitesse de diffusion du solvant organique vers la phase externe [24].

II.5.2.3. Influence de l'osmolarité

L'effet de l'osmolarité du milieu aqueux a montré des effets insignifiants sur la taille de la particule du liposome produit [25].

II.5.2.4. Influence du volume d'éthanol

L'injection d'une quantité modérée de lipide dans un grand volume d'éthanol produit des liposomes de petite taille. Le volume d'éthanol peut aussi intervenir dans l'efficacité d'encapsulation des médicaments hydrophiles. Les liposomes formés ont un petit noyau hydrophile.

II.5.2.5. L'influence du ph de la phase aqueuse

Le ph a un effet négligeable sur la taille des vésicules, mais il peut affecter l'homogénéité.

II.5.2.6. L'influence de la viscosité de la phase aqueuse

La viscosité peut intervenir dans la taille des particules.





II.5.2.7. L'influence de type de principe actif

La méthode d'injection éthanolique favorise les médicaments solubles dans l'éthanol et les médicaments hydrophobes plutôt que les médicaments hydrophiles [26].

II.6. Classification

Les liposomes sont classés selon leur taille et selon la bicouche [27] :

Tableau II.1. Les différents types des liposomes

Nom	Abréviation	Taille	Image
-Vésicules Multi-lamellaires	MLV	$> 0.5\mu m$	
Vésicules Oligolamellaire	OLV	$0.1-1.0 \mu m$	
Vésicules Uni- Lamellaires	ULV		
Vésicules Multi-vésiculaires	MVV	$>1 \mu m$	
Vésicules Medium uni-lamellaires	MUV		
Petites vésicule uni- lamellaires	SUV	$20-100 nm$	
Vésicules Grand uni- lamellaires (LUV)	GUV	$>1 \mu m$	
Vésicules uni- lamellaires géantes	LUV	$>100 nm$	

II.7. Domaines d'applications

Les liposomes sont appliqués dans divers domaines :

II.7.1. Pharmaceutique

L'utilisation des liposomes résulte un grand intérêt dans la recherche pharmaceutique, utilisé pour l'encapsulation des bioactifs pour les transporter sans dégradation dans les cellules jusqu'au site d'action. Plusieurs médicaments ont été fabriqué pour soigner latumeur, et l'infection. Comme Exemple :

- Amphotéricine B (fungizone sirop) de propriété antifongique.

- Doxorubicine qui est un anti-cancer [28 ; 29].

II.7.2. Cosmétologie

Les applications des liposomes dans le traitement de la peau sont basées sur la similitude de la structure des bicouches du liposome avec celle des membranes naturelles de la peau. Cela favorise la pénétration de la substance pour atteindre les cellules vivantes de derme ou l'épiderme, en passant à travers la couche corne sans la dégradation du produit, et apporte une meilleure biodisponibilité. Différentes formes de préparations à base de liposomes, telles que les solutions, les crèmes, les gels et les pommades, qui jouent un rôle essentiel dans la prévention et le traitement des maladies de la peau et qui présentent des propriétés : Anti-inflammatoires, la régénération des tissus, hydratants, antioxydants, anticellulite et antimicrobien [30 ; 31].

II.7.3. Alimentaire

La science alimentaire représente une grande importance dans notre vie quotidienne, pour cela l'industrie alimentaire utilise la nanotechnologie pour ces produits tels que les liposomes, qui apporte une amélioration des caractères organoleptiques (la couleur, le goût, la texture, La consistance, et l'odeur), mieux conservé les aliments durant le stockage et le transport contre le changement climatique, chimique et enzymatique (produit laitier). Ils sont également capables d'augmenter l'absorption et la biodisponibilité du nutriment (vitamine, minéraux) [32 ; 33].

II.8. Avantages et inconvénients

Les liposomes procèdent plusieurs avantages dans plusieurs domaines qui sont à l'intérêt de l'homme [34] :

Tableau II.2. Les avantages et les inconvénients des liposomes

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> - Ils permettent un ciblage sélectif et passif du tissu tumoral - Les liposomes sont biocompatibles, complètement biodégradables, non toxiques et non immunogènes. - Ils conviennent à l'administration de médicaments hydrophobes, hydrophiles et amphiphiles. - Protection du médicament encapsulé de l'environnement externe. - Efficacité thérapeutique (meilleure). - Stabilité accrue grâce à l'encapsulation. - Réduction de l'exposition des tissus sensibles à un médicament toxique. - Amélioration de la stabilisation des protéines. - Fournir une libération prolongée. - Alternier la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des médicaments. - Utilisé pour délivrer la substance active des médicaments hydrophiles et lipophiles dans le site d'action. 	<ul style="list-style-type: none"> - Le coût de production est élevé. - Fuite et fusion des médicaments/molécules encapsulés. - Les phospholipides subissent parfois une oxydation et une réaction d'oxydation et d'hydrolyse. - Demi-vie courte dans le sang. - Moins de stabilité. - Des réactions allergiques peuvent se produire Même si les liposomes ressemblent à des membranes cellulaires, ils restent des corps étrangers. - Problème pour cibler divers tissus en raison de leur grande taille.

II.9. Encapsulation d'un principe actif dans le liposome

Il y a deux modes d'introduire le PA dans les liposomes :

II.9.1. Encapsulation passive

Lors de la préparation des liposomes, le PA hydrophile est directement dissous dans la phase aqueuse utilisée pour l'hydratation du film phospholipidique.

Le PA lipophile est dissous dans le solvant organique avec les phospholipides. Après l'élimination du solvant organique, les chaînes carbonées de phospholipides serviront comme un environnement solubilisant pour ce PA lipophile et il restera dans la bicouche phospholipidique du liposome [35].

II.9.2. Encapsulation active

Dans cette technique les molécules actives vont être introduire par diffusion dans la bicouche d'un liposome vide préformé. La nature de la bicouche facilite la diffusion des PA neutre et lipophile, en suivant un gradient de concentration jusqu'à l'équilibre. Durant ce processus les particules hydrophiles se trouvent dans la phase aqueuse attaché aux groupements de tête des phospholipides polaires [36].

II.10. Conclusion

L'utilisation des liposomes dans la fabrication des médicaments ont un grand impacte dans plusieurs domaines. Cette technique est en cours de développement pour avoir de nouvelles formes thérapeutiques jusqu'à nos jours.

Chapitre III : Les cyclodextrines

III.1. Introduction

Cyclodextrines (CD), notamment appelées cycloamyloses. Des oligosaccharides cycliques de Surface extérieure hydrophile et une cavité lipophile au centre. Les principales CD naturelle sont α -CD, β -CD et γ -CD apportent des propriétés physico-chimiques différentes. Elles sont utilisées dans divers domaines industriels agroalimentaires, cosmétiques, agrochimie et essentiellement dans l'industrie pharmaceutique. En effet, les cyclodextrines peuvent être utiliser dans le but d'augmenter la solubilité en formant des complexes d'inclusions, la complication avec les CD entraine aussi une amélioration de la dissolution, la stabilité en solution. Elles peuvent aussi agir comme transporteur du médicament [37].

III.2. Historique

L'histoire des cyclodextrines a été marquée par plusieurs périodes et chercheurs de 1891 à nos jours. En 1891, Villiers découvre la formation d'un oligosaccharide, lorsque l'amidon est coupé par une enzyme. En 1904, Schardinger introduit la α -CD cristallisée et la β -CD cristallisée découverte suite à la formation de deux produits cristallisés lors de ses recherches sur l'altération des aliments, ce qui a était complétée par les travaux de Freudenberg se dernier découvre la γ -CD ou cyclooctaamylose en 1948. La cyclodextrine est introduite 1 an plus tard par Cramer.

En 1970, les premières recherches toxicologiques ont établi que la β -cyclodextrine précédemment étudiée était une substance inoffensive. Cela a donné lieu à des résultats spectaculaires. Aujourd'hui, le coût des cyclodextrines a énormément diminué, de sorte que les nombres des scientifiques intéressés par les cyclodextrines ne cesse de croître [38 ; 39].

III.3. Définition

Les cyclodextrines forment une famille d'oligosaccharides cycliques, issue de la dégradation enzymatique de l'amidon par les cyclodextrines Glucosyl Transférases (CGT).

Ce sont des molécules cristallines et amphiphiles avec une surface extérieure hydrophile et une cavité centrale (intérieur) hydrophobe. Les molécules de cyclodextrine sont relativement grandes et comportent un certain nombre de donneurs et d'accepteurs d'hydrogène, ce qui explique qu'en général, elles ne traversent pas les membranes lipophile. Le choix de la nature de cyclodextrine dépend des résultats attendus (voir la figure III.1) [40 ; 41].

III.4. Structure chimique

Les cyclodextrines sont des molécules creuses, composées de plusieurs unités de glucose liées entre elles par la liaison α (1-4), de manière covalente par des atomes d'oxygènes, hydrogènes et de carbones $(C_6H_{10}O_5)_n$. Le n représente l'unité de glucose qui varie de six, sept ou huit jusqu'à douze, qui sont désignées respectivement par α -, β - et γ -CD. Les cyclodextrines ont une forme tronconique ayant des groupements hydroxyles positionnés sur les carbones 2, 3 qui se trouve sur le côté la plus large nommée face secondaire alors que sur le côté le plus étroit la face primaire avec les groupements hydroxyles liée au carbone 6 (voir les figures III.2 et 3) [40 ; 41 ; 42].

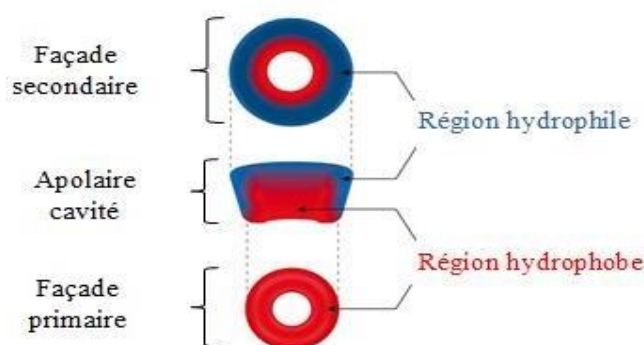


Figure III.1. Schéma d'une "capsule" cyclodextrine montre les régions hydrophobes et hydrophiles.

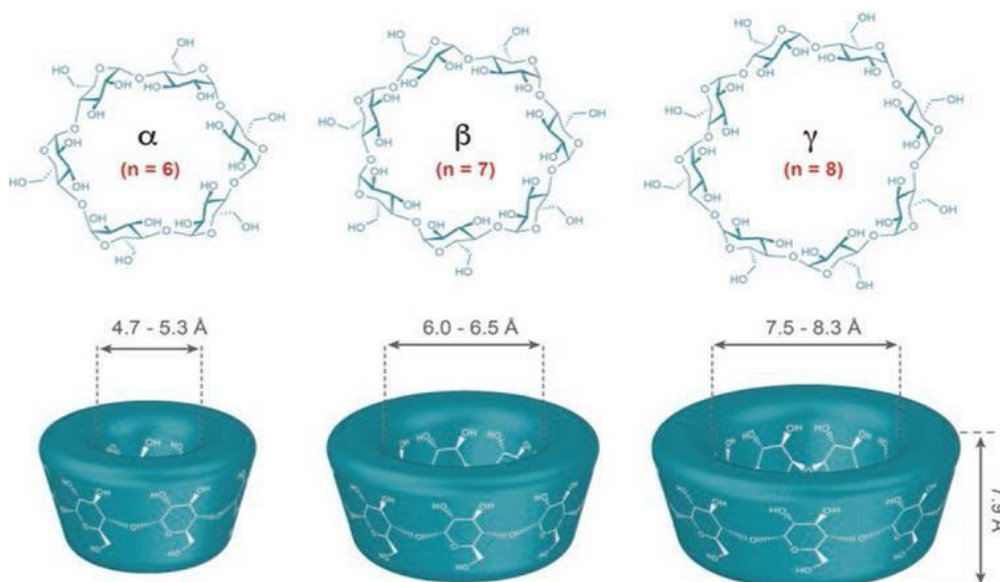
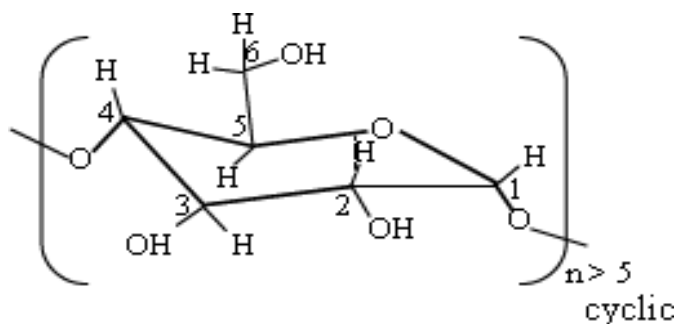


Figure III.2. Schéma de la structure chimique de α -, β - et γ cyclodextrines. Les cyclodextrines natives α , β et γ -CD diffèrent de point de vue structural et dimensionnel elles sont représentées dans le tableau suivant [43 ; 44].

Tableau III.1. Propriétés structurales des cyclodextrines natives.

Propriétés	α -CD	β -CD	γ -CD
Nombre d'unité de glucose	6	7	8
Formule brute	C ₃₆ H ₆₀ O 30	C ₄₂ H ₇₂ O 35	C ₄₈ H ₈₀ O 40
Masse moléculaire (g/mole)	972	1135	1297
Diamètre interne de la cavité (Å)	4.7-5.3	6.0-6.6	7.5-8.4
Diamètre externe de la cavité (Å)	14.6±0.4	15.4±0.4	17.5±0.4
Longueur de la cavité (Å)	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1
Volume de la cavité (Å ³)	174	262	472
[α] D à 25°C	150,5±0.5	162,5±0.5	177,4±0.5
Carbones asymétriques	30	35	40

**Figure III.3.** Structure générale des cyclodextrines (n=nombre d'unité de glucose : n= 6, 7 et 8 pour α -, β - et γ -CD).

III.5. Cyclodextrines Modifiées

Les cyclodextrines à l'état naturel, sont d'intérêt relatif en raison de leur forte polarité, et leur faible solubilité dans les solvants organiques. La modification est réalisée avec différents types de substituants des groupements hydroxyles aux deux, trois et six positions sont à l'origine de nombreuses nouvelles applications.

La β -cd est la plus utilisée parmi les CD, elle complexe le plus grand nombre de composés grâce à la taille de sa cavité et son coût réduit. Mais à cause de sa faible solubilité dans l'eau elle a subi des réactions d'alkylation, d'acétylation et d'éthérification pour développer des dérivés à des caractères physico-chimiques améliorés.

Les dérivés les plus importantes à haute solubilité dans l'eau sont :

- Les β -CDs méthylées.
- Les β - et γ -CDs hydroxypropylées (HP).
- Les β -CDs sulfobutylées.
- Les CDs branchées.
- Les CDs sulfatées.

Parmi les objectifs fixés pendant ces modifications on peut citer :

- Augmenter la solubilité des CD essentiellement la β -CD.
- Améliorer la capacité à complexer.
- Fixer un groupe spécifique.
- Former des polymères de CD.
- Augmenter leur affinité pour une molécule particulière.
- Diminuer les dégâts aux membranes cellulaires [45; 40 ; 46 ; 47].

III.6. Caractéristiques physicochimiques des cyclodextrines

Les cyclodextrines native sont biocompatibles biodégradables homogènes non toxiques leur caractère sont présentés dans le tableau ci-dessous [44 ; 46 ; 47].

Tableau III.2. Propriétés physicochimiques de quelque cyclodextrine native.

Propriétés	α -CD	β -CD	γ -CD
pKa, 25°C	12.3	12.2	12.1
$\Delta H^\circ(\text{Ionisation})$ (kcal/mol)	8.36	9.98	11.22
$\Delta S^\circ(\text{Ionisation})$ (cal/mol.K)	-28.3	-22.4	-17.6
$\Delta H^\circ(\text{solution})$ (kcal/mol/)	7.67	8.31	7.73
$\Delta S^\circ(\text{solution})$ (cal/mol.K)	13.8	11.7	14.7
Solubilité aqueuse g/ L à 25°C	145	18.5	232
Solubilité (eau, 25°C), mol/l	0.1211	0.0163	0.168
Nombre de molécules d'eau dans la cavité	6-8	11-12	13-17
Température de fusion (°C)	275	280	275

III.6.1. Solubilité

Les CDs ont joué un rôle très important dans la formulation de médicament à faible hydrosolubilité en améliorant la solubilité apparente du médicament et/ou sa dissolution par un complexe d'inclusion.

La faible solubilité de la β -CD par rapport à α -CD et γ -CD, semble être dû à un réseau de liaisons hydrogène particulièrement fort dans le cas de la CD à 7 unités. Dans le cas de α -CD, cette bande de liaisons H est incomplète, une des unités est en position déformée, donc il ne reste que 4 liaisons formées (au lieu des 6 attendus), ce qui est favorable, et lie les liaisons hydrogènes au solvant et augmente sa solubilité dans l'eau. Toutes les CDs sont solubles dans l'eau augmentée de la direction β -CD < α -CD < γ -CD [40 ; 48].

III.6.2. Stabilité

Les CDs peuvent améliorer la stabilité de plusieurs médicaments labiles contre la déshydratation, l'hydrolyse, l'oxydation et la photodécomposition. Et augmenter ainsi la durée de conservation des médicaments. L'augmentation de stabilité est par la formation de liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles C-2 et C-3 des unités de glucose adjacentes [49].

III.6.3. Caractère amphiphile

La cavité centrale de la cyclodextrine est composée de glucose ce qu'il la rend hydrophobe alors que la partie externe est hydrophile en raison de la présence de 21 groupes hydroxyle. Ce qui explique sa capacité à piéger ou encapsuler des substances lipophiles [40].

III.6.4. Caractère basique

Les cyclodextrines sont basiques grâce à la densité électronique élevée qui est causée par les paires d'électrons libres non liants portées par les atomes d'oxygène glucidique qui sont dirigés vers l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine [50].

III.6.5. Énantiosélectivité

La chiralité des CDs causé par leurs unités de glucopyranose D. Chaque unité de glucose contient 5 centres chiraux. La combinaison du pouvoir complexant et de ces centres chiraux permet d'obtenir une énantiosélectivité [48].

III.7. Toxicité

Les cyclodextrines ne sont pas toxiques, elles ont un grand impact sur la sécurité des médicaments par exemple :

- Les CD ont été utilisés pour réduire l'irritation liée aux médicaments.
- Les toxicités liées à la cristallisation des médicaments peu hydrosolubles dans les préparations parentérales peuvent souvent être réduites par la formation de complexes solubles (PA-CD).
- L'augmentation de l'efficacité d'effet thérapeutique et de la puissance des médicaments à des doses plus faibles, peut réduire la toxicité.
- Le piégeage des médicaments par les CD au niveau moléculaire empêche leur contact direct avec les membranes biologiques et réduit ainsi leurs effets secondaires en diminuant les risques de contaminations [49].

III.8. Complexe d'inclusion

Les cyclodextrines ont une capacité d'inclure dans sa cavité hydrophobe une large variété de composés solide, gaz, liquide (invite), afin de former un complexe d'inclusion appelé hôte-invité. La cavité de cyclodextrine doit avoir une taille et une forme moléculaire appropriée, et être relativement non polaire pour former des complexes stables en vue d'éviter la volatilisation, l'oxydation, la dégradation due à la présentation de la chaleur et la lumière.

Elle a aussi un effet sur l'évaluation de la solubilité, la réduction ou l'élimination totale des goûts et des odeurs indésirables, la séparation et l'isolement de divers produits chimiques dans le but de prévenir des réactions chimiques, et la réduction des coûts de production (figure III.4) [51 ; 52].

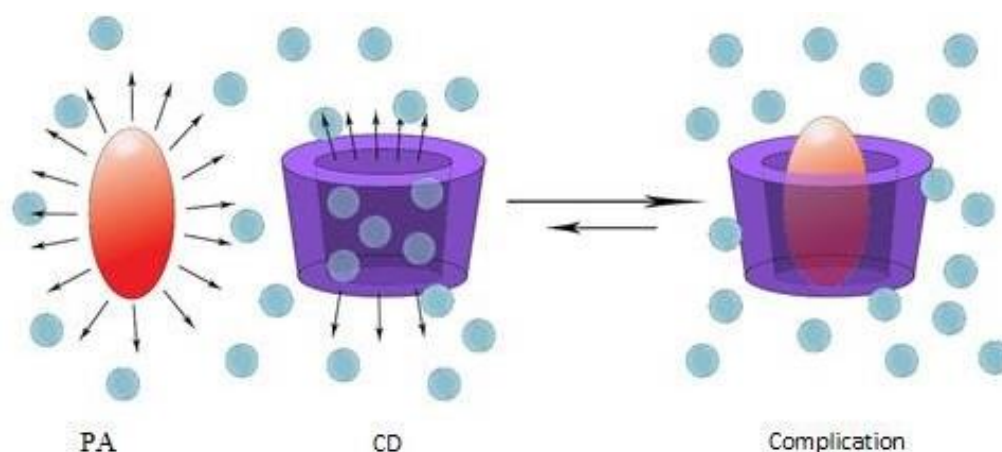


Figure III.4. Formation de complexe d'inclusion.

III.8.1. Préparation de complexe d'inclusion

Le choix de la méthode de préparation de complexe d'inclusion dépend de deux facteurs : l'échelle de la production et l'objectif.

III.8.1.1. Coévaporation

Cette méthode consiste à mélanger tous les réactifs, (la molécule invitée (PA), CD et l'eau), en quantité équimolaire pendant quelques heures. Le solvant va être éliminé par évaporation sous vide par un évaporateur rotatif à une température compatible avec la stabilité des produits.

III.8.1.2. Traitement par micro-ondes

Le traitement par micro-ondes appliqué à la préparation des complexes permet de réduire le temps de préparation et d'obtenir plus rapidement des températures élevées à l'intérieur des produits irradiés, introduit dans la micro-onde le mélange de molécules invitée CD avec une quantité minimale de solvant. Les produits obtenus par cette technique présentent un état solide pratiquement inchangé et ils sont très stables dans les conditions ambiantes. Cette technique est plus efficace en ce qui concerne la solubilité [53].

III.8.2. Méthode de caractérisation des complexes d'inclusions

Les complexes d'inclusion sont caractérisés par différentes techniques d'analyses thermiques et spectroscopiques telles que :

- Calorimétrie différentielle à balayage.
- L'analyse thermogravimétrique.
- Infra-rouge a transformé de Fourier.
- La résonance magnétique nucléaire.
- Spectroscopie UV-visible.
- La chromatographie liquide à haute performance HPLC [54].

III.8.3. Mécanisme de formation de complexe

Les cyclodextrines peuvent encapsuler ou piéger des substances dans leur cavité par rapport à la taille particulière des molécules invitées et molécules hôtes. Une molécule invitée peut être inclus dans une ou deux cyclodextrines, formant un complexe hôte invité 1 :1 ou 2 : 1, deux ou plus molécules invitées peuvent interagir avec une cyclodextrine ou deux pour forme le complexe hôte- invité 1 :2 ou 2 :2 comme le montre la figure III.5 [40].

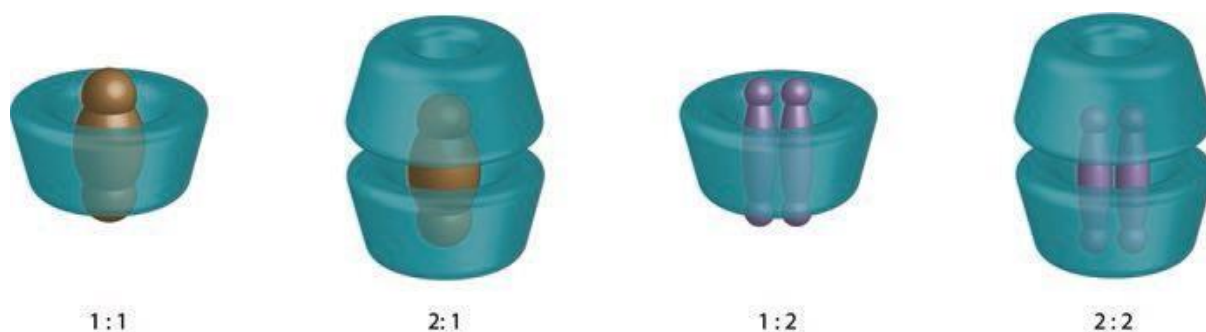


Figure III.5. Stoechiométrie des complexes.

III.9. Domaine d'application

Les CDs sont pratiques dans plusieurs domaines scientifiques tels que l'agroalimentaire, pharmaceutique, agriculture, la chimie, biomédicale, hygiène, et le textile, ainsi dans la protection de l'environnement grâce à leur capacité de former des complexes d'inclusions (voir le tableau ci-dessous) [55 ; 56 ; 57]

Tableaux III.3. Les propriétés améliorées dans les domaines industriels après utilisation des cyclodextrines.

Domaines industrielles	Propriétés
Environnement	<ul style="list-style-type: none"> - Élimine et détruit les microorganismes. - Déplace les polluant du sol, de l'eau et d'atmosphère. - Traitement des eaux usées.
Agroalimentaire	<ul style="list-style-type: none"> - Masque et supprime les odeurs indésirables. - Protéger les arômes naturels et artificiels. - Elimine le gout amer.
Agrochimie	<ul style="list-style-type: none"> - Améliore le temps d'action pour les pesticides. - Diminuer la toxicité.
Chimie	<ul style="list-style-type: none"> - Synthèse organique. - Catalyse. - Chimie supramoléculaire.
Cosmétologie	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilisation des parfums. - Protection contre les UV (crème).
Pharmaceutique	<ul style="list-style-type: none"> - Améliore de la biodisponibilité. - Augmentation de la solubilité. - Stabilisation des médicaments. - Protection des PA. - Contrôle la libération. - Masque les odeurs et les goûts indésirables.
Textile	<ul style="list-style-type: none"> - Elimination des odeurs indésirables. - Renforce la prise des couleurs par le tissu. - Réduire la quantité de colorant perdu lors du lavage.

III.10. Conclusion

Ce chapitre contient les différents potentiels découverts sur les cyclodextrines, telle que leur capacité de former des complexes d'inclusions et leur caractère physicochimique, qui sont utilisés dans nombreux domaines d'administration des médicaments et dans plusieurs industries.

Chapitre IV : les plans d'expériences

IV.1. Introduction

Les produits ou les procédés de fabrication sont améliorés par la plupart des ingénieurs et techniciens en fonction de leur expérience.

Malheureusement, les stratégies couramment utilisées pour effectuer ces expériences sont souvent coûteuses et inefficaces, ce qui rend de nombreuses expériences difficiles à gérer. Pour toutes ces raisons, de nombreux secteurs industriels ont recours à la planification des expériences [58].

Le plan d'expérience est un outil indispensable pour l'expérimentateur. Les plans d'expériences permettent de mieux organiser les essais qui accompagnent la recherche scientifique ou la recherche industrielle. Ils s'appliquent dans de nombreuses disciplines et dans tous les secteurs puisque nous recherchons la relation qui existe entre la grandeur d'intérêt « y » et les variables « xi ».

Il existe de nombreux plans d'expériences adaptés à l'ensemble des cas rencontrés par l'expérimentateur [59].

IV.2. Définition

La définition des plans d'expériences, numériques ou non, repose sur les 04 étapes suivantes :

1. la définition du système.
2. le choix des réponses d'intérêt.
3. Sélection et détermination des facteurs du plan d'expériences.
4. le procédé de planification des expériences [60].

Le plan d'expérience est une branche des statistiques appliquées qui est basée sur l'utilisation des méthodes scientifiques pour concevoir, mener, analyser et interpréter les données d'essais ou d'expériences contrôlées afin d'arriver à des conclusions fiables de manière efficace et économique. Ils permettent de contrôler un problème avec différents paramètres tout en suivant un programme fixe avec plusieurs essais à effectuer [61].

IV. 3. L'intérêt

Le plan d'expérience sert à montrer et à quantifier l'effet des paramètres considérés. Il contribue à la conception du produit, tel qu'à la résolution des problèmes complexes d'optimisation

lors du développement et de la production [62]. Leur principal intérêt est d'optimiser le nombre d'expériences à exécuter dans la phase d'essais [63].

IV.4. Principe

Cette procédure consiste à mettre en place un plan expérimental qui comprend le nombre minimum d'expériences, en tenant compte des résultats souhaités tout en apportant le maximum de précision dans les résultats. Son principe consiste à faire varier simultanément les niveaux d'un ou plusieurs facteurs à chaque essai [64].

IV.5. La démarche de planification expérimentale

Ces plans d'expériences contiennent un vocabulaire et une terminologie qui est obligatoire de définir :

IV.5.1. Les facteurs

Les facteurs sont les grandeurs supposées agir sur les variations des réponses. Ils peuvent être : quantitatifs ou qualitatifs, contrôlables ou non contrôlables et continus ou discontinus.

IV.5.2. Les réponses

Elles représentent les grandeurs mesurées ou les grandeurs de sortie Sachant qu'à chaque point du domaine d'étude correspond à une réponse.

Les facteurs et les réponses sont les seules variables impliquées dans la rédaction du plan d'expérience. C'est un outil qui permet d'établir des relations mathématiques entre Les réponses et les facteurs [65].

IV.5.3. Domaine expérimental

C'est la valeur qui prend le facteur au cours des essais. Le domaine est délimité par les niveaux supérieurs et inférieurs de chaque facteur. Pour les facteurs quantitatifs, la valeur est algébrique et donc ordonnée numériquement. Par contre les valeurs de facteurs qualitatifs ne sont pas mesurables, donc quel que soit leur classement l'important est de définir une borne inférieure et une borne supérieure (+1 et -1) [64].

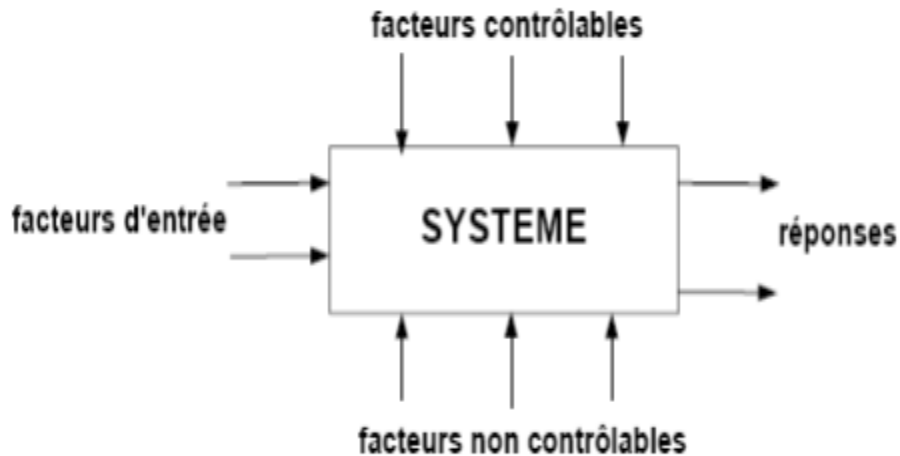


Figure IV.1. Entrées et sorties d'une expérience

IV.6. Méthodologie des plans d'expériences

- Les étapes d'une étude par les plans d'expériences sont rappelées dans la figure IV.2.

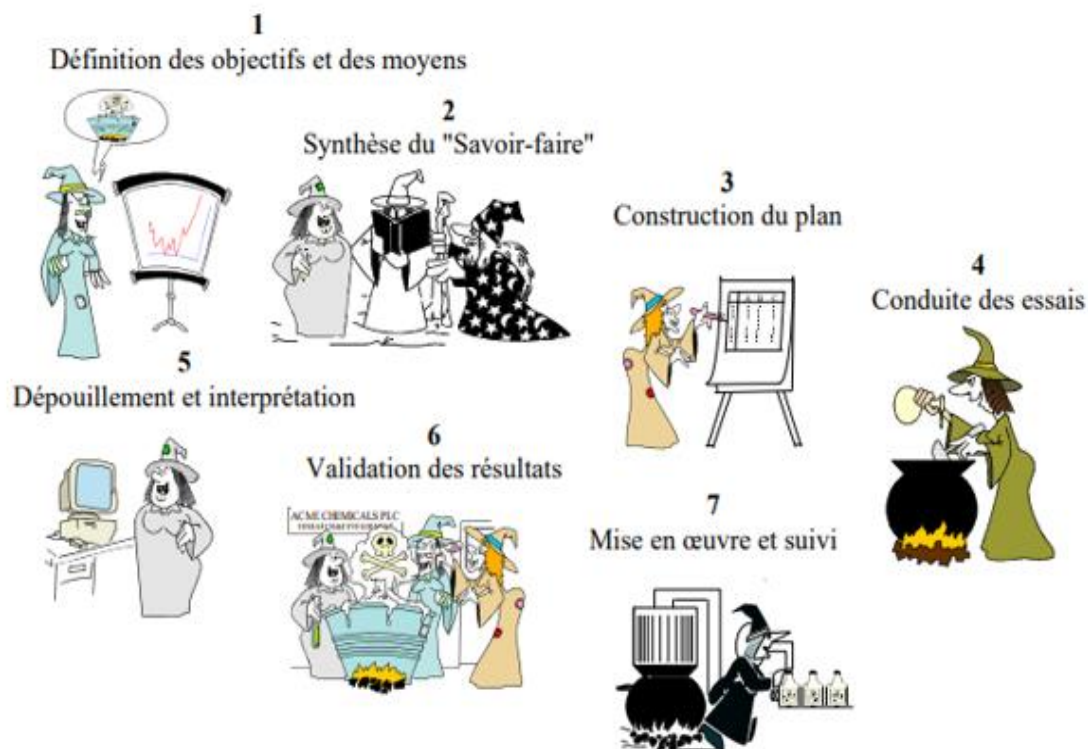


Figure IV.2. Démarche de mise en œuvre des plans d'expériences.

Pour la conception d'un plan d'expériences, nous effectuons généralement les trois étapes suivantes :

IV.6.1. Recherche des facteurs d'influence :

Cette étape consiste à répondre à une série de questions sur l'influence des facteurs :

Parmi tous les facteurs pouvant influencer la réponse, lesquels ont une influence significative ?
y a-t-il des interactions entre ces facteurs ?

IV.6.2. Modélisation

Dans cette phase on cherche la forme d'influence qui est définie dans la 1^{re} étape : linéaire, courbe... et l'équation mathématique qui règle avec une certaine précision la variabilité du phénomène en fonction des facteurs influents. La modélisation d'une réponse se fait en sélectionnant des points expérimentaux dont le nombre est au moins égal à la somme des effets, des interactions et des effets au carrée.

IV.6.3. Optimisation

Après avoir établi la forme graphique et analytique de notre réponse, il est important de trouver les conditions expérimentales qui donnent le meilleur résultat. Cette étape nécessite une connaissance préalable du phénomène étudié [66].

IV.6.3.1. Eléments d'optimisation

Pour bien mener une optimisation, plusieurs éléments sont indispensables et conditionnent la solution trouvée [67].

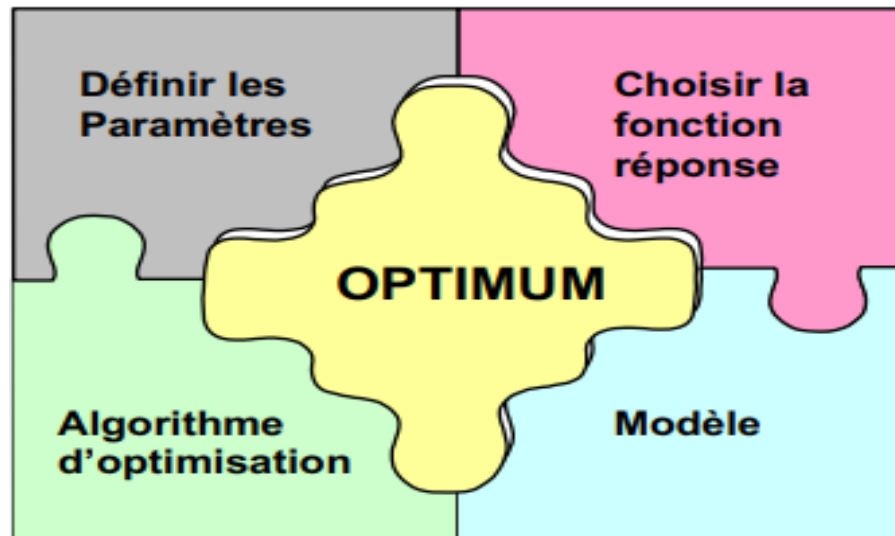


Figure IV.3. Eléments indispensables à toute optimisation

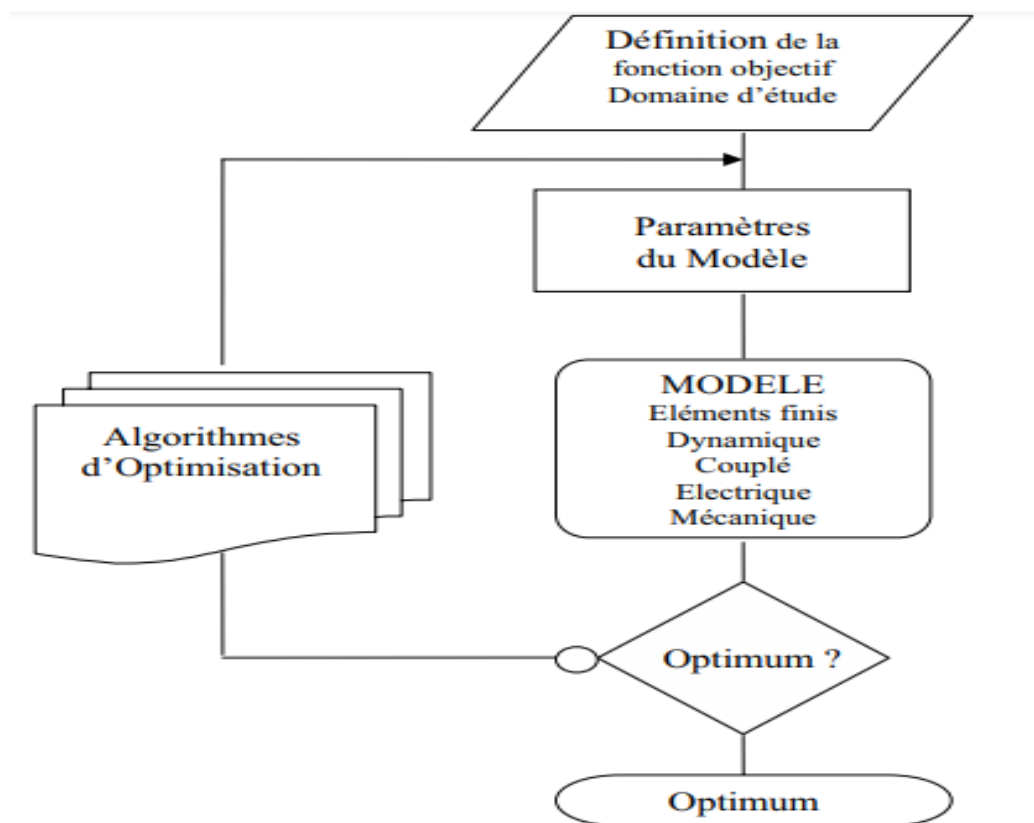


Figure IV.4. Déroulement d'une optimisation

IV.7. Types des plans d'expérience

Il existe plusieurs types de plans d'expériences :

IV.7.1. Plan factoriel

Ce sont les plus utilisés parce qu'ils sont plus simples et plus rapides à mettre en œuvre. Ces plans sont limités à deux niveaux pour chaque facteur.

Une expérience est dite factorielle lorsque chaque niveau de facteur est lié à chaque niveau des autres facteurs [68]. On distingue :

- Le plan factoriel complet
- Le plan factoriel fractionnaire

IV.7.2. Plan composite centré

Si le modèle linéaire n'est pas satisfaisant parce que la réponse est quadratique ou cubique et non linéaire, un plan composite centré peut être utilisé pour compléter le plan factoriel.

Un plan composite centré est défini par :

- Un plan factoriel complet de $2k$.
- Nombre de répétitions au centre du domaine expérimental dédiées à l'analyse statistique.
- Deux points en étoiles par paramètres et positionnés sur les axes de chacun de ceux-ci à une distance α du centre du domaine [68].

IV.7.3. Plan de mélange

Les plans de mélanges sont des plans utilisés pour étudier des produits composés de plusieurs constituants, dont la somme ne peut pas dépasser 1 ou 100%, la somme est donc considérée comme constante.

Dans notre travail, nous avons choisi d'utiliser un plan de D-optimal.

IV.8. Définition du plan D-optimal :

Les contraintes expérimentales ne permettent pas toujours d'être dans les conditions idéales des plans d'expériences, dans ce cas, il est obligé d'utiliser les plans D-optimaux.

Le choix de l'emplacement des points expérimentaux nécessite donc un logiciel de plan d'expérience. Il suffit d'indiquer le nombre d'expériences réalisées et le modèle a priori. Le logiciel calcul alors, grâce à un algorithme d'échange, le plan le plus adapté à l'étude, capable de résister à des contraintes imprévues [69].

IV.9. Avantages des plans d'expériences

- Réduction du nombre d'essais.
- Capacité d'étudier un très grand nombre de facteurs.
- Identifier les interactions possibles entre les différents facteurs.
- Modélisation très simple des résultats.
- Obtenir les résultats avec une bonne précision [58].

IV.10. Conclusion

Les plans d'expériences sont utilisés pour étudier et optimiser des procédés. Selon le type choisi, ils mesurent les effets linéaires et les interactions des variables contrôlées liées aux facteurs sur les variables de réponses optimisées [69].

Chapitre V : les niosomes

V.1. Introduction

Depuis de nombreuses années, le traitement d'une maladie grave ou d'une maladie chronique se fait en administrant des médicaments aux patients par le biais de diverses formes pharmaceutiques telles que les comprimés, les gélules, les crèmes, les pommades, les injectables et les suppositoires cependant de nouvelles formes pharmaceutiques ont été développées et mises sur le marché : niosomes, liposomes, nanoparticules, microsphères, microémulsions et microcapsules magnétiques.

Les niosomes sont l'un des meilleurs de ces vecteurs. Sur le plan structurel, les niosomes sont similaires aux liposomes et ont le même potentiel d'administration de médicaments, mais leur grande stabilité chimique, flexibilité de la membrane et leur économie les rendent supérieurs aux liposomes [70].

V.2. Définition

Les niosomes sont des vésicules colloïdales obtenus par hydratation de tensioactifs non ioniques synthétiques, avec ou sans incorporation de cholestérol ou de leurs lipides. Ce sont des systèmes vésiculaires similaires aux liposomes en termes de structure et méthodes de préparation qui peuvent être utilisées comme nouveau système d'administration de médicaments amphiphiles, hydrophile et lipophiles. Ils peuvent également être utilisés pour la délivrance ciblée de médicaments.

Les niosomes sont des vecteurs stables, biodégradables, biocompatibles, non immunogènes, non cancérogènes et présentent une certaine souplesse dans leur caractérisation structurelle [71].

V.3. Structure

Les niosomes sont sphériques et consistent en structures lamellaires microscopiques (unilamellaires ou multilamellaires). Les niosomes forment une bicouche amphiphilique qui a tendance de s'orienter d'une manière que la région polaire est orientée à l'extérieur et à l'intérieur des vésicules (vers la phase aqueuse) où le médicament hydrophile sera piégé et non polaire région est formée dans le biliaire où le médicament hydrophobe peut être piégé [72].

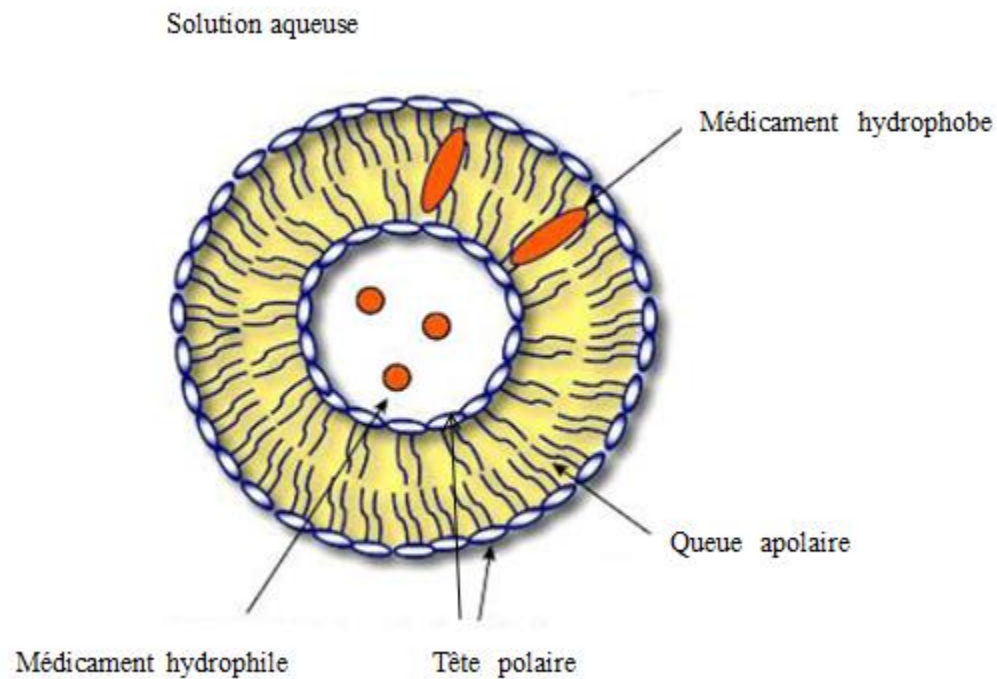


Figure V.1. Structure de niosome.

V.4. Composition chimique

V.4.1. Surfactant

Les surfactants également appelé agent de surface ou tensioactifs sont des molécules amphiphiles, composés d'une queue lipophile et une tête hydrophile, capable de modifier la tension superficielle entre deux surfaces.

Ils sont classés en fonction des charges de leurs groupes de tête hydrophiles, à savoir cationiques, anioniques, amphotères et non ioniques [73].

Les surfactants non ioniques sont privilégiés car ces composés n'ont pas de tête polaire chargée et ils sont par conséquent moins toxiques, moins irritants pour la surface cellulaire, moins hémolytiques et plus biocompatibles à un pH physiologique que les autres types d'agents

de surface. À constater que les surfactants hydrophiles augmentaient l'absorption percutanée, tandis que les surfactants moins hydrophiles augmentaient l'absorption par la peau.

L'équilibre hydrophile-lipophile (HLB) de tensioactif non ionique est un bon indicateur de la capacité d'un surfactant à former des vésicules.

Les types de tensioactifs non ioniques suivants sont principalement utilisés pour la formation des niosomes [74].

V.4.2. Cholestérol

Le cholestérol est le lipide le plus fréquemment utilisé pour améliorer la résistance mécanique et la rigidité de la membrane niosomale, ainsi que pour réduire la perméabilité à l'eau. En interagissant avec les surfactants non ioniques, le cholestérol modifie la température de transition de phase gel/liquide du système et affecte la fluidité de la membrane.

La quantité de cholestérol à inclure dépend principalement des valeurs HLB des tensioactifs non ioniques et doit être optimisée au cours du processus de développement, car elle a un impact non seulement sur les propriétés ou l'agencement de la membrane (dans le cas d'agents tensioactifs dont la valeur $HLB > 10$), mais aussi sur les caractéristiques physicochimiques des vésicules [75].

V.4.3. Molécule de charge

Certains inducteurs de charge sont ajoutés dans la formulation niosomale qui joue un rôle primordial dans la stabilisation des membranes bicouches en créant des charges négatives ou positives sur la surface des niosomes, empêchant ainsi l'agrégation par répulsion électrostatique, leur utilisation conduira également à un taux d'encapsulation plus élevée du médicament. Ainsi les interactions entre les charges peuvent avoir une influence sur la taille des niosomes.

L'ajout de la molécule de charge également requise dans une concentration optimale, sinon la formation du niosome n'aura pas lieu. La concentration nécessaire à la préparation du niosome en pourcentage molaire de la molécule de charge est environ 2,5-5% [76].

V.4.4. Hydratation medium

Le milieu d'hydratation est un composant important nécessaire dans la formation des niosomes, car il a un impact direct sur la taille des particules. Dans la formulation des niosomes, le tampon phosphate est utilisé comme milieu d'hydratation avec différentes valeurs de PH. La solubilité du médicament encapsulé dépend du PH des milieux d'hydratations [77].

V.5. Type des niosomes

En fonction de la taille des vésicules, les niosomes peuvent être divisés en trois groupes. Il s'agit des petites vésicules unilamellaires (SUV, taille=0,025-0,05 μm), des vésicules multilamellaires (MLV, taille= \geq 0,05 μm) et des grandes vésicules unilamellaires (LUV, taille= \geq 0,10 μm) [78].

V.6. Méthode de préparation des niosomes

Les niosomes sont préparés par différentes méthodes en fonction de la taille des vésicules et de leur distribution, du nombre de doubles couches, de l'efficacité de piégeage, de la phase aqueuse et de la perméabilité de la membrane des vésicules [78].

Les niosomes peuvent être préparés de différentes manières comme suit :

1. Méthode d'injection d'éther (LUV) ;
2. Méthode d'agitation manuelle (MLV) ;
3. Technique d'évaporation en phase inverse (LUV) ;
4. Méthode des bulles ;
5. Sonication (SUV) ;
6. Micro fluidisation (SUV) ;
7. Formation de niosomes à partir de proniosomes ;
8. Méthode d'extrusion à membranes multiples.

V.7. Les facteurs influençant sur la préparation des niosomes

La préparation des niosomes et l'obtention de la structure souhaitée dépendent d'une connaissance suffisante et d'une compréhension approfondie des propriétés physicochimiques de leurs composants. Plusieurs facteurs interviennent dans la formulation des niosomes. Ces facteurs peuvent dépendre de la méthode de préparation, de la voie d'administration et de la consommation des matériaux.

V.7.1. Type de surfactant

Le type de surfactants influence l'efficacité d'encapsulation, la toxicité, la stabilité et la taille des niosomes. Les surfactants utilisés sont des tensioactifs non ioniques tel que : les esters d'acide gras de sorbitane (Spans) et les esters d'acide gras de polyoxyéthylène sorbitane (Tweens).

V.7.2. Structure géométrique de surfactant

La géométrie des vésicules formées à partir d'agents de surface est influencée par leur structure, qui est liée à des paramètres d'empaquetage critiques CPP. Les caractéristiques géométriques constituent un facteur important pour déterminer le type d'association formé en milieu aqueux.

Les paramètres critiques d'empaquetage peuvent être définis à l'aide de l'équation suivante :

- $CPP = v / (l_c \cdot a_0)$
- $CPP \leq 0,5$ formation des micelles
- $(1/3 \leq CPP \leq 0,5)$ formation des cylindriques micelles
- $0,5 \leq CPP \leq 1$ bicouche
- $CPP \geq 1,0$ formation des micelles inversées.

Où v = volume du groupe hydrophobe, l_c = longueur critique du groupe hydrophobe, a_0 = surface du groupe de tête hydrophile.

V.7.3. Equilibre hydrophile-lipophile (HLB)

L'équilibre hydrophile-lipophile (HLB) est un bon indicateur de la capacité d'un surfactant à former des vésicules.

HLB est une expression empirique pour la relation entre les groupes hydrophiles et hydrophobes des agents de surface. Les agents de surface ayant une valeur HLB élevée sont plus solubles dans l'eau que les agents de surface ayant une valeur HLB plus faible.

La valeur HLB affecte la taille des niosomes ainsi que le taux d'encapsulation de principe actif.

$$HLB = \left[\frac{(HLB_A - HLB_B) * R_A}{(R_A + R_B)} \right] + HLB_B$$

D'où HLB_A , HLB_B , R_A et R_B désignent respectivement la valeur HLB du surfactant, et le rapport du surfactant.

V.7.4. Température de transition gel-liquide (T_c)

La température de transition gel-liquide (T_c) des tensioactifs est un facteur essentiel qui influence la formation des niosomes.

Elle affecte le taux d'encapsulation, la fluidité de la membrane, la perméabilité de la membrane et la stabilité. La T_c et la longueur de la chaîne alkyle des agents de surface non ioniques sont corrélées l'une à l'autre.

Les chaînes alkyles plus courtes ont un T_c plus faible, ce qui conduit à la formation de niosomes "fuyants".

Les agents de surface ayant un T_c plus élevé sont plus susceptibles d'être sous forme de gel ordonné, ce qui réduit les fuites de la bicouche par rapport aux agents de surface ayant un T_c plus élevé par rapport aux agents de surface dont la température de transition de phase est plus basse.

La T_c dépend du degré de la chaîne alkyle insaturée. L'absence de saturation de la chaîne alkyle rabaisse la T_c et augmente la fluidité de la chaîne et la perméabilité de la membrane. Des études ont montré que les niosomes formés par des surfactants ayant un T_c plus faible sont plus flexibles que ceux formés avec un T_c plus élevé.

V.7.5. La nature de médicament

La nature du médicament encapsulé joue un rôle important dans le piégeage du médicament dans les niosomes, Le piégeage du médicament est affecté par de multiples facteurs, tels que l'interaction entre le médicament et la membrane du niosome, la structure chimique, le poids moléculaire, l'hydrophilie et la lipophilie du médicament.

V.7.6. Cholestérol

Le cholestérol influence les propriétés physiques et la structure des niosomes de la même manière qu'il affecte les propriétés physiques des membranes biologiques. L'effet du cholestérol dans les bicouches lipidiques est principalement lié à la cohésion et à la résistance mécanique de la membrane, ainsi qu'à la perméabilité à l'eau. Le cholestérol peut influencer les propriétés des niosomes sur les aspects suivants :

- Influence la rigidité et réduira la perméabilité des membranes ;
- Diminue la fluidité de la membrane ce qui renforce la stabilité ;
- Diminue le taux de libération du médicament ;
- Améliorer l'encapsulation des médicaments hydrophiles ;
- Améliorer la stabilité des niosomes en augmentant la température de transition.

La quantité de cholestérol nécessaire dans une formulation particulière dépend de la valeur HLB d'agent de surface [79,80,81,82,83,84].

V.8. Les méthodes de caractérisation des niosomes

La caractérisation des niosomes est étudiée pour déterminer la qualité des niosomes dans le développement des formulations et leurs applications dans de futures études cliniques. Ces paramètres ont un impact direct sur la stabilité et les performances in vivo [71].

Ils sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau V.1. Les paramètres d'évaluation des niosomes

Les paramètres d'évaluation	Méthode
-----------------------------	---------

La morphologie	SEM, TEM
La distribution de la taille	Diffusion dynamique de la lumière particulaire
L'indice de polydispersité	Analyseur de taille
La viscosité	Viscosimètre d'Ostwald
L'épaisseur de la membrane	Analyse par diffusion des rayons X
L'efficacité du piégeage	Centrifugation, dialyse, chromatographie sur gel
L'étude de libération in vitro	Membrane de dialyse

V.9. Stabilité des niosomes

Les vésicules sont stabilisées par la formation de (04) forces différentes [85] :

- Les forces de van der Waals entre les molécules des surfactants ;
- Les forces répulsives résultantes des interactions électrostatiques entre les groupes chargés des molécules des surfactants ;
- Les forces de répulsion entropiques des groupes de tête des agents de surface ;
- Les forces de répulsion à courte durée d'action.

Les facteurs qui affectent la stabilité des niosomes sont les suivants :

- Le type de surfactant ;
- La nature du médicament encapsulé ;
- La température de stockage ;
- Détergents ;
- L'utilisation de lipides membranaires ;
- La polymérisation interfaciale de monomères tensioactifs in situ ;
- L'inclusion d'une molécule chargée.

V.10. Toxicité des niosomes

Malheureusement, il n'y a pas eu assez de recherches pour étudier la toxicité des niosomes. L'effet du type de surfactant sur la toxicité a été étudiée. Il a été déterminé que les agents de surface de type ester sont moins toxiques que les agents de surface de type éther. Cela peut être dû à la dégradation enzymatique des liaisons ester.

En général, la forme physique des niosomes n'a pas d'influence sur leur toxicité, comme le montre une étude comparant les formulations préparées sous forme de cristaux liquides et de gels. Dans certains cas, l'encapsulation du médicament par des niosomes réduit la toxicité [80].

V.11. Les avantages des niosomes

Les niosomes présentent plusieurs avantages. Les principaux avantages des niosomes sont les suivants [74] :

- Les niosomes sont des véhicules à base d'eau, ce qui leur permet d'être mieux tolérés par les patients que les véhicules à base d'huile ;
- Ils augmentent la stabilité du médicament piégé et les rendent stables ;
- Ils favorisent la pénétration des médicaments dans la peau et améliorent également la biodisponibilité des médicaments mal absorbés ;
- Ils ont une durée de conservation et une stabilité chimique plus longues que les liposomes.
- Ils ne portent pas de charge de surface. Ils sont donc moins toxiques et plus compatibles ;
- Ils peuvent contenir des médicaments hydrophiles et lipophiles ;
- Ils sont utilisés pour l'administration soutenue et contrôlée de médicaments.
- L'utilisation topique des niosomes chargés de médicaments permettrait d'améliorer la disponibilité cutanée et donc réduire la dose nécessaire pour déterminer l'effet thérapeutique et la dose dépendante ;
- Les niosomes améliorent la performance thérapeutique des molécules médicamenteuses encapsulées en les protégeant des environnements biologiques, ce qui retarde leur libération.

V.12. Les inconvénients des niosomes

- Dans la formulation du niosome, il arrive que des charges différentes soient présentées à la surface des vésicules du niosome, ce qui a pour effet de rapprocher les charges opposées et de provoquer la fusion des vésicules du niosome ;
- Souvent, le niosome présente une agrégation si la méthode standard de préparation n'est pas respectée ;
- L'hydrolyse du médicament emprisonné se produit parfois ;
- Dans certains cas, la charge en médicament est insuffisante ;
- Instable physicochimique [76] .

V.13. Application pharmaceutique des niosomes

Les niosomes sont utilisés pour le ciblage des médicaments, dans l'administration du médicament par voie transdermique, ophtalmique, pulmonaire ou cutanée pour action médicamenteuse localisée et une libération prolongée. Ils sont aussi utilisés en thérapie contre le cancer, dans l'étude de la réponse immunitaire et comme vecteurs d'hémoglobine [86].

V.14. Comparaison entre les niosomes et les liposomes

Les niosomes ressemblent aux liposomes dans la forme et le caractère amphiphile mais elles se diffèrent dans les autres caractères comme représenté dans le tableau suivant [84] :

Tableau V.2. Comparaison entre liposome et niosome

Liposome	Niosome
Phospholipides	Surfactants
Taille de 10 nm à 3000 nm	Taille de 10 nm à 200 nm
Requis des conditions spéciales de stockage	Non requis des conditions spéciales de stockage
Phospholipide instable	Surfactant plus stable
Plus toxique	Moins toxique
Coûteux	Peu coûteux
Absence de cholestérol	Présence de cholestérol
Les phospholipides peuvent avoir des charges neutres	Les agents de surface non ioniques ne sont pas chargés

V.14. Conclusion

Il a donc été conclu que les niosomes constituent un mode d'administration de médicaments très efficaces pour incorporer de nombreux types de médicaments.

Ils peuvent être utilisés pour encapsuler des agents anti-infectieux, des agents anticancéreux, des agents anti-inflammatoires et depuis peu de temps, comme adjuvants de vaccins. Les niosomes peuvent cibler certaines zones de l'organisme des mammifères et peuvent être exploités comme agents d'imagerie diagnostique. Les niosomes sont des systèmes supérieurs à d'autres vecteurs en termes de stabilité, de toxicité et de rentabilité [11].

Chapitre VI : Matériels et méthodes

VI.1. Optimisation d'un procédé d'encapsulation de la propolis par les liposomes

VI.1.1. Introduction

Ce chapitre aborde les étapes à suivre dans le but d'encapsuler la propolis en utilisant le liposome par optimisation des données avec les plans d'expériences.

L'extrait de propolis utilisée dans toutes les expériences est de la région de Melbou et récoltée en été.

VI.1.2. Préparation des suspensions propolis-liposome avec les conditions optimales

VI.1.2.1. Plans d'expériences

A l'aide d'un plan d'expérience Box-Behnken (logiciel MODDE 6.0) pour modéliser et optimiser un procédé d'encapsulation aux conditions optimales est réalisé.

Lors de la préparation des suspensions propolis-liposome, les quantités de matières premières ont été variés, la propolis [1.5 – 5 mg/ml], phospholipide [2.5 – 25 mg/ml] et cholestérol [1.5 – 5 mg/ml]. Les réponses du modèle sont la taille et le taux d'encapsulation.

La matrice d'expérience propose 15 essais à réaliser qui sont représenté dans le tableau V.1

Tableau VI.1. Matrice d'expérience

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	propolis	phospholipides	cholesterol	taux d'encapsulation	taille
1	1	N1	11	Incl	1,5	2,5	3,25		
2	2	N2	7	Incl	5	2,5	3,25		
3	3	N3	3	Incl	1,5	25	3,25		
4	4	N4	12	Incl	5	25	3,25		
5	5	N5	2	Incl	1,5	13,75	1,5		
6	6	N6	10	Incl	5	13,75	1,5		
7	7	N7	13	Incl	1,5	13,75	5		
8	8	N8	9	Incl	5	13,75	5		
9	9	N9	6	Incl	3,25	2,5	1,5		
10	10	N10	15	Incl	3,25	25	1,5		
11	11	N11	1	Incl	3,25	2,5	5		
12	12	N12	4	Incl	3,25	25	5		
13	13	N13	8	Incl	3,25	13,75	3,25		
14	14	N14	5	Incl	3,25	13,75	3,25		
15	15	N15	14	Incl	3,25	13,75	3,25		

VI.1.2.2. Matériels

- Béchers
- Pipette
- Eprouvette graduée
- Ballon
- Spatule
- Barreaux magnétiques
- Seringue
- Thermomètre

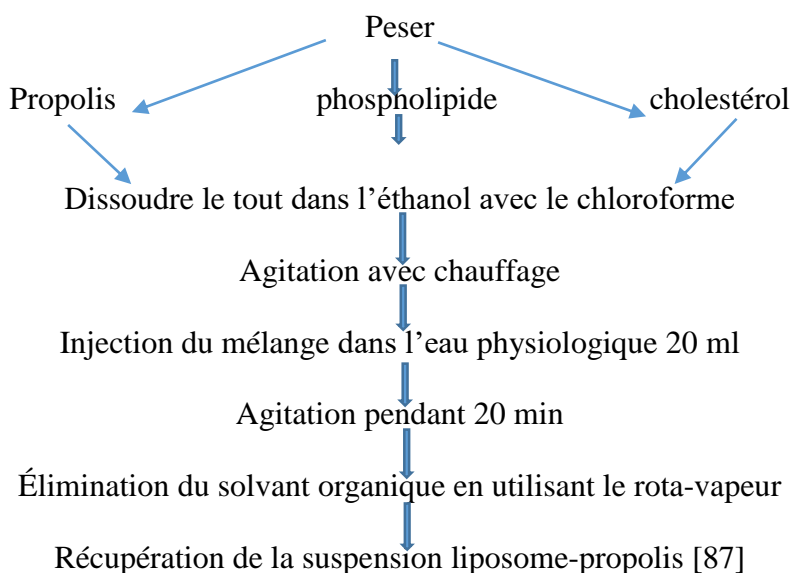
VI.1.2.3. Produits chimiques

- Extrait de propolis
- Phospholipide (L-alpha-phosphatidilcholine lécithine de soja P5638 (Sigma-Aldrich)
- Cholestrol (Roquette Frères)
- Ethanol (Biochem Chemopharma 96%)
- Sérum salé
- Chloroforme (Biochem Chemopharma 99,8%)

VI.1.2.4. Appareillages

- Balance analytique
- Plaque chauffante
- Plaque agitatrice
- Rota-vapeur.

VI.1.2.5. Méthode



VI.2. Optimisation d'un procédé d'encapsulation de la propolis par les niosomes

VI.2.1. Introduction

Cette partie résume les étapes de préparation de suspension propolis-niosome

VI.2.2. Préparation des suspensions propolis-niosome avec les conditions optimales

Dans cette étude, La méthode d'injection éthanolique a été utilisée pour préparer des niosomes vierge et des niosomes chargés de propolis (PLN).

D'abord un plan d'expérience a été réaliser mais on l'a pas utilisé à cause de modèle qui n'est pas valide. Alors des différentes formulations ont été préparés en faisant varier les concentrations de Span 60 /tween 80 et le cholestérol. La propolis a été fixé à 10 mg/ml.

Les six essais réaliser sont représentés dans le tableau V.2

Tableau VI.2. Formulations de préparation des niosomes

Formulation	Span 60	Tween 80	Cholestérol
1	20	/	0
2	30	/	10
3	/	20	0
4	/	30	10
5	10	10	0
6	15	15	10

VI.2.3. Matériels

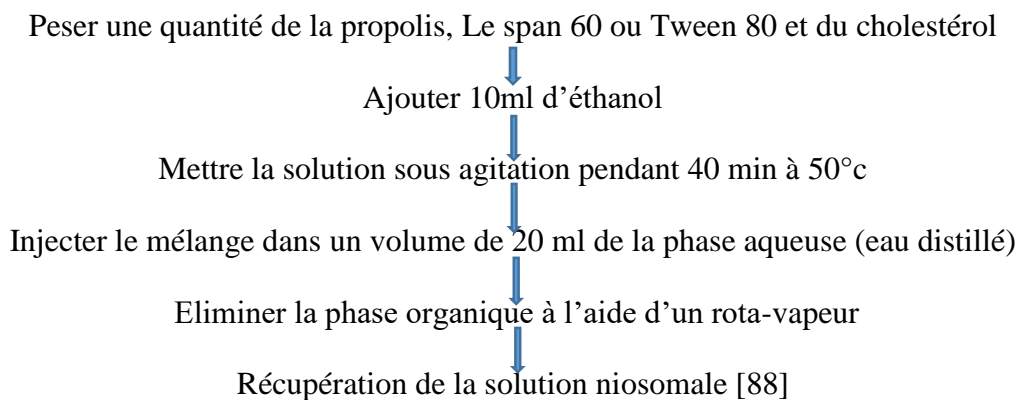
- Béchers
- Pipette
- Eprouvette graduée
- Ballon
- Spatule
- Barreaux magnétiques
- Seringue
- Thermomètre

VI.2.4. Produits chimiques

- Extrait de propolis
- Span 60
- Tween 80
- Cholestérol (Roquette Frères)
- Ethanol (Biochem Chemopharma 96%)
- Eau distillé

VI.2.5. Appareillages

- Balance analytique
- Plaque chauffante et agitatrice
- Rota vapeur

VI.2.6. Méthode

VI.3. Détermination de la taille des solutions niosomales

La distribution de la taille des niosomes dans les solutions préparées est effectuée à l'aide d'un granulométrie laser.

VI.3.1. Principe

La granulométrie laser est basée sur le principe de la diffraction et de la diffusion de la lumière d'un faisceau laser qui traverse un échantillon de particules dispersées. L'image de diffraction obtenue permet alors de déterminer, par calcul, la taille des particules qui ont traversé le faisceau incident. Le profil granulométrique obtenu correspond à une distribution de particules en volume.

VI.3.2. Appareillage

- Le granulomètre laser

VI.3.1.3. Produits chimiques

- Les solutions niosomales
- Eau distillé

VI.4. Détermination du taux d'encapsulation

Pour calculer le taux d'encapsulation deux méthodes sont utilisés l'HPLC et l'UV avec le dosage des flavonoïdes après avoir fait une centrifugation.

VI.4.1. La centrifugation de la solution niosomale optimale

La centrifugation consiste à séparer les composés d'une solution aux différentes densités en les exposant à une force centrifuge. Ce procédé de séparation des constituants d'un liquide permet d'isoler deux liquides, ou les particules solides d'un fluide.

VI.4.1.1. Matériels

- Eppendorfs
- Filtre seringues de 0.45 µm

VI.4.1.2. Appareillage

- Centrifugeuse (Hettich)

VI.4.1.3. Produits chimiques

- Solutions niosomale
- Méthanol

VI.4.1.4. Méthode

La centrifugeuse de la solution optimale a été lancée avec les paramètres suivants :

- Une agitation de 15000 tour /min.
- Un temps de 60 min.
- Une température de 4°C [89]

Après l'ultracentrifugation, une phase aqueuse transparente et un culot obtenu, Le surnageant a été séparé et remplacé par le méthanol, puis le culot a été agité pendant une longue durée ensuite la filtration a été réalisée avec des filtres seringues de 0,45 µm afin d'analyser par l'UV avec dosage des flavonoïdes (la quercétine est utilisée comme un standard de la courbe d'étalonnage) pour connaître la quantité de la propolis encapsulée.

VI.4.2. L'identification, la séparation et le dosage avec HPLC

La chromatographie en phase liquide permet la séparation ou la purification d'un ou plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et leur quantification

VI.4.2.1. Principe

Le principe de la HPLC est, comme pour les autres variantes de chromatographie, d'utiliser les différences de propriétés physico-chimiques de différents composés pour les séparer.

Un liquide constitue la phase mobile, qui va entraîner plus ou moins facilement les molécules du mélange. Une phase dite stationnaire va permettre de séparer les solutés en interagissant avec eux. Cette phase stationnaire est composée d'un support de porosité variable recouvert d'un gel spécifique choisi en fonction des molécules à séparer. Le support se trouve sous forme de micro-billes maintenues dans la colonne.

VI.4.2.2. Matériels

- Vials
- Béchers
- Seringues

VI.4.2.3. Produits chimiques

- Acide acétique
- Acétonitrile
- Formulations niosomales
- Eau distillée

VI.4.2.4. Conditions d'analyse

- Chromatographie en phase liquide (HPLC) (Ultimate 3000)
- **Colonne** : C-18 (150 x 4.6 mm, 5 μ m)
- **Phase mobile**: 0.5 % v/v acide acétique dans l'eau (phase A), and acetonitrile (phase B);
- **Débit** : 1 ml/min ;
- **Longueur d'onde** : 290 nm ;
- **Volume d'injection** : 20 μ l ;
- **Mode** : Gradient
- **Température** : 40°C [90]

VI.4.3. Analyse par spectroscopie UV-visible

Le spectromètre UV-visible permet d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'une courbe ou d'absorbance sur les ordonnées en fonction des longueurs d'ondes en abscisses.

VI.4.3.1. Principe

L'analyse spectrophotométrique est fondée sur l'étude du changement d'absorption de la lumière par un milieu, en fonction de la variation de la concentration d'un constituant. La

concentration d'une substance est déterminée en mesurant l'absorption relative de la lumière par rapport à celle d'une substance de concentration connue.

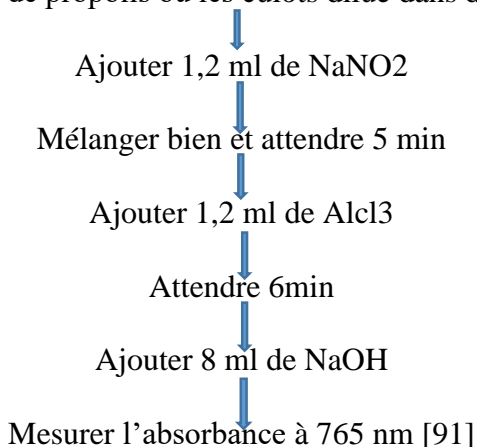
VI.4.3.2. Produits chimiques

- NaOH
- NaNO₂
- AlCl₃

VI.4.3.3. Méthode

Avec la méthode de chlorure d'aluminium préparer les solutions suivantes :

Prélever l'extrait de propolis ou les culots dilué dans du méthanol



VI.5. Préparation de l'optimum

Après la détermination de la taille et de taux d'encapsulation des six formulations on a choisis notre optimum qui est le F1.

VI.6. Caractérisation de l'optimum

VI.6.1. Analyse par spectroscopie infrarouge IR

VI.6.1.1. Principe

Spectroscopie infrarouge est une technique d'analyse rapide permettant d'identifier les fonctions chimiques des molécules organiques présentés dans les matériels analysés (solide,

liquide ou gaz). Cette méthode repose sur l'absorption par l'échantillon des radiations électromagnétiques.

VI.6.1.2. Produits chimiques

- L'extrait de propolis
- Niosome blanc (sans extrait)
- Optimum
- KBr (Bromure de potassium).

VI.6.1.3. Appareillages

- Spectroscopie infrarouge IR
- Balance analytique

VI.6.1.4. Méthode

Les échantillons sont séchés et broyés avec KBr (80% KBr, 20% l'échantillon), pressé sous forme de pastille, à une pression de 60 atm pendant 2 min puis faire l'analyser.

VI.6.2. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X permet d'analyser la structure cristalline des niosomes et d'obtenir des informations sur la taille des cristallites, la présence de phases cristallines spécifiques.

Le principe de la diffraction des rayons X (DRX) repose sur le phénomène de diffraction des rayons X par les atomes d'un échantillon cristallin. Lorsque les rayons X rencontrent un arrangement régulier d'atomes dans un cristal, ils interagissent avec les électrons des atomes et sont diffractés dans différentes directions.

VI.6.2.1. Méthode

Les diagrammes de diffraction des rayons X des échantillons (extrait de propolis, l'optimum, et le blanc) ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre EMPYREAN, avec un angle de 0° à 100° et un pas de 2θ .

VI.7. Test de motilité des spermatozoïdes (déterminations de VSL) après réfrigération**VI.7.1. Réfrigération du sperme****VI.7.1.1. Matériels**

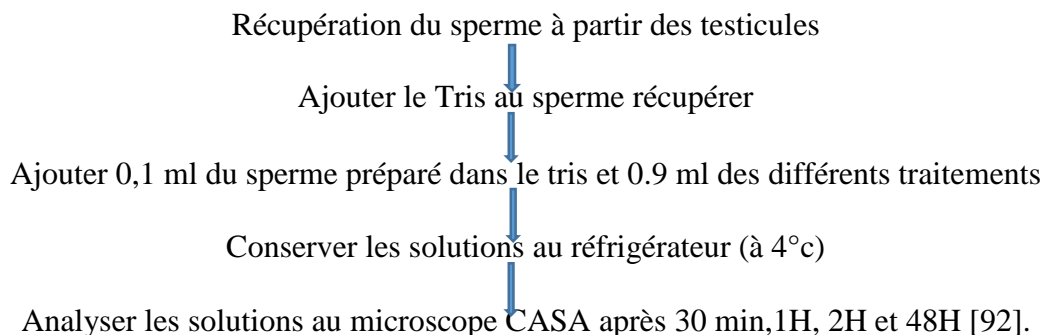
- Micro pipette ;
- Embouts (jaunes et bleus) ;
- Seringues ;
- Eppendorfs ;
- Béchers.

VI.7.1.2. Appareillages

- Réfrigérateur biologique ;
- Microscope CASA (MiK oneclipse E200).

VI.7.1.3. Produits chimiques

- Sperme
- Testicules (bélier).
- Tris
- L'extrait de propolis
- Niosome blanc
- Solution niosomale optimale
- Contrôle (Tris /sperme).

VI.7.1.4. Méthode

Chapitre VII : Résultat et discussions

VII.1. Détermination des réponses du plan expérimental

VII.1.1. Détermination de la taille des suspensions liposomes

Après avoir préparé les suspensions liposomales avec les conditions proposées par le plan d'expérience, nous avons déterminé la taille et le taux d'encapsulation des liposomes comme réponses.

VII.1.1.1. Résultats

Selon les conditions opératoires proposées par le plan d'expérience les réponses obtenues ne valident pas le modèle étudié (voir le tableau ci-dessous).

Tableau VII.1. Résultats expérimentaux de la matrice.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	propolis	phospholipides	cholesterol	taux d'encapsulation	taille
1	1	N1	11	Incl	▼	1,5	2,5	3,25	
2	2	N2	7	Incl	▼	5	2,5	3,25	
3	3	N3	3	Incl	▼	1,5	25	3,25	
4	4	N4	12	Incl	▼	5	25	3,25	
5	5	N5	2	Incl	▼	1,5	13,75	1,5	
6	6	N6	10	Incl	▼	5	13,75	1,5	
7	7	N7	13	Incl	▼	1,5	13,75	5	
8	8	N8	9	Incl	▼	5	13,75	5	
9	9	N9	6	Incl	▼	3,25	2,5	1,5	
10	10	N10	15	Incl	▼	3,25	25	1,5	
11	11	N11	1	Incl	▼	3,25	2,5	5	
12	12	N12	4	Incl	▼	3,25	25	5	
13	13	N13	8	Incl	▼	3,25	13,75	3,25	
14	14	N14	5	Incl	▼	3,25	13,75	3,25	
15	15	N15	14	Incl	▼	3,25	13,75	3,25	



Figure VII.1. A. Liposome

VII.1.1.2. Observation et interprétation

Les différentes formulations préparées montrent la formation d'un agrégat (sédiment) et des solutions non homogènes. Nous supposons que cette agrégation formée est peut-être due à plusieurs facteurs combinés tels que :

- L'attraction électrostatique : lorsque deux charges électriques de signes opposés sont présentes, elles s'attirent mutuellement en raison des forces électrostatiques.
- La solubilité insuffisante du phospholipide : L- α - phosphatidilecoline lécithine de soja est un mélange d'acide gras, qui peut présenter une solubilité limitée dans l'éthanol. Si la concentration de phospholipides utilisée est trop élevée ou si la solubilité du phospholipide est dépassée, il peut y avoir une précipitation ou une agrégation des phospholipides une fois que le solvant est éliminé [93].

Une solution adéquate étudiée et réalisée pour résoudre ce phénomène c'est l'encapsulation en utilisant les niosomes.

- Préparation des solutions niosomales :

VII.2. Détermination de la taille et de taux d'encapsulation des suspensions niosomales

VII.2.1. Analyse par spectroscopie UV-visible

VII.2.1.1. Résultats

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé pour le calcul du taux d'encapsulation en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine ($Y=1.467x + 0.008$), Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VII.2. La concentration équivalente de la quercétine de chaque formulation.

Formulation	Concentrations (mg/ml)
Extrait	357.5
1	109
2	150
3	152
4	14.98
5	137.6
6	153

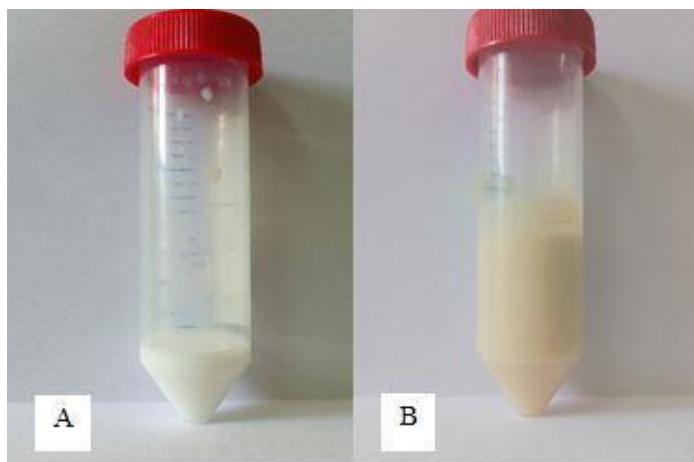


Figure VII.2. A. Niosome-blanc, B. Niosome-propolis

VII.2.1.2. Observation et interprétation

On remarque que la quantité maximale des formulations préparées est de 153 mg/ml de la propolis encapsulée et la formulation 04 présente la concentration la plus basse qui est de 14.98 mg/ml, ce qui indique une quantité relativement faible d'extrait dans cette formulation.

Les résultats montrent que les formulations contenant uniquement le "Span 60" ou le "Tween 80" ont des effets distincts sur la concentration de la substance encapsulée. La combinaison des deux tensioactifs semble produire des résultats intermédiaires.

VII.2.2. Détermination du taux d'encapsulation et de la taille

VII.2.2.1. Résultats

- La taille des niosomes a été mesuré à l'aide d'un granulomètre laser (voir la figure 4 dans l'annexe).
- Le taux d'encapsulation a été calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$T = \frac{\text{concentration de l'extrait} - \text{concentration de la formulation}}{\text{concentration de l'extrait}} \times 100$$

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VII.3. La taille et le taux d'encapsulation des formulations.

Formulation	Span 60	Tween 80	Cholestérol	Taille μm	Taux d'encapsulation %
1	20	/	0	0.145	61.88
2	30	/	10	0.257	47.55
3	/	20	0	0	/
4	/	30	10	14	94.76
5	10	10	0	20	51.88
6	15	15	10	0.143	46.5

VII.2.2.2. Observation et interprétation

D'après les résultats obtenus, on remarque que la taille et le taux d'encapsulation varient avec la quantité du cholestérol.

On observe que la plus petite taille obtenue est de 143 nm et le taux d'encapsulation le plus élevé est de 94,76%.

- La formulation 02 présente une taille de particules plus élevée qui est de 257 nm comparant à la formulation 01 qui présente une taille de 143 nm ce qui est due à la présence du cholestérol qui augmente la taille des particules.
- La formulation 01 présente un taux d'encapsulation de 61.88% et la formulation 02 a un taux de 47.55%. Cela indique que l'ajout de cholestérol peut potentiellement diminuer le

taux d'encapsulation. Des résultats similaires ont été trouvés par (Jay Patel et al, et Vinod J. Mokal et al) [88 ;94].

- La taille des particules est de 0 pour la formulation 03, tandis que pour la formulation 04, est de 14 μm . Ce résultat est dû à l'ajout du cholestérol qui aide à former les vésicules, (Forough hassibi et al) ont montré des résultats similaires [95].
- Il y a une différence significative dans la taille des particules entre les formulations 05 et 06 cela peut être attribué à la variation des concentrations des composants ou à la présence de cholestérol. Il y a une légère différence dans les taux d'encapsulation entre les deux formulations.
- En résumé cette partie a montré que la meilleure formulation est la 01 avec une taille de 145 nm et un taux de 61,88%, ce résultat est peut-être expliqué par la présence du Span 60 qui a un pouvoir de former des vésicules sphériques chargées du principe actif comparant au tween 80 [88].

VII.2.3. Identification des composés phénoliques des extraits éthanoliques de la propolis des différentes formulations de niosomes par HPLC

VII.2.3.1. Résultats

L'analyse HPLC nous a permis d'identifier les trois composés phénoliques dans les différents échantillons tels que la vanilline, acide cinnamique et acide caféique [89].

Les chromatogrammes sont représentés dans les figures (VII.4, VII.5, VII.6, VII.7, VII.8, VII.9, VII.10, voir l'annexe).

VII.3. Détermination de la meilleure formulation (optimum)

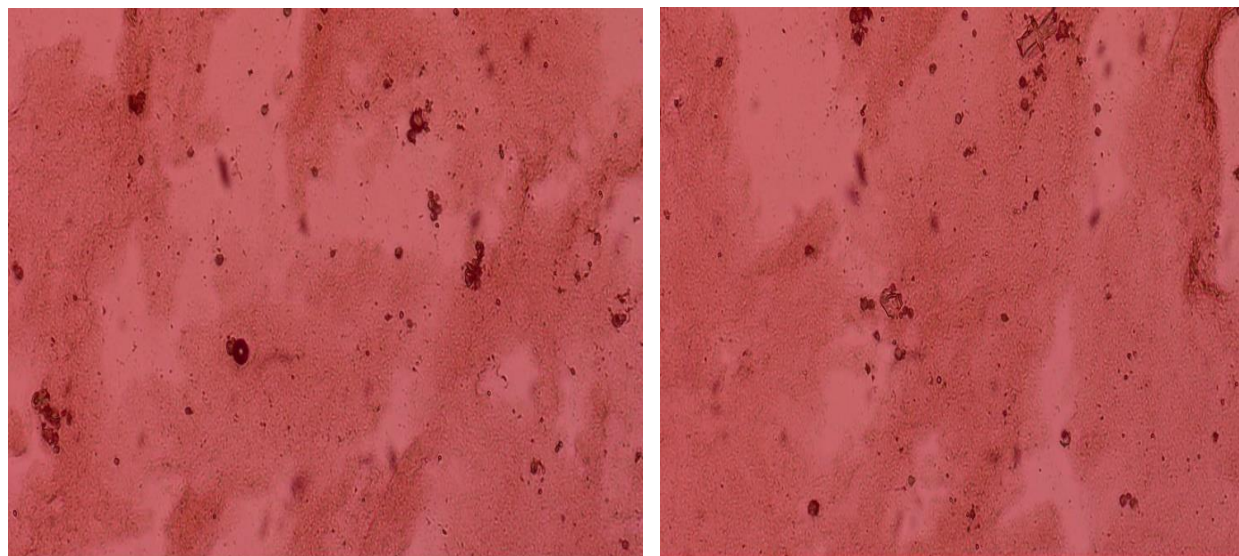
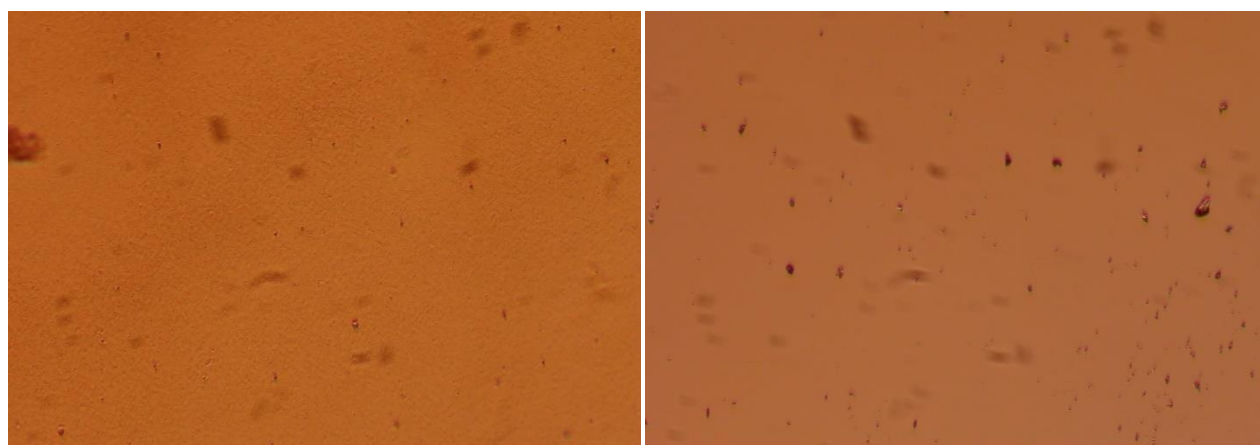
L'objectif de notre étude est d'obtenir la taille des niosomes minimale avec un meilleur taux d'encapsulation.

Nous avons pu déterminer la meilleure formulation avec la taille désirée et un taux d'encapsulation élevé (voir le tableau VII.4).

La meilleure formulation et le blanc (témoin) sont préparés et analysés par un microscope électronique (voir la figure VII.2 et VII.3), qui montre une formation des vésicules sphériques.

Tableau VII.4. Détermination de la meilleure formulation

	Extrait de propolis	Span 60	Cholestérol	La taille	Taux d'encapsulation
Niosome	10	20	0	0.145	61.88
Blanc	0	20	0	0.143	/

**Figure VII.2.** Niosome-propolis observé par un microscope optique**Figure VII.3.** Niosome-blanc observé par un microscope optique

VII.4. Analyse par spectroscopie infrarouge IR

VII.4.1. Résultats

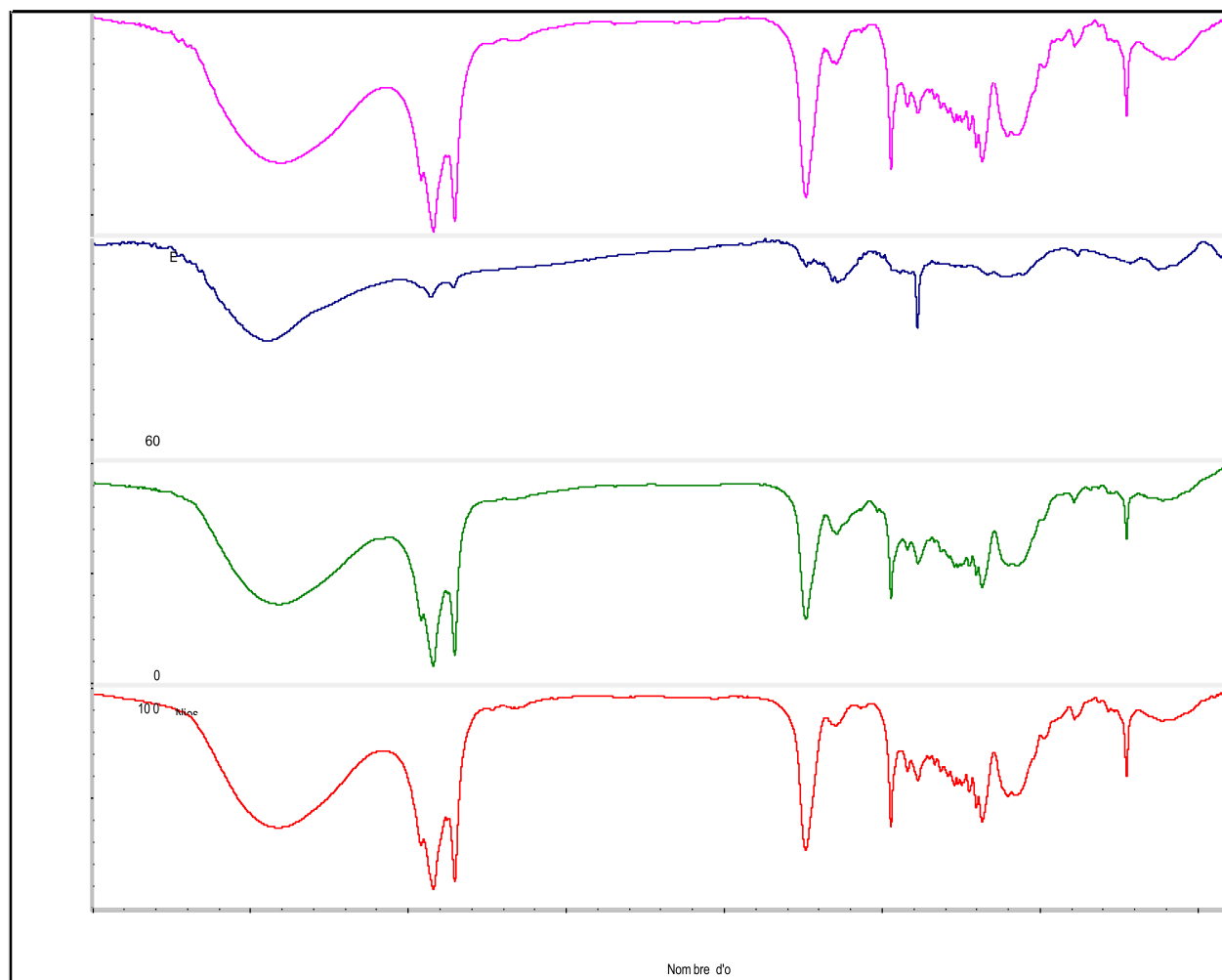


Figure VII.5. Analyse spectrale FTIR de : Niosome blanc, extrait de propolis, propolis-Niosome

VII.4.2. Observation et interprétation

Une analyse FTIR a été réalisée afin de détecter et de démontrer la présence des interactions entre les composants (Figure VII.5). Les composants ont été analysés individuellement et en combinaison.

- Le spectre de l'extrait de propolis présente une bande large à 3440 cm^{-1} attribuée à l'étirement groupement hydroxyle OH ce qui est due à la présence des phénols.
- Deux bandes à 2925 cm^{-1} et 2854 cm^{-1} correspondent aux étirements des groupements symétriques CH_3 et aux étirements des groupements asymétriques de CH_2 présents dans les alcènes et les alcanes.

- Un pic 1113 cm^{-1} associé aux vibrations des liaisons C-O, présents dans les éthers aromatiques, qui sont associés à la présence des flavonoïdes (**N. A. Ramli et al, et Z. Toutou et al**) ont trouvé des résultats similaires [96 ; 97].
- Pour le span un pic est apparu à 3406.84 cm^{-1} qui correspond à l'étirement des groupements hydroxyle (-OH) présents dans les alcools ou les phénols, un autre pic à 2849 cm^{-1} qui correspond l'étirement des groupements C-H des alcynes ou des alcanes.
- Un pic à 1737 cm^{-1} qui pourrait correspondre à l'étirement des groupes carbonyles (-C=O) et les esters, un autre pic à 1468.07 cm^{-1} peut correspondre à l'étirement des groupements C-H des alcanes, un pic à 1382 cm^{-1} qui correspond à l'étirement des liaisons C-H des alcènes, et un pic à 1179 cm^{-1} qui correspondre à l'étirement des liaisons C-O dans l'ester. Le niosome blanc montre le même spectre que le Span 60 (**Ali Farmoudeh et al**) [98].
- Pour le spectre niosome-propolis, on observe une large bande localisée autour de $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ correspondant à la liaison O-H, un pic à 1640 cm^{-1} en raison de la vibration d'étirement C=O qui est due principalement à la présence des flavonoïdes.

Ces résultats ont démontré que la propolis contient une variété de composés bioactifs tels que les : flavonoïdes les composés phénoliques, y compris plusieurs groupes fonctionnels, qui augmentent son pouvoir thérapeutique. Aussi, elles montrent l'augmentation de l'intensité de quelques pics après l'encapsulation ce qui explique les interactions de l'extrait avec les cavités internes des niosomes ce qui confirme le piégeage de l'extrait.

VII.5. Analyse de diffraction des rayons X

VII.5.1. Résultats

L'analyse cristallographique des différents échantillons a été réalisé en utilisant un diffractomètre des rayons X.

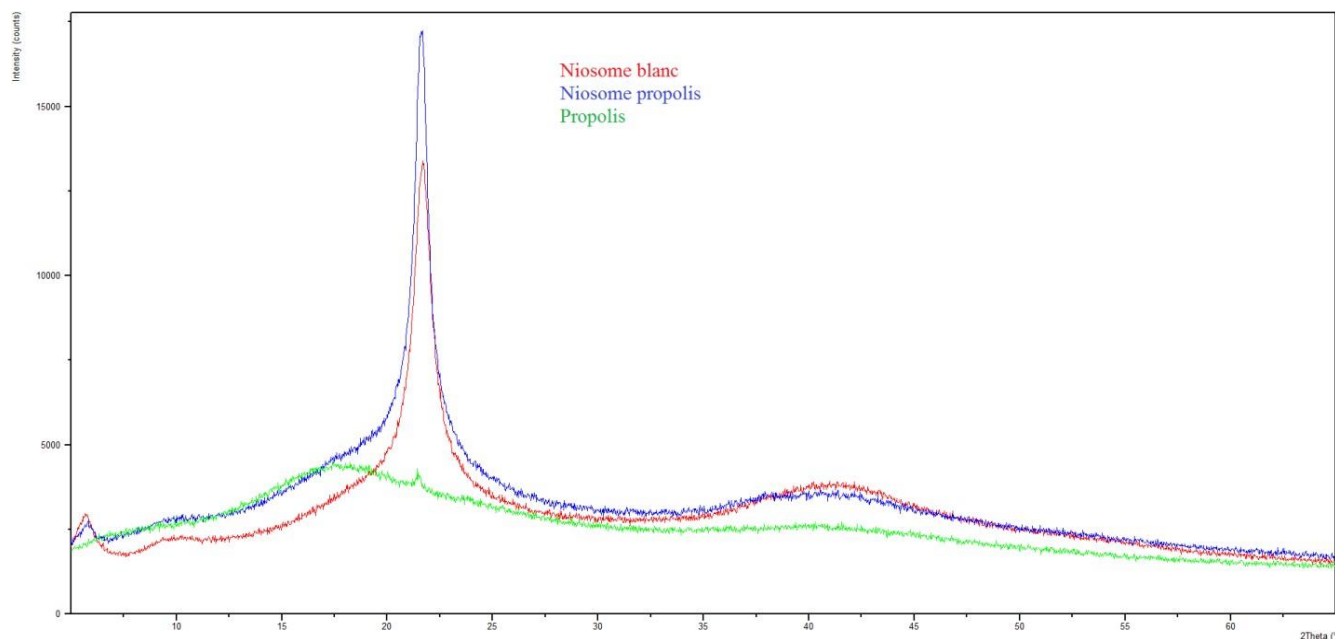


Figure VII.6. Analyse DRX

VII.5.2. Observation et interprétation

L'analyse DRX a été utilisé pour étudier la structure cristalline de l'extrait de propolis, de niosome blanc et niosome-extrait (figure VII.6).

On observe des pics correspondant aux interactions des rayons X avec la structure cristalline ou amorphe présentée dans les échantillons.

L'extrait de propolis présente une structure amorphe et un pic différent aux autres échantillons un large pic entre 15° et 20° avec une intensité faible (**K. Pant et al**) ont trouvé les mêmes résultats [99].

Par contre les pics de niosome-extrait et le blanc sont similaires et présentent un angle de diffraction de [20-25°], un changement dans l'intensité des pics a été observé ce qui n'indique pas de modification dans leur structure cristalline, aussi le pic d'extrait n'a pas été observé dans ces derniers ce qui suggère que la propolis a été dispersé moléculairement dans la cavité des niosomes et cela peut suggérer l'encapsulation de l'extrait.

VII.6. Test spermatique

VII.6.1. Analyse statistique

Tous les résultats sont représentés sous la forme de moyenne \pm erreur standard (ES) les différences ont été considérées comme significatives avec $p < 0,05$. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de logiciel STATVIEW. Dans cette étude nous avons étudié l'effet de l'extrait de propolis chargé dans les niosomes sur la survie des spermatozoïdes après refroidissement.

VII.6.1.1. Résultats I

Les résultats du test spermatique et l'analyse des paramètres de vitesses sont représentés dans les figures VII.7 et VII.8.

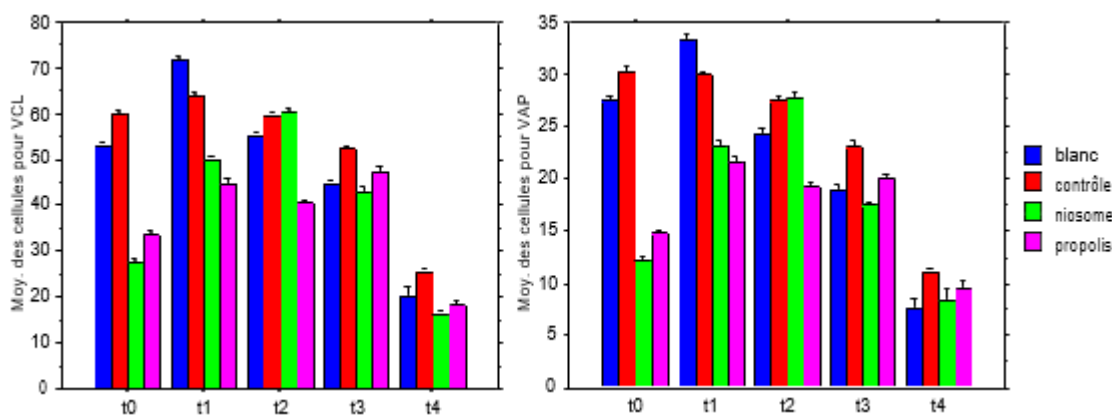


Figure VII.7. Diagramme de la vitesse curviligne (VCL), et la vitesse moyenne de la trajectoire (VAP) de la cryoconservation des spermatozoïdes en fonction du temps élaté par le traitement.

VII.6.1.1.1. Observation et interprétation

À T0, nous observons que la VCL et VAP du contrôle (tris + sperme) montre un meilleur effet ceci est peut-être expliqué par le fait que les traitements préparés n'ont pas encore réagis avec le milieu spermatique.

A T1 (30min) la meilleure vitesse de déplacement (VCL et VAP) est celle de blanc et l'extrait.

A T2 après 1h de réfrigération à 4°C les spermatozoïdes traités par l'extrait encapsulé ont montré une meilleure (VCL et VAP), à T3 (2 h) nous remarquons une chute significative des vitesses pour les échantillons

A T4 (48 h) le témoin montre toujours un meilleur effet cela peut être expliqué par le phénomène de l'éclatement des spermatozoïdes et un problème de dilution, ceci veut dire les composés bioactifs d'extrait ont montré un effet toxique sur les spermatozoïdes [97].

VII.6.1.2. Résultats II

Pour améliorer le milieu de conservation du sperme on a dilué nos échantillons pour avoir les résultats suivants.

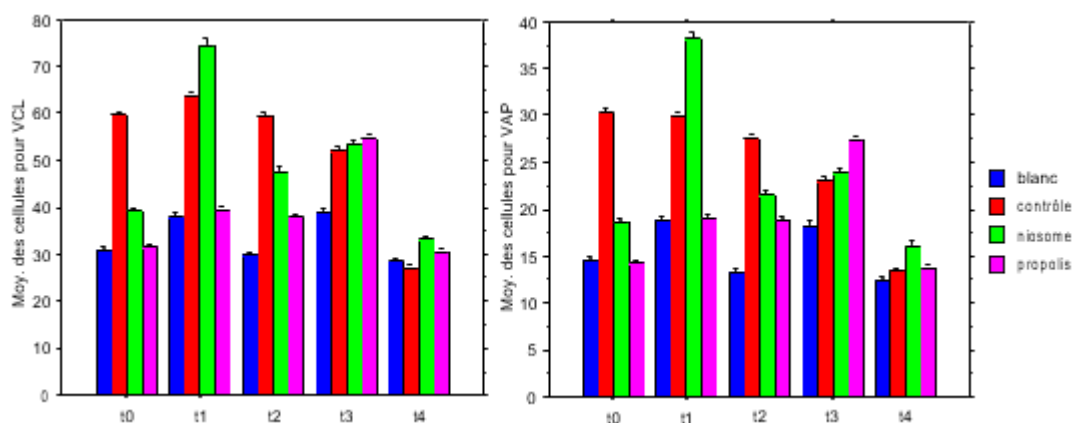


Figure VII.8. Diagramme de la vitesse la vitesse curviligne (VCL) et la vitesse moyenne de la trajectoire VAP de la cryoconservation des spermatozoïdes en fonction de temps élaté par le traitement après dilution

VII.6.1.2.1. Observation et interprétation

Après avoir effectué une dilution sur les différents traitements on remarque une amélioration de la VCL et de la VAP des spermatozoïdes par le traitement niosomes-extrait en comparaison avec le groupe témoin qui présentait des valeurs plus basses à T1 (30 min).

D'une autre part le meilleur effet de l'extrait est observé à T3 (2 h), une augmentation significative des vitesses (VCL et VAP) a été observé. Ce résultat est attribué à l'effet antioxydant des composés bioactifs de la propolis qui a eu suffisamment de temps pour pouvoir réagir avec le sperme.

A T4 on peut voir que la formulation des niosomes a montré un meilleur effet sur la VCL et la VAP comparant au témoin et à l'extrait ce qui est probablement dû à la présence des composés phénoliques y compris les flavonoïdes qui ont un effet contre le stress oxydatif, le choc du froid et la détérioration de l'environnement des spermatozoïdes en protégeant leur membrane cellulaire des radicaux libres [92].

Conclusion générale

Dans ce travail, nous avons pu préparer par la méthode d'injection de solvant organique des solutions liposomales et des suspensions niosomales dans le but d'améliorer la solubilité d'extrait de propolis de la région de Melbou plus particulièrement les flavonoïdes, et par la suite nous les avons caractérisés et étudiés leur effet antioxydant sur la conservation spermatique.

Après avoir réalisé tous les essais, nous avons pu obtenir la solution niosomale optimale, dont le taux d'encapsulation est de 61.88 % et la taille des niosomes est de 143 nm avec les conditions optimales suivantes :

- 20 mg/ml de Span 60
- 10 mg/ml d'extrait
- 10 ml d'éthanol
- 20 ml d'eau distillé

Les suspensions niosomales obtenues ont été caractérisées par l'analyse d'absorption UV-visible, HPLC, analyse de la spectroscopie infrarouge IR, la diffraction des rayons X (DRX) et en dernier un test de motilité des spermatozoïdes a été évalué.

Enfin, nous avons pu atteindre notre objectif principal, qui est l'amélioration de la solubilité d'extrait de propolis en utilisant les niosomes.

En guise de perspectives il serait intéressant de compléter cette étude par :

- L'étude de l'influence d'autres paramètres tels que : le temps et la température.
- Effectuer d'autres techniques de caractérisations comme : l'RMN, l'index de polydispersité, et le MEB.
- La réalisation des tests *in vitro* et *in vivo*.

Références bibliographiques

Bibliographie

- [1]. N. Cardinault et al, La propolis : origine, composition et propriétés, 2012, 10 :298–304.
- [2]. José Mauricio Sforcina et Vassya Bankova, Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?, 2011, 253–260.
- [3]. Attia Karima et Atilous Meriem, Caractérisation et Evaluation des activités biologiques de la propolis de différentes régions de Bejaïa, 2020/2021.
- [4]. Florence Potier, La propolis, propriétés et intérêt thérapeutique, Sciences pharmaceutiques, 2014. Thèse de doctorat, Université de Lorraine.
- [5]. FOUCHAL Lilia, LAKSARI Dihia, Activités biologiques de propolis collectées dans diverses régions de Tizi-Ouzou, 2018/2019.
- [6]. Yousfi Khadidja, Zitouni Fatma, L’effet anti fongique des Api produits (miel-propolis) sur *C. albican*, 2016.
- [7]. Bouchama Radia, Djaouani Djouza, Etude de l’activité antibactérienne des produits de la ruche (miel, propolis et gelée royale), Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou 2014- 2015.
- [8]. Ouadjir Tounsia, Propolis : production, composition, propriétés biologiques et utilisation, 2020 – 2021.
- [9]. Boudjelloua Razika, Contribution à l’étude de la consommation du miel au niveau de la wilaya de Tizi-Ouzou, 2017/2018.
- [10]. Kaci-Moussa Belkacem, Kedir Kahina Les techniques de conditionnement et de commercialisation des produits de la ruche dans la wilaya de Tizi-Ouzou, 2019/2020.
- [11]. Moulelkaf Ryma, Bencheikh Ryadh, propriétés biologiques de deux produits de la ruche : le miel et la propolis, 2019-2020.
- [12]. Gregory, G, Liposomes in drug delivery: how it all happened, 2016.
- [13]. Manoj Kumar Agrawal a historical perspective of liposomes-a bio nanomaterial,2020, Materials Today, Tome 45, Partie 2, P 2963-2966.

[14]. Sharma Vijay K et al, liposomes: present prospective and future challenges, 2010, Article in international journal of current pharmaceutical review and research, p 0976- 822X.

[15]. Lambert, W et al, phospholipide, 2009, Handbook of Pharmaceutical Excipients, partie.

[16]. Chastagnier, A, Les liposomes en thérapie orale et parentérale, 1998.

[17]. Angélique.H, La phosphatidylsérine, un phospholipide essentiel au cerveau, 2016, N°63

[18]. Faisal, F et el, Liposomes as Drug Delivery System: An Updated Review, (2021), Article in Journal of Drug Delivery n 11p 149-158

[19]. N. Dragicevic, H.I. Maibach, Liposomes as Drug Delivery Systems in Dermal and Transdermal Drug Delivery Slavica Siler- Marinkovic, 2016.

[20]. Olga Popovska et al, Methods for Preparation and Characterization of Liposomes as Drug Delivery Systems, 2013, International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research, n3, p 182-189.

[21]. Latifa W. Allahou et al, Investigating the Application of Liposomes as Drug Delivery Systems for the Diagnosis and Treatment of Cancer, Hindawi International Journal of Biomaterials Volume 2021, Article ID 3041969, 16 pages.

[22]. Carine Sebaaly. Préparation à petite et grande échelle des liposomes encapsulant l'huile essentielle de clou de girofle libre et sous forme de complexe d'inclusion dans l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine : caractérisation des nanostructures et évaluation de leur effet antioxydant, 2016.

[23]. Aurélien Lorin, Les liposomes : description, fabrication et applications, 2004.

[24]. Miquel Ponq et al, liposomes obtained by the ethanol injection method, 1993.

[25]. Haile Bobo, l'utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux , 2017.

[26]. Journal of Drug Delivery Science and Technology, Ethanol injection technique for liposomes formulation: an insight into development, influencing factors, challenges and applications, 2020.

[27]. Dua J.S et al, Liposome: Methods of Preparation and Application, 2012, International Journal of Pharmaceutical Studies and Research, p 2229-461.

- [28]. Anil Kumar Anal, Controlled –release dosage forms, pharmaceutical manufacturing Handbook production and processe,
- [29]. Aurélien, L et al, Les liposomes : description, fabrication et applications, 2004, p 163–176.
- [30]. Alain Meybeck, Les liposomes en cosmétique, journal l'actualité chimique octobre novembre 2008 - n° 323-324
- [31]. G. Redziniak, Liposomes et peau : passé, présent, futur, Article Pathologie Biologie 51 ,2003, 279–281
- [32]. Maherani, B et al, Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies, Current Nanoscience, 2011, 7, 436-452
- [33]. Connor, S et al (2023), Nanotechnologies dans le domaine agroalimentaire : que devons-nous savoir ?, Volume 16, numéro 3, hiver 2019
- [34]. Bhupendra Pradhan et al, Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application, 2015, Journal of Applied Pharmaceutical Research, Volum 3, p 01 – 08
- [35]. Gemechis Haile Bobo, L'utilisation des liposomes comme vecteurs médicamenteux, 2017.
- [36]. Behnouch, M, Encapsulation et vectorisation de molécules biofonctionnelles par des nanoliposomes : Etude des propriétés physico-chimiques et des mécanismes de transfert à travers la membrane liposomale, 2012.
- [37]. Francisco. Bet al, Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques, Magnetic Resonance Spectroscopy, editeur Dong-Hun Kim, 2012.
- [38]. Elasaad, K, Structural characterization of cyclodextrins: from inclusion complexes to metal organic frameworks (MOFs), University de Namur, 2013.
- [39]. Romain Jacquet, Cyclodextrines hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiosélective et complexante. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse, 2006.

[40]. Analysis Grégorio. C et al, Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and analysis
l'auteur Michal Řezanka

[41]. ARUN R Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule : A Review, 2008, Sci Pharm Scientia Pharmaceutica. N 76, p567–598.

[42]. SID Dounia, Conception et évaluation in vitro/in vivo de nouvelles Formulations pharmaceutiques microparticulaires à base de complexes inclusion, 2022.

[43]. Erem Bilensoy and A. Atilla Hincal, Cyclodextrin – based nanomaterial in pharmaceutical field: Pharmaceutical manufacturing, 2010, handbook Production and Processes n (7.1) editeur Shayne Cox Gadr.

[44]. W Cook, ME Quinn, RC Rowe, Cyclodextrine, 2009, handbook of pharmaceutical excipients 6^{em} édition, éditeur Raymond C Rowe et al.

[45]. Manuel Tharin, Synthèse de polyéthers linéaires et cycliques substitués par des cyclodextrines : applications en chromatographie gazeuse et électrophorèse capillaire, 2002.

[46]. Zidane Salima, Encapsulation de substances actives assistée par les β -Cyclodextrines, 2019.

[47]. Taouzinet Lamia, Encapsulation de la vitamine E par des cyclodextrines, liposomes et PEG. Application dans la cryoconservation spermatique animale, 2021.

[48]. Fatmi Sofiane, Formulation et caractérisation d'un anticancéreux à base de polymère hydrophile et de cyclodextrines, 2015.

[49]. Rajeswari Challa et al, Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review, 2005, AAPS PharmSciTech, 6 (2), Article 43.

[50]. Melissa Taous Zaidi, Amélioration de la solubilité d'un anticancéreux : La camptothécine par complexation avec les cyclodextrines, 2012.

[51]. Mgr. Martin Popr, Synthèses of cyclodextrin derivatives for practical applications, 2016.

[52]. Zheng-Yu Jin, CYCLODEXTRIN CHEMISTRY Preparation and Application.

[53]. Éditeur Erem Bilensoy, Cyclodextrins in pharmaceuticals, cosmetics, and biomedicine Current and Future Industrial Applications, 2011.

[54]. Heather E. Grandelli, Formation of Cyclodextrin-Drug Inclusion Compounds and Polymeric Drug Delivery Systems Using Supercritical Carbon Dioxide, 2013.

[55]. Helene jeulin, impacte virologique et pharmacologique de la complexation de la ribavirine aux cyclodixtrine sur un modèle animal d'encéphalite rougeoleuse, 2008.

[56]. Bakkor,Y, étude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées, 2005.

[57]. OULMOU Fadila,2014 Fonctionnalisation sélective de la β -Cyclodextrine en vue de la complexation de l'amlodipine, 2014.

[58]. Maurice Pillet, Les plans d'expériences par la méthode Taguchi, 2001.

[59]. J. Goupy, Les plans d'expériences, Revue Modulad, 2006.

[60]. Gaëtan Blondet, Système à base de connaissances pour le processus de plan d'expériences numériques, 2017.

[61]. Mohamed Skander DAAS, plan d'expérience, 2019.

[62]. Jean-Claude Chauveau et Jean-Paul Chassaing, Introduction à la méthode des plans d'expérience par la méthode Taguchi.

[63]. Belkadi Thanina et Magged Ludmila, Traitements des margines d'olives par co-précipitation en utilisant les plans d'expériences, 2015/2016.

[64]. Ayad Mohamed et Barka Yassine, Modélisation des betons ordinaires par des plans d'expériences, 2013.

[65]. Stéphane Vivier, Stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et Application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis, 2002.

[66]. Bouhzem Oussama, Modélisation et optimisation mono et multi-objective des conditions d'usinage de l'acier AISI D3 en utilisant les méthodes RMS, Taguchi et la fonction de désirabilité, 2018/2019.

[67]. Frédéric Gillon, Modélisation et optimisation par plans d'expériences d'un moteur à commutations électroniques. Modélisation et simulation, 1997.

[68]. Jérôme Faucher, Les plans d'expériences pour le réglage de commandes à base de logique floue, 2006.

[69]. Toutou Zahra, Hammoumraoui Lydia, optimisation du procédé d'encapsulation mixte de la vitamine E, 2018.

[70]. Lohumi Ashutosh et al, A novel drug delivery system: Niosomes review, Journal of Drug Delivery & Therapeutics; 2012, 2(5), 129-135.

[71]. Sepideh Khoei et Morteza Yaghoobian, Niosome a novel approach in modern drug delivery system: An overview Chapitre 6 2017, 207-237.

[72]. Pei Ling Yeo et al, Niosomes : une revue de leur structure, de leurs propriétés, de leurs méthodes de préparation et de leurs applications médicales 2017 ; 11(4) : 301–14.

[73]. Shuo chen et al, Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications, 2019 S0939-6411(19)30533-8.

[74]. Rahiman Mohammed Noor Hazira * and M Sunitha Reddy, Niosomes: A nanocarrier drug delivery system, 2023, 22(02), 120–127.

[75]. Denitsa B, Nanoarchitectonics of Multifunctional Niosomes for Advanced Drug Delivery, 2021, 6, 33265–33273.

[76]. Mahesh Gajanan Umbarkar, Niosome as a Novel Pharmaceutical Drug Delivery: A Brief Review Highlighting Formulation, Types, Composition and Application 2021 Vol 55 issue 1.

[77]. Arumugam Kauslya et al, Niosomes: A novel targeted drug delivery system 2021, vol 11 issue 1.

[78]. Karim Masud kazi et al, Niosome: A future of targeted drug delivery systems 2010 VOL 1 374.380.

[79]. Nefise Ozlen Sahin, Niosomes as nanocarrier systems 2007. 67–81

[80]. Gannu P.kumar, Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery- an overview, 2011.

[81]. Maria Marçal Verdugo Mendes Duarte. Development and characterization of niosomes as new drugs delivery systems 2020

[82]. Masrina mohed nadzir, Taille et stabilité des niosomes de curcumine obtenus à partir de combinaisons de tween 80 et de span 80,2017

[83]. Bwalya A. Witika et al, current advances in specialised niosomal drug delivery: manufacture, characterization and drug delivery applications,2022.

[84]. Rampal Rajera et al, Niosomes: A Controlled and Novel Drug Delivery System 34(7) 945—953, 2011.

[85]. A. Krishna sailaja, Niosomes- a novel drug carrier for drug targeting, 2016.

[86]. Ijeoma Florence uchegbu, andreas G. Shatzlein, Nanoparticule as drug carriers, 2006.

[87]. Taouzinat et al, 2020. «Alpha Tocopherol Loaded in liposome: preparation, optimization, characterization and sperm Motility protection protection». Vol (10), pp 228-236.

[88]. J. Patel et al/Propolis antimicrobial efficacy 2015 Korea Institute of Oriental Medicine

[89]. BOUKOUANE Sihem, SADELLI Chahinaz, Formulation, optimisation et caractérisation de systèmes binaires : cyclodextrines-extrait de propolis et liposomes-extrait de propolis, 2022.

[90]. Zahra TOUTOU et al. Development and validation of high-performance liquid chromatography assay method for simultaneous determination of Caffeic acid, Vanillin, and Cinnamic acid in Algerian propolis extract Vol 01, N° 1, 2022, pp 32-39

[91]. Fahima Ali-RACHEDI Analyse quantitative des composés phénoliques d'une endémique algérienne *Scabiosa Atropurpurea* sub. *Maritima* L. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 87, articles, 2018, p. 13 -21

[92]. Taouzinet et al. Alpha Tocopherol Loaded in Liposome: Preparation, Optimization, Characterization and Sperm Motility Protection Drug Delivery Letters, 2020, Vol. 10, No. 0

[93]. Carine Sebaaly. Préparation à petite et grande échelle des liposomes encapsulant l'huile essentielle de clou de girofle libre et sous forme de complexe d'inclusion dans l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine : caractérisation des nanostructures et évaluation de leur effet antioxydant, 2016.

[94]. Vinod J. Mokale et al, Formulation and optimisation of famotidine proniosomes: an in vitro and ex vivo study, 2016, Vol. 11, No. 2, 97110,

[95]. Forough hassibi et al formulation and characterization of taxifolin loaded lipid nanovesicles (liposome niosome and transfersomes for beverage fortification 2019)

[96]. N.A. Ramli et al, Physicochemical characteristics of liposome encapsulation of stingless bees' propolis, 7 (2021) e06649.

[97]. Zahra Toutou et al, Optimization, characterization and biological effects of Algerian propolis, 25, 2022(4): 269–278.

[98]. Ali Farmoudeh et al, Methylene blue-loaded niosome: preparation, physicochemical characterization, and in vivo wound healing assessment, 2020.

[99]. K. Pant et al, Encapsulated bee propolis powder: Drying process optimization and physicochemical characterization, LWT 155 (2022) 112956.

Annexes

Annexe 1 : Equipements et appareils utilisés durant cette étude

1. Balance analytique



Figure 1. Balance analytique

2. Plaque chauffante et agitatrice



Figure 2. Plaque chauffante et agitatrice

3.Rota-vapeur



Figure 3. Rota-vapeur

4.Granulomètre laser



Figure 4. Granulométrie laser

5. la centrifugeuse



Figure 5. Centrifugeuse

6. HPLC Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)



Figure 6. Hplc

7. Spectrophotomètre UV-visible



Figure 7. Spectrophotomètre UV-visible

8. Spectrophotomètre infrarouge IR

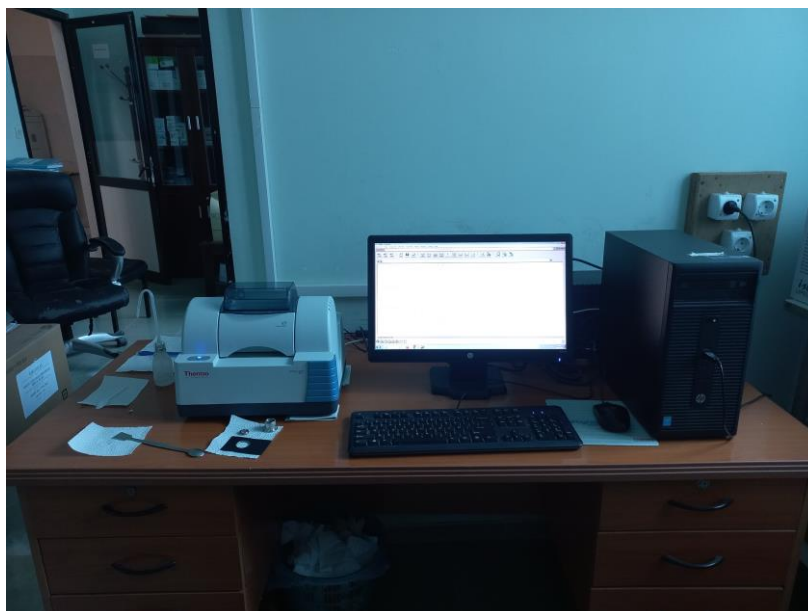


Figure 8. Spectrophotomètre infrarouge IR



Figure 9. Pression hydraulique

9. DRX



Figure 10. Drx

10. Microscope CASA



Figure 11. Microscope CASA

11. Epididyme



Figure 12. Epididyme

Annexe 2 : Résultats des techniques de caractérisation

1. Analyse par hplc

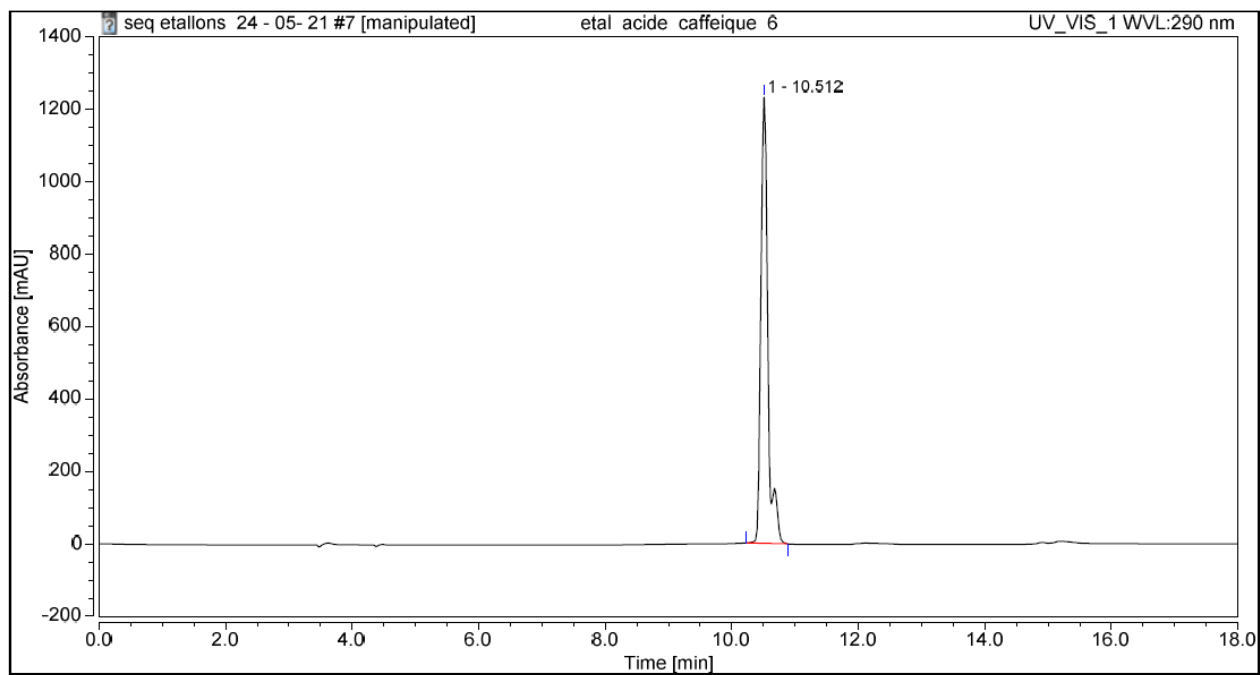


Figure VII.1. Chromatogramme de l'acide caféique

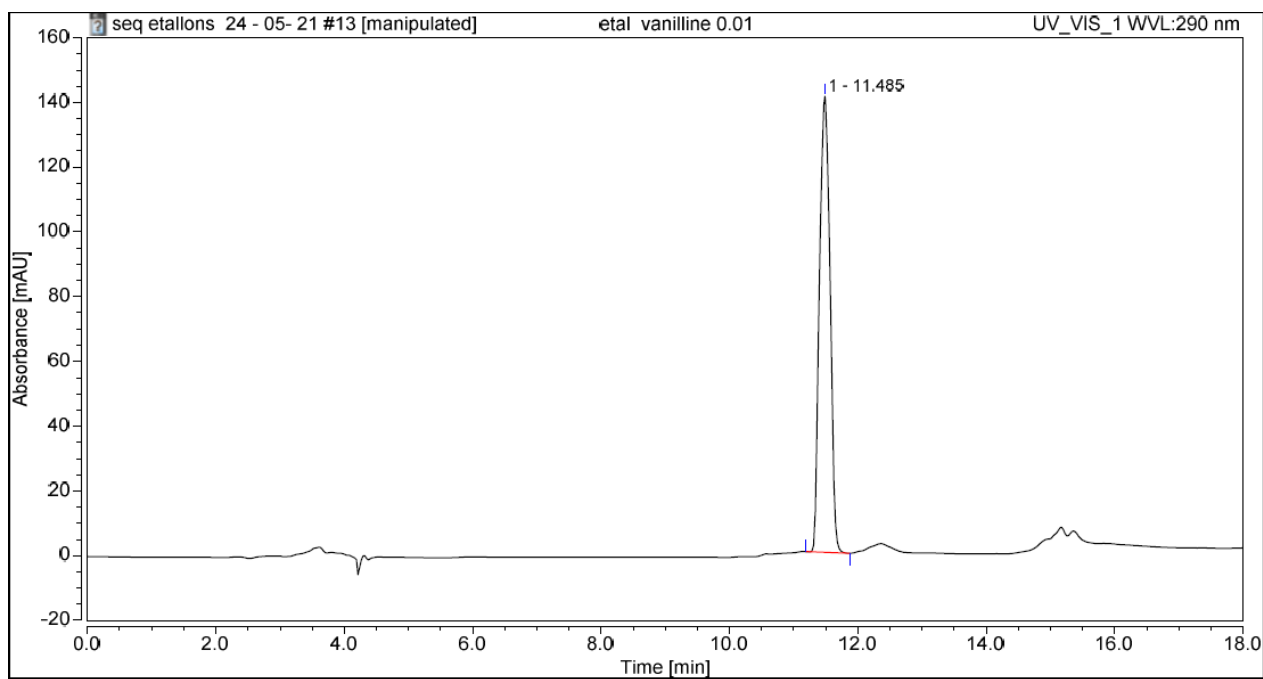


Figure VII.2. Chromatogramme de la vanilline

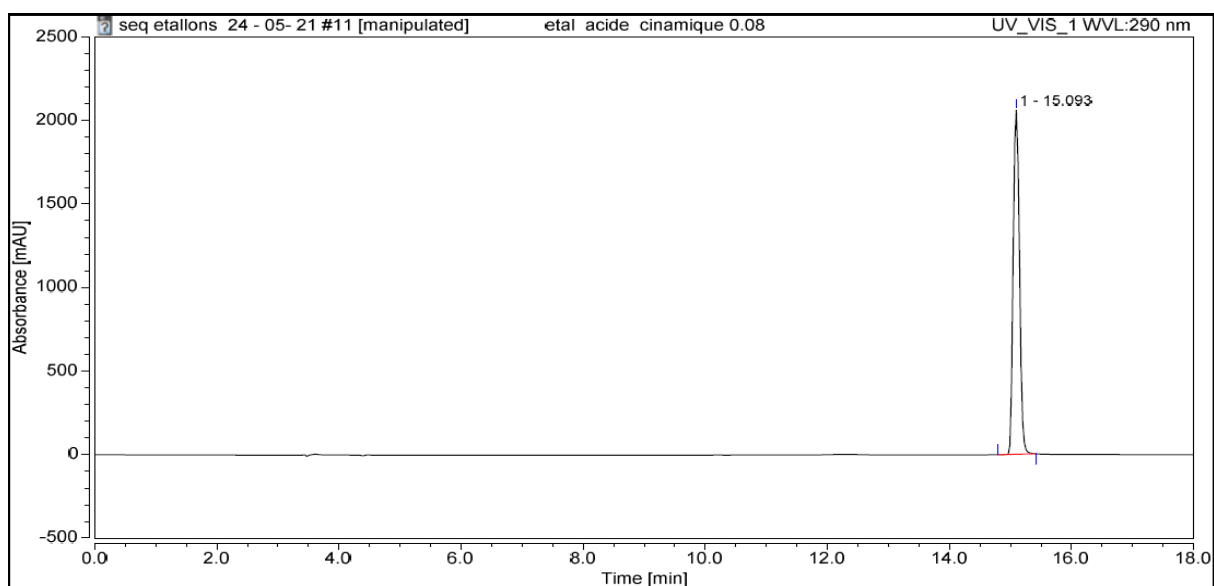


Figure VII.3. Chromatogramme de l'acide cinnamique.

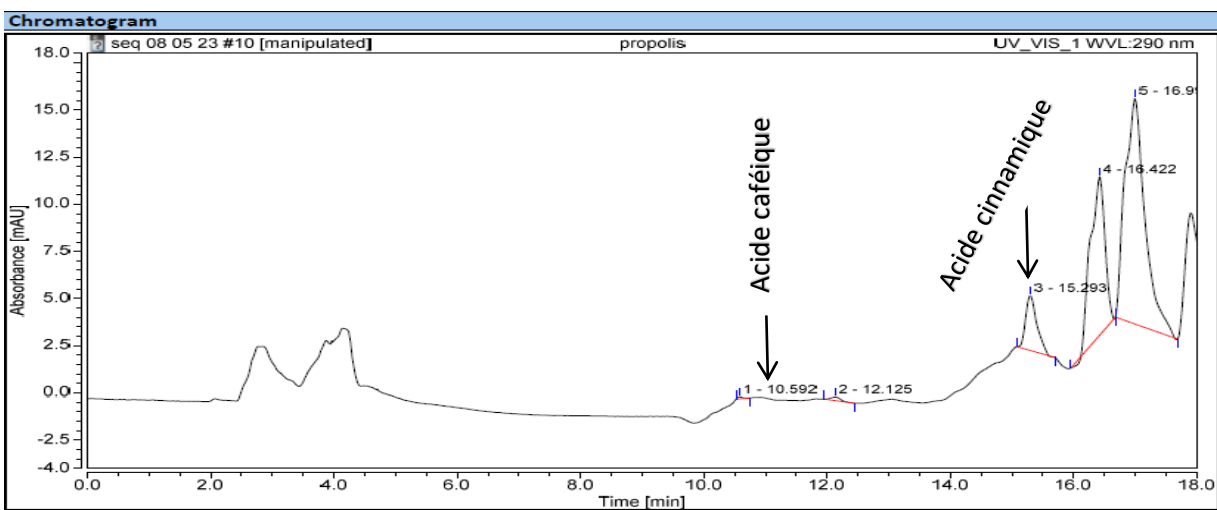


Figure V.II.4. Chromatogramme de la propolis

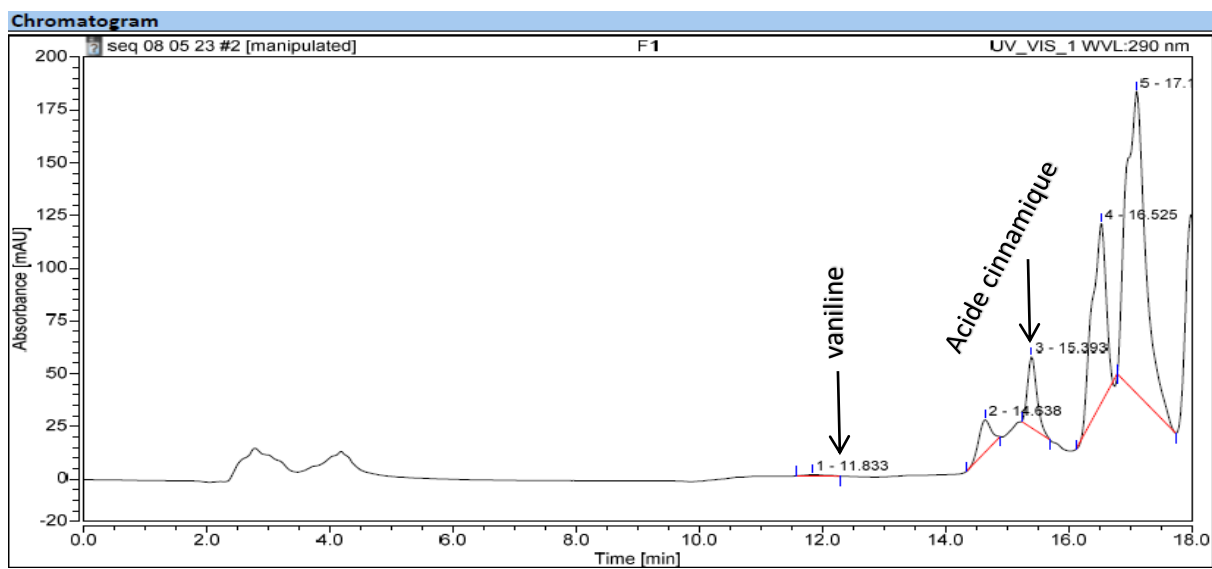


Figure VII.5. Chromatogramme de F1

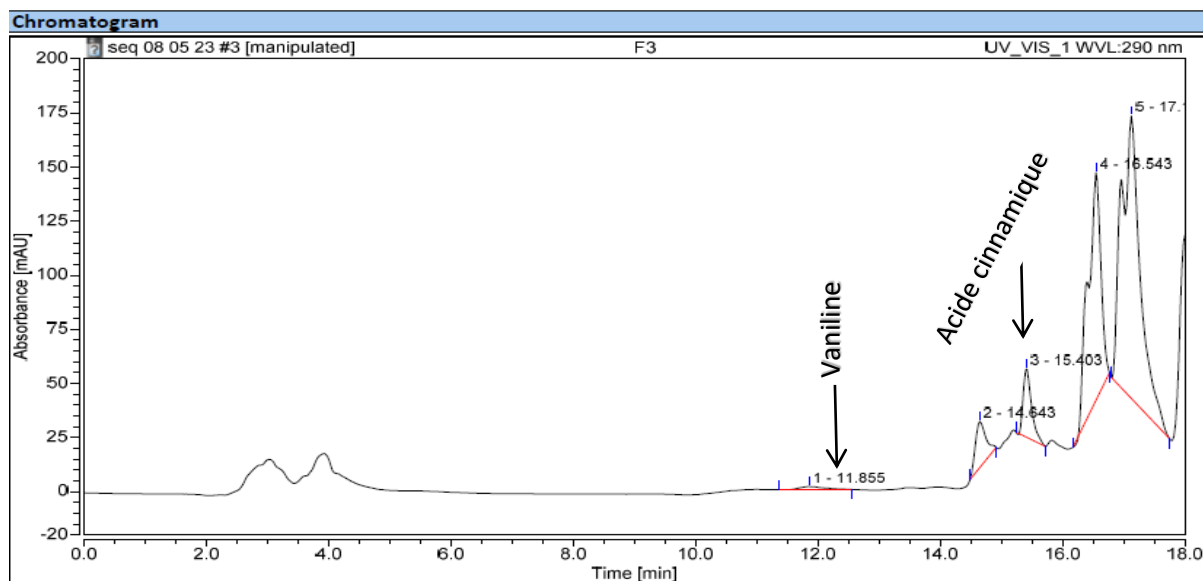


Figure VII.6. Chromatogramme de F3

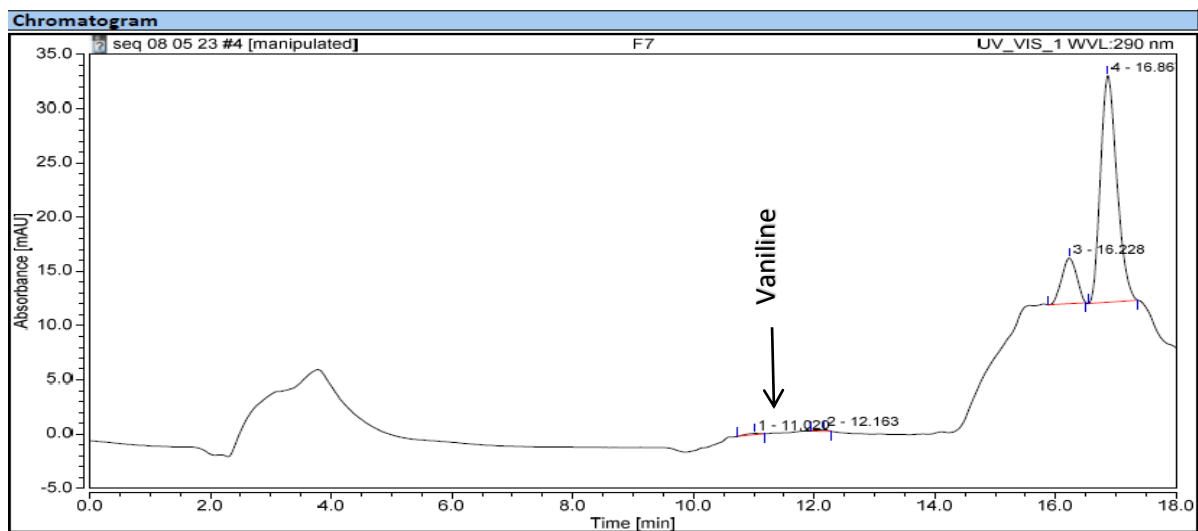


Figure VII.7. Chromatogramme de F7

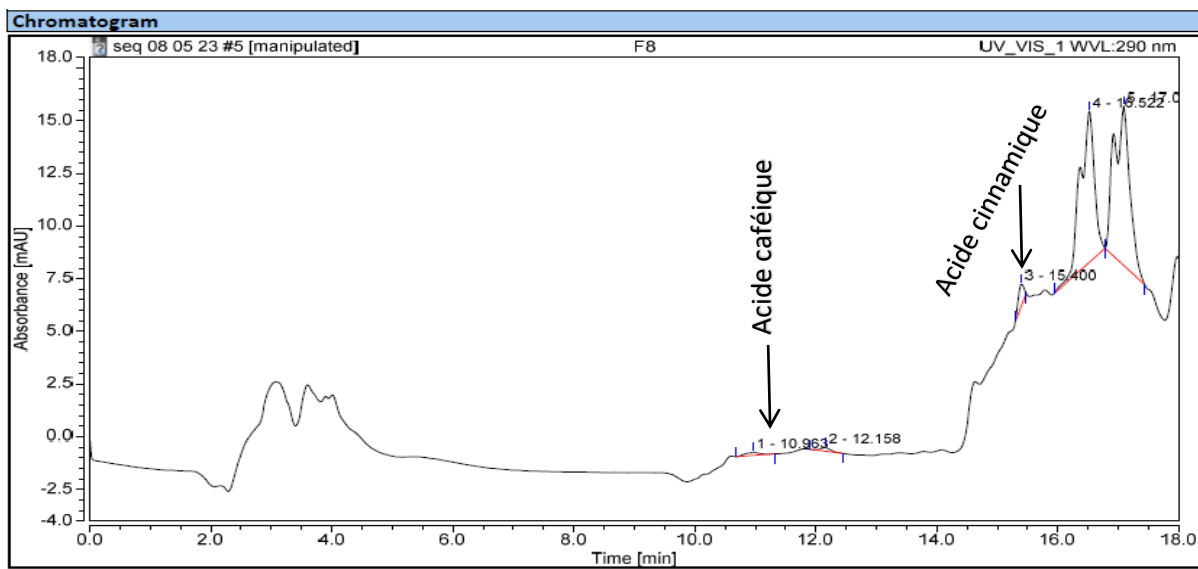


Figure VII.8. Chromatogramme de F8

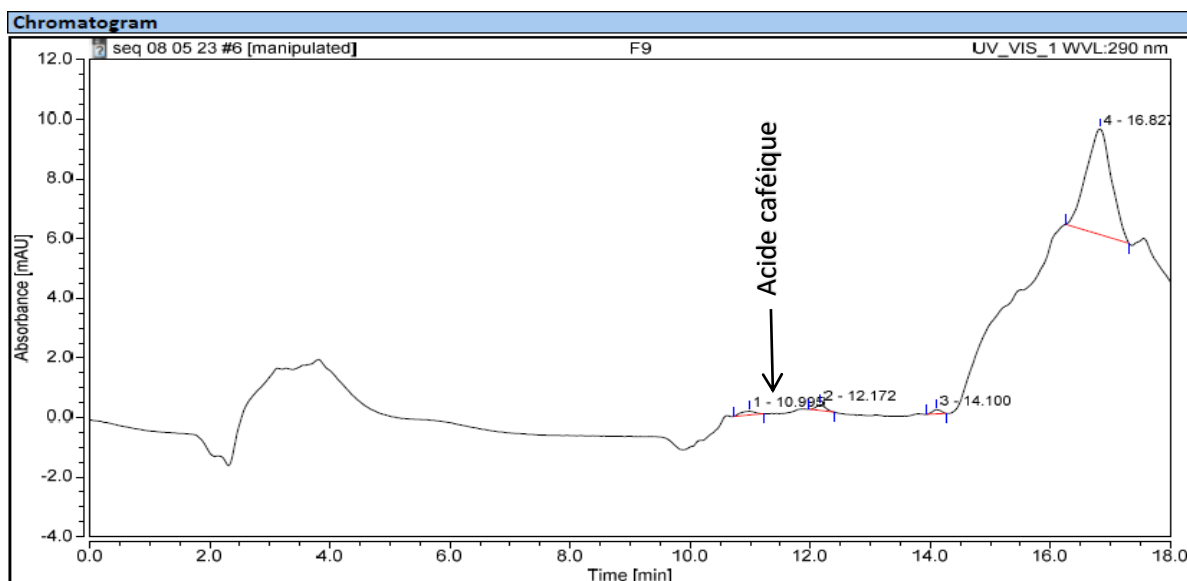


Figure VII.9. Chromatogramme de F9

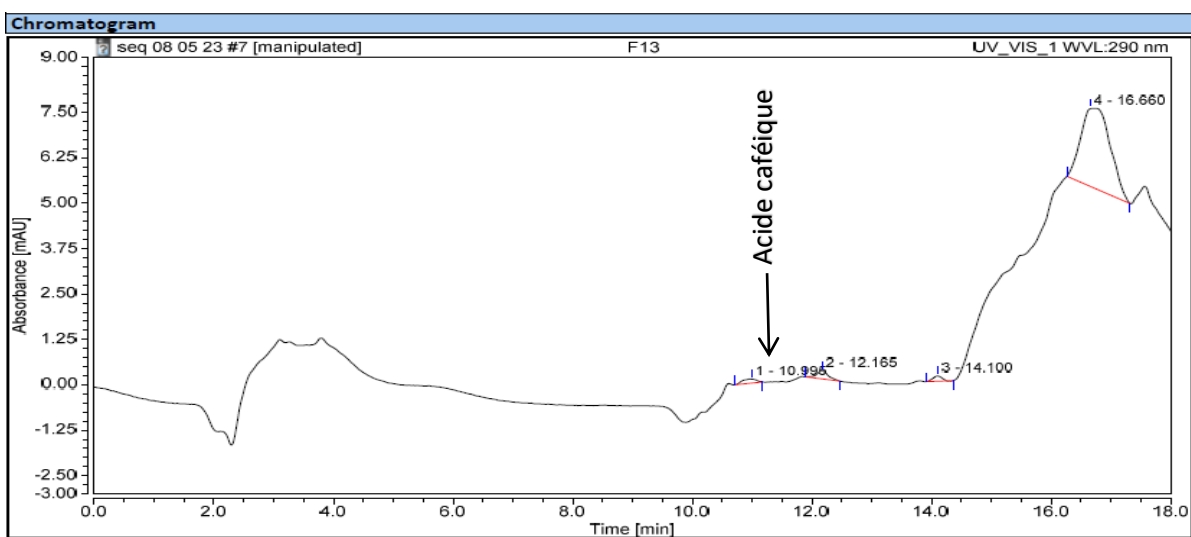


Figure VII.10. Chromatogramme de F13

2. Analyse par la spectrophotométrie d'absorption UV-visible

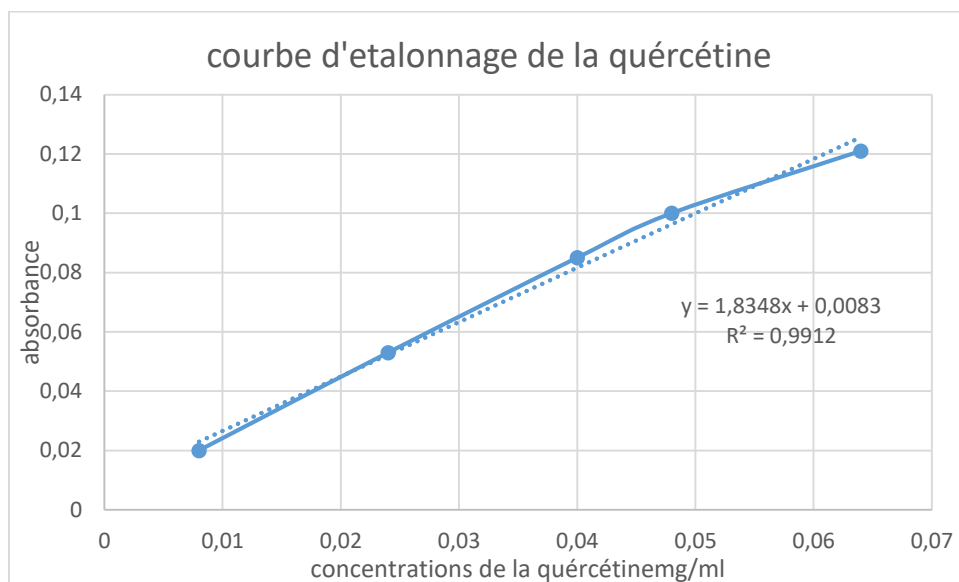


Figure VII.11. Courbe d'étalonnage de la quercétine

3. Analyse par spectroscopie infrarouge IR

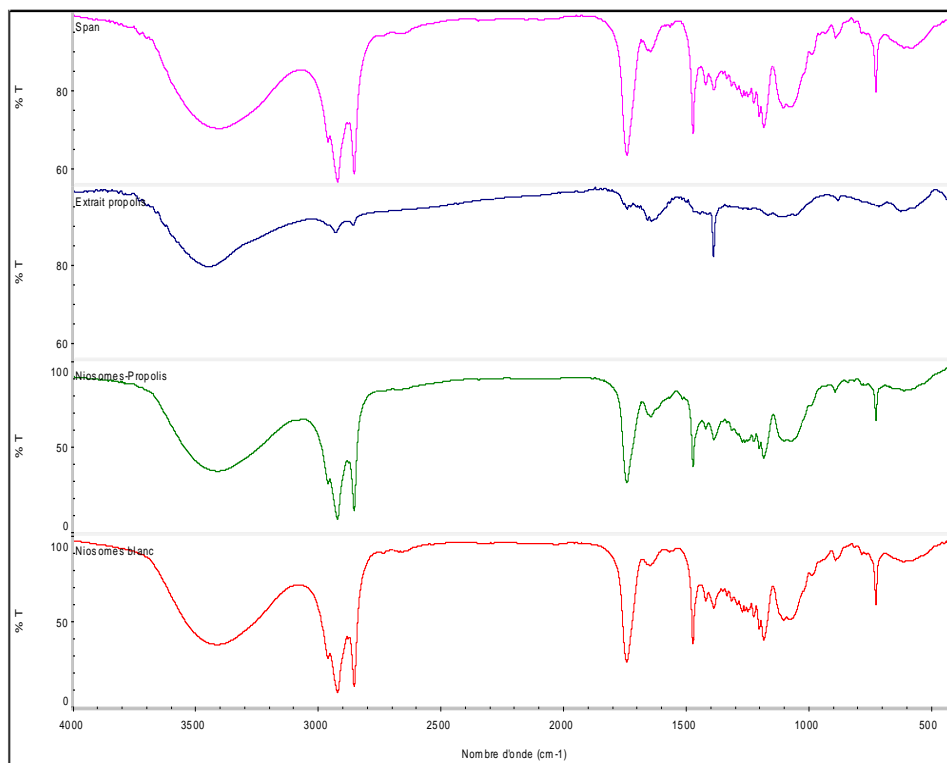


Figure VII.12. Analyse spectrale FTIR de : Niosome blanc, extrait de propolis, propolis-Niosome

4. Analyse par la diffraction des rayons X

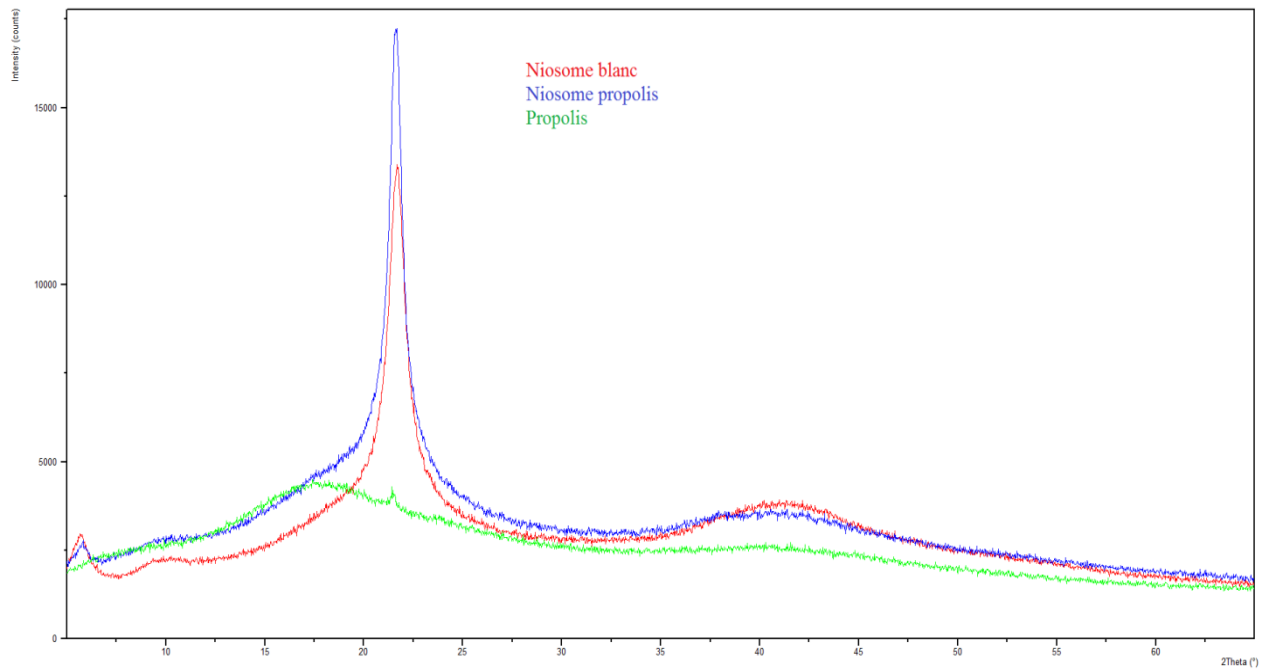


Figure VII.13. Analyse par diffraction des rayons X

5. Test de motilité des spermatozoïdes

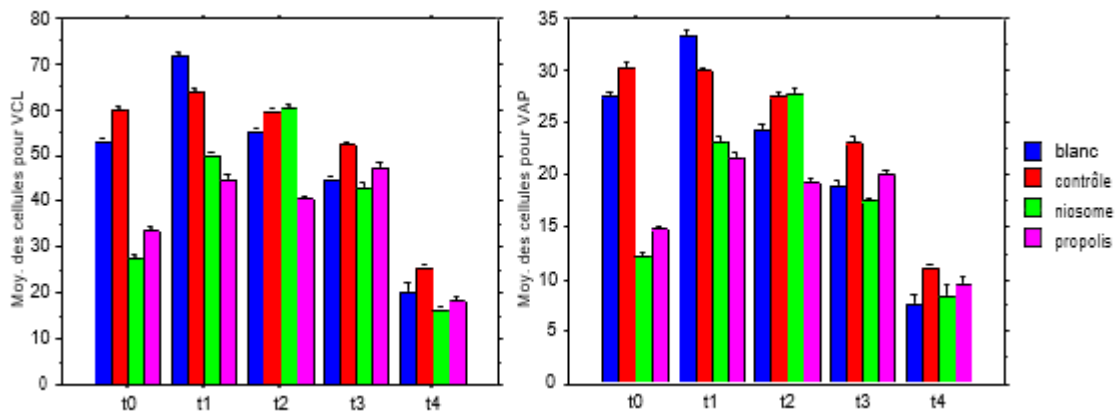


Figure VII.14. Diagramme de la vitesse curviligne (VCL), et la vitesse moyenne de la trajectoire(VAP) de la cryoconservation des spermatozoïdes en fonction du temps éclaté par le traitement.

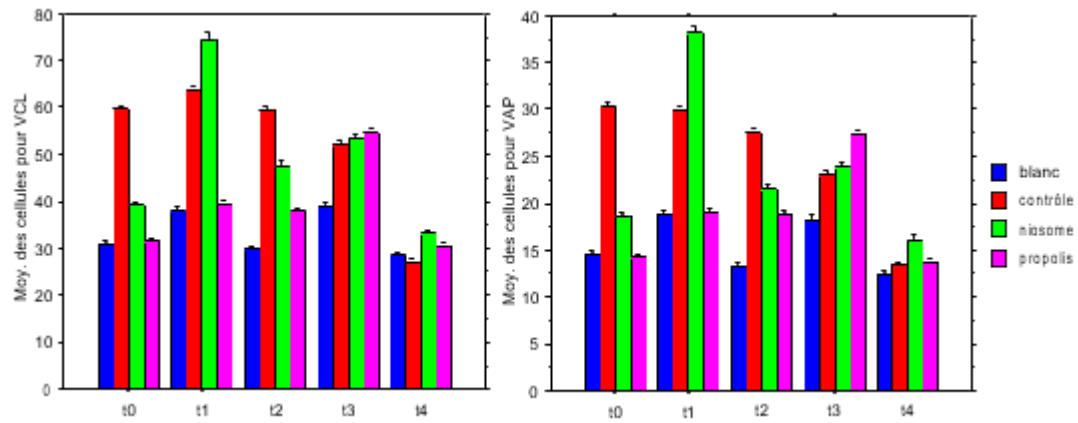


Figure VII.15. Diagramme de la vitesse la vitesse curviligne (VCL) et la vitesse moyenne de la trajectoire VAP de la cryoconservation des spermatozoïdes en fonction de temps écarté par le traitement après dilution

La propolis est une substance résineuse collectée par les abeilles à partir des plantes, elle est utilisée à l'intérieur de la ruche pour protéger leur colonie, du fait de leur propriétés biologiques.

L'objectif de ce travail est de réaliser l'encapsulation de l'extrait de propolis pour améliorer sa solubilité dans les milieux aqueux et d'étudier par la suite son effet sur la conservation du sperme.

Pour cela nous avons préparé, et caractérisé les niosomes, les solutions niosomales obtenues par la diffraction des rayons X (DRX), par la spectroscopie infrarouge IR, par une analyse d'absorption UV-visible, HPLC et en dernier un test de motilité spermatique a été évalué.

Au final nous avons obtenu les résultats suivants :

- Une solution niosomale optimale dont la taille de 145 nm et un taux d'encapsulation de 61.88 % en utilisant les conditions optimales suivantes :
 - 20 mg/ml de Span 60
 - 10 mg/ml de propolis
 - 10 ml d'éthanol
 - 20 ml d'eau distillée
- Les résultats obtenus montrent que nous avons pu améliorer la solubilité de l'extrait de propolis par la préparation des suspensions niosomales, et d'une autre part la conservation des spermatozoïdes a été aussi amélioré.

Mots clés : propolis, encapsulation, flavonoïdes, niosomes, spermatozoïdes.

Abstract

Propolis is a resinous substance collected by bees from plants. It is used inside the hive to protect their colony, due to its biological properties.

The aim of this work was to encapsulate propolis extract to improve its solubility in aqueous media and then study its effect on sperm preservation. To do this, we prepared and characterized the niosomes, the niosomal solutions obtained by X-ray diffraction (XRD), infrared IR spectroscopy, UV-visible absorption analysis, HPLC and finally a sperm motility test was evaluated.

In the end, we obtained the following results:

- An optimal niosomal solution with a size of 145 nm and an encapsulation rate of 61.88% using the following optimal conditions: 20 mg/ml Span 60, 10 mg/ml propolis, 10 ml ethanol, and 20 ml distilled water
- The results obtained show that we were able to improve the solubility of the propolis extract by preparing niosomal suspensions, and also improve sperm conservation.

Keywords: propolis, encapsulation, flavonoids, niosomes, spermatozoa.