

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE A. Mira DE BEJAIA



Faculté de Technologie

Département de Génie des procédés

Laboratoire génie pharmaceutique

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master

Domaine : Science et Technologie Filière : Génie des Procédés

Spécialité : Génie pharmaceutique

Thème

Optimisation, caractérisation et formulation d'un système niosomale d'un composé monoterpénique et évaluation de ses effets biologiques

Présenté par

M^{lle} MANSOURI Romaïssa

M^{lle} MEKRI Melissa

Soutenue le : 30/06/2025

Devant le jury composé de :

Nom et prénom	Grade	Affiliation	Qualité
M^r TIGHZERT Hamid	MCA	Université de Béjaïa	Président
M^r KHIREDINE Hafit	Professeur	Université de Béjaïa	Examineur
M^r FATMI Sofiane	Professeur	Université de Béjaïa	Encadrant
M^{lle} LEZRAG Hayet Ahlem	Doctorante	Université de Béjaïa	Co- Encadrante

Année Universitaire : 2024/2025

Remerciements

Avant tout propos, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude au **Bon Dieu Tout-Puissant**, qui nous a guidés et nous a donné la force, la volonté et le courage nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous exprimons ensuite nos plus sincères remerciements à **Monsieur Fatmi Sofiane**, notre encadrant, pour son accompagnement rigoureux, ses conseils éclairés, sa disponibilité et sa bienveillance tout au long de ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent également à **Mademoiselle Lezrag Hayet Ahlem**, notre co-encadrante, pour son appui constant, son encadrement de qualité et sa précieuse contribution à l'évolution de ce travail.

Nous remercions chaleureusement les membres du jury, **Monsieur Tighzert Hamid** et **Monsieur Khireddine Hafit**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour leurs remarques enrichissantes.

Nos remerciements vont aussi à tous les enseignants et responsables de la **Faculté des Sciences et Technologies de Béjaïa**, en particulier au **département de Génie des Procédés** et aux **ingénieurs de son laboratoire**, pour leurs efforts continus et la qualité exceptionnelle de la formation qu'ils nous ont dispensée tout au long de notre cursus universitaire.

Enfin, nous tenons à exprimer notre reconnaissance à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. **Nos familles respectives** et **nos amis** méritent une mention spéciale pour leur amour, leur affection, leur soutien indéfectible, et l'énergie positive qu'ils n'ont cessé de nous insuffler.

Dédicace-Melissa

À ceux qui sont chers, ceux à qui je dois mon succès :

À notre « Seigneur, Dieu tout puissant », merci de m'avoir donné la vie, la foi, les prières exaucées pour m'y arriver.

À mes chers parents, merci pour votre amour inconditionnel, vos sacrifices silencieux, votre patience infinie et votre soutien constant, vous êtes ma grande fierté et ma plus belle force.

À mes chers témoins des étapes de ma vie, dans mon succès, joie, tristesse, mes meilleures sœurs et mes meilleurs frères ; Yasmine, Maria, Amine, Mohamed et Mehdi je n'oublierai jamais vos encouragements permanents et soutiens moraux, votre présence dans ma vie est un trésor précieux.

À mes chères amies en écrivant ces lignes merci pour l'énergie positive que vous apportez dans mon existence.

À ma binôme Romaïssa, merci d'être la meilleure version de toi-même, ta contribution a été essentielle à cette réussite.

À toute personne formidable que je connaisse, que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux allégués, et le fruit de votre soutien infaillible.

Enfin, je dédie ce travail à moi-même, c'est le temps d'y être !

Dédicace-Romaissa

À la mémoire de mon cher père,

Ton absence m'a profondément marqué, mais ton souvenir, ton courage et tes valeurs continuent de me guider chaque jour. Ce travail est aussi un hommage à ce que tu m'as transmis.

À ma mère,

Pour son amour infini, sa patience, ses sacrifices et son soutien indéfectible. Tu es ma force et ma lumière.

À mon frère Aissa,

Merci pour ta présence rassurante et ton encouragement constant tout au long de ce parcours.

À ma cousine Biba,

Que je considère comme ma grande sœur, merci pour ton amour, ton écoute et ton soutien inestimable tout au long de ce parcours.

À ma copine Djida,

Merci pour ton amour, ta patience et ton soutien constant, qui m'ont beaucoup aidé à avancer.

À ma binôme Mélissa,

Merci pour ton aide précieuse et ta belle collaboration tout au long de ce travail.

Je dédie également ce travail à la mémoire de mon Grand-père Ismail qui m'a toujours soutenu tout au long de mes années d'étude, que dieu le garde dans son vaste paradis, à mes grands-parents (Mustapha, Fatima et Nedjima), à tous les membres de ma famille (oncles, tantes, cousins et cousines) et à tous ceux qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERE

Introduction générale.....	1
1 Huiles essentielles et composés monoterpéniques.....	4
1.1 Introduction	4
1.2 Définition.....	4
1.3 Répartition botanique et localisation des huiles essentielles	5
1.4 La composition chimique de l'huile essentielle	5
1.5 Les composés terpéniques	5
1.5.1 Les monoterpènes (voir la figure.2)	6
1.5.2 Les sesquiterpènes.....	7
1.5.3 Les composés aromatiques.....	7
1.6 Domaine d'utilisation des huiles essentielles	8
1.6.1 Parfumerie et cosmétique	8
1.6.2 Pharmacie	9
1.7 Etude de cas : le romarin et l'armoise	9
1.7.1 Le Romarin (<i>Rosmarinus Officinalis</i>).....	10
1.7.2 L'armoise blanche (<i>Artemisia herba-alba</i>).....	14
2 L'encapsulation.....	21
2.1 Introduction	21
2.2 Définition de l'encapsulation.....	21
2.3 Objectifs de l'encapsulation	21
2.4 Différents types d'encapsulation	22
2.4.1 La micro-encapsulation	22
2.4.2 La nano-encapsulation.....	22
2.5 Les différents procédés d'encapsulation.....	23
2.5.1 Les procédés physico-chimiques :.....	23
2.5.2 Les procédés chimiques :	24
2.5.3 Les procédés mécaniques :	24
2.6 Les différents agents d'encapsulation.....	24
2.6.1 Les vecteurs particuliers	24
2.6.2 Agents de support à base de polysaccharides.....	25
2.6.3 Agents à base de protéines	25

2.7	Les applications de l'encapsulation.....	25
2.8	Conclusion	27
3	Aspect général des niosomes	29
3.1	Introduction	29
3.2	Les niosomes	29
3.2.1	Définition	29
3.2.2	L'origine.....	30
3.2.3	Structure de niosomes	30
3.2.4	Composants de niosomes	31
3.3	Type de niosomes	33
3.3.1	Petites vésicules uni-lamellaires (SUV : smal uni-lamellar vesicle).....	33
3.3.2	Large uni-lamellaires vésicules (LUV : large uni-lamellar vesicle)	34
3.3.3	Vésicules multi-lamellaires (MLV : Multilamellar vesicle)	34
3.4	Différence entre liposome et niosome :	34
3.5	Processus de préparation	35
3.5.1	Méthodes de préparation	35
3.6	Facteurs influençant la formulation niosomale	41
3.7	Caractérisation de niosome.....	43
3.8	Voies d'administration de niosomes.....	45
3.9	Application	46
3.10	Avantages des niosomes	46
3.11	Inconvénients des niosomes	47
3.12	Conclusion	47
3.13	Travaux antérieurs	48
4	Matériels et méthodes	54
4.1	Introduction	54
4.2	Produits chimiques et matériels de préparation	54
4.2.1	Produits chimiques	54
4.2.2	Matériels de préparation.....	56
4.2.3	Matériel de caractérisation	59
4.3	Méthodes	62
4.3.2	Méthodes de caractérisation	64
4.3.3	Les Tests.....	66

4.3.4	Test biologique	67
5	Résultats et discussions.....	70
5.1	Préparation des formulations niosomales	70
5.1.1	Le camphre	70
5.1.2	Le cineole	78
5.2	Caractérisation de la formulation optimale (niosome-cineole)	86
5.2.1	Analyse thermogravimétrique (ATG)	86
5.2.2	Analyse calorimétrie différentielle à balayage (DSC)	87
5.3	Activité antioxydante par la méthode DPPH (niosome-camphre et niosome-cineole) 88	
5.3.1	Le camphre	88
5.3.2	Le cineole	89
5.4	Test de conservation spermatique (niosome-camphre et niosome-cineole).....	90
5.4.1	Le camphre	90
5.4.2	Le cineole	93
	Conclusion générale.....	97
	Références bibliographiques.....	98
	Résumé	107

Liste des abréviations

1, 8-Cinéole: Eucalyptol

A. absinthium: Artemisia absinthium

A. herba-alba: Artemisia herba-alba

AChE: Acétylcholinestérase

ANOVA: Analyse de la variance

AT: Agent Tenseur

ATG: Analyse ThermoGravimétrique

BOR: Bornéol

BSA: Bovine Serum Albumin

C. camphora: Cinnamomum camphora

C₁₀H₁₆: Monoterpène (formule brute)

CAMP: Camphre

CHOL: Cholestérol

CMC: Concentration Micellaire Critique

DPPH: 2, 2-Diphényl-1-picrylhydrazyle

DSC: Differential Scanning Calorimetry

EUG: Eugénol

EtOH: Éthanol

HE: Huile Essentielle

HLB: Hydrophilic-Lipophilic Balance

IC₅₀: Concentration Inhibitrice à 50 %

LIM: Limonene

M. piperita: Mentha piperita

MLV: Multilamellar Vesicle

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B

Nrf2: Nuclear factor erythroid 2–related factor 2

PA: Principe Actif

PBS: Phosphate Buffered Saline

Pluronics: Copolymères en bloc (triblocs)

R. officinalis: Rosmarinus officinalis

ROS: Reactive Oxygen Species

R²: Coefficient de détermination

SUV: Small Unilamellar Vesicle

T. vulgaris: Thymus vulgaris

THU: Thuyone

Tween 60/80: Polyoxyéthylène sorbitan monoesters

UV-Vis: Ultraviolet-visible

Mg: Milligramme

μ L: Microlitre

μ g: Microgramme

μ m: Micromètre

α -Pinène: Alpha-pinène

β -Pinène: Bêta-pinène

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Structure chimique des terpénoïdes.....	6
Figure 2 Structures chimiques des monoterpènes.....	7
Figure 3 Aspect général, feuilles et inflorescences de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	11
Figure 4 Structure du 1,8 cinéole.....	11
Figure 5 Aspect général, feuilles et inflorescences d' <i>Artemisia herba alba</i> Asso.	15
Figure 6 Structure du camphre.	16
Figure 7 Le camphre.	16
Figure 8 Différentes formes de nanoparticules.....	23
Figure 9 Les différents procédés d'encapsulation.	24
Figure 10 Structure de niosome.....	31
Figure 11 Placement du cholestérol dans la bicouche des niosomes.....	33
Figure 12 Structures et tailles de différentes vésicules niosomales.....	34
Figure 13 Technique d'injection d'éther.	35
Figure 14 Technique d'injection de lipides.	36
Figure 15 Schéma illustratif de la technique des bulles.....	36
Figure 16 Schéma illustratif de la technique d'évaporation en phase inverse.....	37
Figure 17 Schéma illustratif de la technique de sonication.	37
Figure 18 Schéma illustratif de la technique d'hydratation en couche mince.	38
Figure 19 Schéma illustratif de la technique de micro fluidisation.	39
Figure 20 Schéma présentatif de la dialyse.	40
Figure 21 Schéma présentatif de la technique de la filtration sur gel.....	40
Figure 22 Schéma représentatif de la centrifugation.	41
Figure 23 Évaporateur rotatif de type « IKA HB digital » et ses différents composants.	59
Figure 24 Description de l'étape de la lecture par spectrophotomètre.	63
Figure 25 Solution niosomale après séparation.	64
Figure 26 Schéma illustratif de la méthode d'évaluation de l'efficacité d'encapsulation d'un composé actif dans des niosomes.	65
Figure 27 Solution DPPH.....	66
Figure 28 Étapes du test spermatique.....	68
Figure 29 Courbe d'étalonnage du camphre.....	70
Figure 30 Facteurs statistiques explicatifs du modèle du plan d'expérience 'niosomes de camphre'.	73
Figure 31 Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la taille des niosomes.	74
Figure 32 Histogramme représente l'influence des facteurs sur le taux d'encapsulation.....	75
Figure 33 Suspension niosomale	76
Figure 34 Taille des niosomes formés (optimum Camphre et placebo) évaluée à l'aide d'un microscope optique.....	77
Figure 35 Courbe d'étalonnage du cineole.....	78
Figure 36 Facteurs statistiques du plan d'expérience pour le cineole.	81
Figure 37 représente l'influence des facteurs sur la taille des niosomes.	82
Figure 38 Histogramme représente l'influence des facteurs sur le taux d'encapsulation.....	83
Figure 39 Suspension niosomale	84
Figure 40 Taille des niosomes formés (optimum Cineole) évaluée à l'aide d'un microscope optique.....	85
Figure 41 Analyse thermogravimétrique du cineole pur et de sa formulation niosomale.	86

Figure 42 Analyse calorimétrique différentielle (DSC) comparé du cineole pur et de sa formulation niosomale.	87
Figure 43 Diagramme de l'activité antioxydante du cineole.	88
Figure 44 Diagramme de l'activité antioxydante du cineole.	89
Figure 45 . Évaluation de la cytotoxicité du camphre et des niosomes chargés en camphre à différentes concentrations.	90
Figure 46 Impact de la cryopréservation du camphre et des niosomes chargés en camphre à différentes concentrations.	91
Figure 47 Évaluation de la cytotoxicité du cineole et des niosomes chargés en cineole à différentes concentrations.	93
Figure 48 impact de la cryopréservation du cineole et des niosomes chargés en cineole à différentes concentrations.	94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Applications de la micro encapsulation dans différents domaines industriels	26
Tableau 2 Exemples de surfactants utilisés dans la préparation des niosomes	32
Tableau 3 Niosome VS Liposome.	35
Tableau 4 Effet de l'hydrophilie et de la lipophilie du surfactant sur le niosome	42
Tableau 5 Voie d'application des médicaments à base de niosomes	46
Tableau 6 Travaux antérieurs.	48
Tableau 7 Les produits chimiques utilisés dans la préparation	54
Tableau 8 Récapitulatif de la verrerie utilisée dans la préparation	56
Tableau 9 La verrerie et les matières consommables utilisées pour la caractérisation	60
Tableau 10 Matrice d'essais	62
Tableau 11 Résultats expérimentaux de la matrice (Camphre).	71
Tableau 12 Présentation des valeurs de l'analyse statistiques.....	73
Tableau 13 Les conditions optimales des tailles des niosomes et le taux d'encapsulations.	76
Tableau 14 Résultats expérimentaux de la matrice (cineole).	79
Tableau 15 Présentation des valeurs de l'analyse statistiques.....	81
Tableau 16 Les conditions optimales des tailles des niosomes et le taux d'encapsulations.	84

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

Les huiles essentielles sont des composés naturels, volatils et complexes, dotés d'une odeur intense et produits par les plantes aromatiques en tant que métabolites secondaires. Les huiles essentielles ont été couramment employées en recherche pharmaceutique et cosmétique en raison de leur richesse en bioactifs, notamment les monoterpènes comme le camphre et le cineole. Ces molécules présentes en abondance dans les plantes telles que l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) et le romarin (*Rosmarinus officinalis*), exhibent plusieurs propriétés biologiques : activités antimicrobiennes, anti-inflammatoires, et antioxydante [1].

Le camphre et le cineole principaux monoterpènes de l'armoise blanche et du romarin respectivement, ils présentent des effets bénéfiques notables. Toutefois, leur efficacité thérapeutique et leur biodisponibilité sont limitées par leur instabilité chimique, leur faible solubilité dans l'eau et leur volatilité [2, 3].

Pour contourner ces obstacles, l'encapsulation des composés actifs dans des systèmes nanovectorisés émerge comme une solution prometteuse. Parmi ces dispositifs, les niosomes représentent une catégorie innovante de vecteurs médicamenteux formulés à partir de tensioactifs non ioniques nanométriques, grâce à leurs caractéristiques appréciées telles que la stabilité, la solubilité, la pénétration, le ciblage et la libération prolongée de leur contenu. Ainsi, les niosomes peuvent servir à délivrer divers extraits naturels pour optimiser leurs avantages thérapeutiques, leurs caractéristiques pharmacologiques et leurs profils physico-chimiques [4].

Cette stratégie d'encapsulation pose donc une question fondamentale : **« comment les niosomes peuvent-ils surmonter les limites d'instabilité et de biodisponibilité du camphre et du cineole, tout en préservant ou amplifiant leurs activités biologiques en atouts thérapeutiques ? »** Ce mémoire étudie l'encapsulation du camphre et du cineole dans des niosomes, en examinant les avantages possibles et les processus impliqués dans l'encapsulation des principaux composés de l'armoise blanche et du romarin.

Dans le premier chapitre, est consacré aux huiles essentielles et à leurs composés monoterpéniques. Il présente leur origine, leur composition chimique, leurs propriétés biologiques ainsi que leurs applications, en mettant l'accent sur deux composés majeurs : le camphre et le 1,8-cineole, sélectionnés pour leur intérêt thérapeutique mais aussi pour leurs limites en termes de stabilité et de biodisponibilité.

Le deuxième chapitre traite des principes de l'encapsulation, en expliquant son rôle dans la protection et l'amélioration de l'efficacité des substances bioactives.

Le troisième chapitre s'intéresse spécifiquement aux niosomes, un système d'encapsulation nanométrique prometteur, ainsi les fondements nécessaires à la formulation et à l'évaluation des systèmes niosomaux utilisés dans ce travail.

le quatrième chapitre, se concentre sur les matériels et méthodes comportant les différents matériels et appareillages utilisés dans l'élaboration de ce mémoire, les courbes d'étalonnage pour le camphre et le cinéole, ainsi que divers tests tels que les tests DPPH et la caractérisation par ATG et le test spermatique. Enfin, le dernier chapitre sera dédié à la discussion des résultats obtenus au cours de cette recherche.

CHAPITRE 1

HUILES ESSENTIELLES ET COMPOSES MONOTERPENIQUES

1 Huiles essentielles et composés monoterpéniques

1.1 Introduction

Les huiles essentielles ont été utilisées depuis des millénaires pour leurs bienfaits aromatiques, médicaux et thérapeutiques. Ces extraits concentrés de plantes capturent l'essence volatile de diverses parties végétales, telles que les feuilles, les fleurs, les tiges et les racines. Parmi les constituants chimiques qui confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés distinctes, les composés monoterpéniques jouent un rôle crucial. Dans ce chapitre, intitulé Les huiles essentielles et composés monoterpéniques, nous étudierons minutieusement ces substances captivantes, en évoquant leurs définitions, leurs propriétés, leur composition chimique et les différents champs d'application.

1.2 Définition

L'expression « huile essentielle » a ses origines au XVI^e siècle et trouve sa racine dans le remède *Quinta essentia*, nommé par Paracelsus von Hohenheim (Suisse). On appelle « essences » ou huiles essentielles ainsi en raison de leur caractère inflammable. Plusieurs écrivains ont essayé de définir ce que sont les huiles essentielles. Selon l'Agence française de normalisation, également connue sous le nom d'AFNOR, voici la définition qu'elle propose (NF T 75-006) : « L'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par distillation à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de *Citrus*, ou distillation » sèche". L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des moyens physiques [5].

Les huiles essentielles (HE) constituent des compositions hautement complexes de composés volatils, bio synthétisées par les végétaux pour remplir diverses fonctions écologiques comme l'action de substances défensives contre les organismes microscopiques et les herbivores. Depuis l'époque antique, les huiles essentielles sont employées dans la médecine traditionnelle en raison de leurs diverses vertus, y compris leurs actions spasmolytiques, anti-inflammatoires, anti oxydantes et antimicrobiennes. De surcroît, grâce à leur parfum et/ou goût habituellement plaisants, de nombreuses huiles essentielles sont actuellement demandées en grandes quantités par divers secteurs tels que l'industrie cosmétique, la parfumerie, la pharmacie et l'alimentation [6].

1.3 Répartition botanique et localisation des huiles essentielles

L'huile essentielle représente l'excrétion naturelle de la plante. Elle est produite par ses glandes sécrétrices situées dans divers segments des végétaux et arbres aromatiques. Il peut s'agir de petites cellules épidermiques présentes dans les pétales de rose ou de poils glandulaires situés aux bords des calices floraux, des feuilles et des tiges chez les plantes à lèvres (Thymus, Eucalyptus), ou de grandes cellules organisées à l'intérieur même des tissus végétaux : Tiges, écorces, racines, feuilles et graines [7].

1.4 La composition chimique de l'huile essentielle

La composition chimique des huiles essentielles est complexe et peut fluctuer en fonction de l'organe, des conditions climatiques, de la qualité du sol, de l'organe spécifique examiné, des méthodes agricoles utilisées et du procédé d'extraction employé [8].

D'un point de vue chimique, les huiles essentielles sont des combinaisons extrêmement complexes. Selon leur voie de biosynthèse, ils se divisent en deux groupes : les terpénoïdes (composés terpéniques) et les phénylpropanoïdes [9].

1.5 Les composés terpéniques

Les terpènes, ainsi que leurs dérivés oxygénés, constituent une catégorie d'hydrocarbures que l'on retrouve abondamment dans les plantes, les micro-organismes, les êtres marins, les champignons et les insectes. On trouve une grande variété de composés terpéniques et leurs isomères se manifestent de différentes façons. On peut les classer en monoterpènes comme le limonène, sesquiterpènes tel que l'élémane, diterpènes par exemple, le camphène et polyterpènes (**voir figure 1**). La majorité de ces composés de type terpène présentent une forte lipophile. Ils sont dissous dans les solvants organiques et renferment des atomes de carbone asymétriques présentant des rotations optiques. Les terpènes de petite masse moléculaire, comme les monoterpènes et les sesquiterpènes, sont des fluides volatils et huileux ; leur température d'ébullition s'accroît proportionnellement à la masse moléculaire et au nombre de doubles liaisons [10].

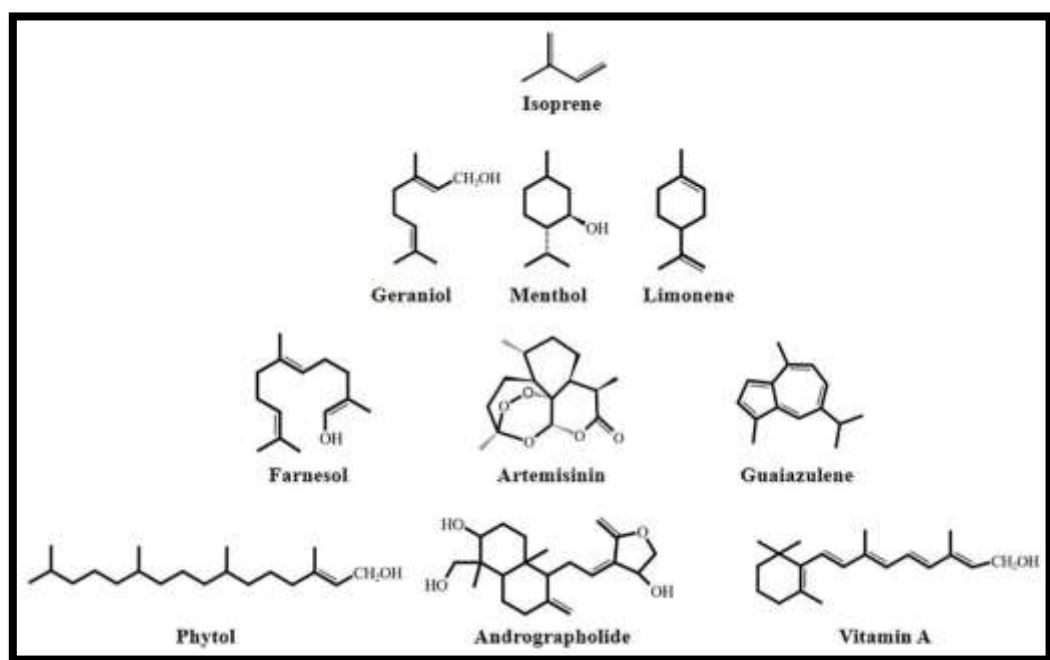


Figure 1 Structure chimique des terpénoïdes.

1.5.1 Les monoterpènes (voir la figure.2)

Dans les huiles essentielles, on trouve principalement des monoterpènes et des sesquiterpènes parmi les différents composés. Les dimères d'isoprène, composés d'atomes de carbone et d'hydrogène ($C_{10}H_{16}$), sont appelés monoterpènes. Ils incluent des composés tels que l' α -pinène, le limonène, le camphène, le myrcène et le p-cymène [11].

Les monoterpènes sont des composés dérivés du terpène isoprène. De nombreuses familles de plantes, y compris la famille des Lamiacées, synthétisent des composés en réaction à des stress biotiques et abiotiques, ce qui est à l'origine de l'arôme caractéristique des plantes [12].

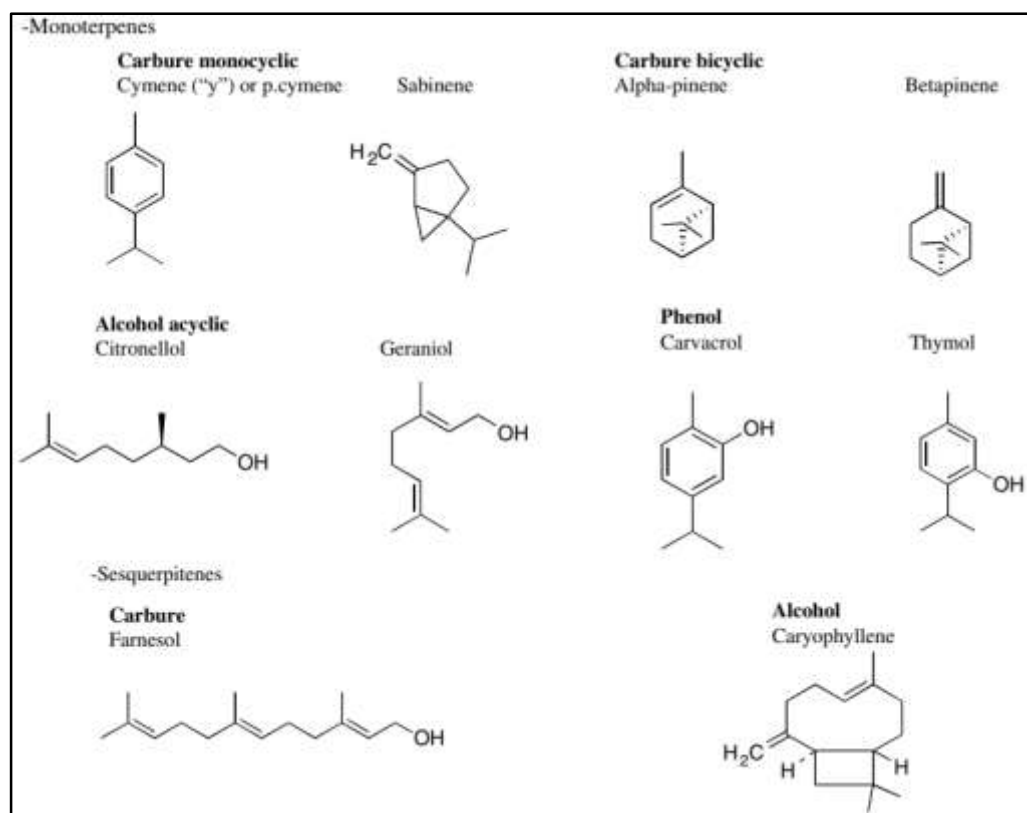


Figure 2 Structures chimiques des monoterpènes

1.5.2 Les sesquiterpènes

Depuis l'extraction du cadinène et du caryophyllène par Wallach à la fin du 19e siècle, le nombre de molécules sesquiterpéniques connues a continuellement augmenté. C'est la catégorie de terpènes la plus variée, comptant plus de 10 000 molécules identifiées à ce jour. Il s'agit de dérivés du 2, 6, 10-triméthyl dodécane ou farnésane, qui présentent une grande diversité de structures squelettiques [13].

1.5.3 Les composés aromatiques

Les composés aromatiques, qui sont dérivés du phénylpropane, se présentent moins fréquemment que les terpènes. Les mécanismes de biosynthèse relatifs aux dérivés du phénylpropane.

Dans les plantes, ces substances sont habituellement distinctes, mais elles peuvent coexister dans certains cas, avec une voie principale qui prédomine (comme l'huile de cannelle où le

CHAPITRE 1 : HUILES ESSENTIELLES ET COMPOSES MONOTERPENIQUES

cinnamaldéhyde et l'eugénol sont présents en majorités respectives et mineure, ou encore l'huile de clou de girofle, le fenouil, etc.)

On entend par composés aromatiques :

- Aldéhyde : cinnamaldéhyde
- Alcool : alcool cinnamique
- Phénols : chavicol, eugénol
- Dérives méthoxy : anéthole, élémicine, estragole, méthyleugénols
- Composés méthylène dioxy : apiole, myristicine, safrole

Les principales plantes sources de ces composés incluent l'anis, la cannelle, le clou de girofle, le fenouil, la muscade, le persil, le sassafras, l'anis étoilé et l'estragon. De plus, certaines familles botaniques comme les Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae et Rutaceae sont également concernées. Les métabolites secondaires de diverses plantes ou produits issus de la torréfaction, grillade ou rôtissage incluent des composés azotés et soufrés tels que les glucosinolates ou les dérivés isothiocyanates (huiles d'ail et de moutarde) [5].

1.6 Domaine d'utilisation des huiles essentielles

On utilise les huiles essentielles dans plusieurs secteurs, principalement ceux des cosmétiques et des parfums, mais aussi dans les domaines alimentaires et pharmaceutiques ainsi que dans l'industrie agroalimentaire [14].

Grâce à leurs multiples caractéristiques, les huiles essentielles ont acquis une grande importance économique et le marché qui leur est consacré ne cesse de s'accroître [15].

1.6.1 Parfumerie et cosmétique

Les caractéristiques olfactives des huiles essentielles leur confèrent une grande utilisation dans l'industrie de la parfumerie et du cosmétique. Elles constituent approximativement 60% des matières premières pour les industries du parfum synthétique, de la parfumerie, des savons et des cosmétiques.

Dans le domaine de la cosmétologie et des produits d'hygiène, on note l'utilisation d'huiles essentielles dans les formulations dermo-pharmaceutiques, souvent décrites comme « apaisantes » ou « relaxantes ». Elles sont couramment présentes dans les rouges à lèvres, shampoings et dentifrices. Les huiles essentielles de lavande, citron et citronnelle sont particulièrement populaires. Il convient de noter qu'une adsorption cutanée des composants terpéniques est possible [16].

1.6.2 Pharmacie

Le secteur pharmaceutique exploite les huiles essentielles dans le cadre des antiseptiques externes, profitant des caractéristiques bactériostatiques, bactéricides, antifongiques et protectrices des essences naturelles.

Les huiles essentielles sont au cœur d'une approche spécifique de bien-être : l'aromathérapie. Elles sont très prisées en pharmacie et sont employées dans les préparations galéniques, ainsi que pour la confection d'infusions (verveine, thym, menthe, mélisse, fleurs d'oranger, etc.). Cependant, il est important de noter que la plupart des composants de ces derniers sont lipophiles et sont donc rapidement absorbés, que ce soit par inhalation, par la peau ou par ingestion.

Elles sont aussi exploitées pour l'extraction d'huiles essentielles à des fins thérapeutiques, notamment dans le secteur des antiseptiques externes.

Plus de 40% des médicaments sont fabriqués à partir d'ingrédients actifs dérivés de plantes. Un grand nombre d'huiles essentielles sont présentes dans la composition de diverses spécialités pharmaceutiques : sirop, goutte, gélules, pommade, etc [16].

1.7 Etude de cas : le romarin et l'armoise

Les plantes aromatiques, telles que le romarin (*Rosmarinus officinalis*) et l'armoise (*Artemisia absinthium*), ont depuis longtemps été prisées pour leurs propriétés médicinales et aromatiques. Ces plantes renferment une multitude de composés bioactifs, dont certains présentent des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes. Grâce aux avancées technologiques, l'encapsulation des composés bioactifs extraits de ces plantes est devenue une méthode prometteuse pour préserver et améliorer leurs effets bénéfiques.

Dans cette partie théorique, nous explorerons les principales caractéristiques du romarin et de l'armoise, en mettant l'accent sur leurs composés bioactifs, ainsi que leurs applications potentielles dans les domaines pharmaceutique, alimentaire et cosmétique.

1.7.1 Le Romarin (*Rosmarinus Officinalis*)

Rosmarinus officinalis L., souvent désigné sous le nom de romarin, est une plante aromatique de la famille des Lamiacées. Elle possède des feuilles en forme d'aiguilles et est cultivée à travers le monde [17]. Elle est également connue sous les synonymes : *Salvia Rosmarinus* Schleid. Et *Rosmarinus angustifolius* Mill [18].

Le romarin possède des vertus curatives et a été employé dans la médecine traditionnelle comme remède interne pour atténuer les coliques néphrétiques, la dysménorrhée et les crampes musculaires. Le romarin possède des propriétés antifongiques, antivirales, antibactériennes, anti-inflammatoires, antitumorales, antithrombotiques, antinociceptives, antidépressives, antiulcérogènes et anti oxydantes. On a identifié de multiples usages thérapeutiques de *R.officinalis*, parmi lesquels le traitement des désordres en lien avec les systèmes nerveux, cardiovasculaire, gastro-intestinal, génito-urinaire, menstruel, hépatique et reproducteur ainsi que les problèmes respiratoires et dermatologiques. Grâce à ses multiples caractéristiques, le romarin a également trouvé une vaste application dans les secteurs de l'alimentation et du cosmétique [17].

1.7.1.1 Répartition botanique

Rosmarinus officinalis L, fait partie de la famille des Lamiacées, qui était auparavant connue sous le nom de Labiate. Connue sous le nom de Rosemary (anglais). IL s'agit d'une plante arbustive provenant de la région méditerranéenne ; elle peut atteindre une hauteur de 2 mètres et possède des feuilles persistantes vertes. *R.officinalis* présente des rameaux verticaux bruns, rarement prostrés, dotés de feuilles linéaires brillantes d'un vert sombre. Ses fleurs, de taille réduite, se présentent en verticilles axillaires pauciflore avec une corolle qui tend vers le blanc et le rose. L'androcée est créé par deux étamines latérales bien visibles, et les filaments présentent une petite dent sur le côté. Cette plante se développe dans un sol soit sec, soit modérément humide, ne supporte pas les sols anaérobies ou gorgés d'eau et tolère légèrement la salinité. Elle fleurit généralement entre mai et juin dans un climat de type méditerranéen, la fructification a lieu entre le printemps et l'été [18].



Figure 3 Aspect général, feuilles et inflorescences de *Rosmarinus officinalis* L.

1.7.1.2 Principaux composants

L'huile essentielle de romarin est composée principalement de camphre (5,0-21 %), de 1,8-cinéole (15-55 %), d' α -pinène (9,0-26 %), de bornéol (1,5-5,0 %), de camphène (2,5-12 %) et de β -pinène (2,0-9,0 %), ainsi que de limonène (1,5-5,0 %). Ces composantes varient selon la phase végétative et les conditions bioclimatiques [19].

Dans ce travail, nous exploiterons le composé majoritaire de l'HE de romarin qui est le 1,8 cinéole.

1.7.1.2.1 Le 1,8 cinéole définition

Le 1,8-cinéole, autrefois connu sous le nom d'« eucalyptol », est un composé organique naturel et incolore. D'un point de vue chimique, il appartient à la catégorie des oxydes terpéniques, où il se positionne comme le membre majeur. Il s'agit d'un monoterpène auquel un atome d'oxygène a été ajouté.

Le nom IUPAC de cette substance est : 1,3,3-triméthyl-2-oxa-bicyclo [2,2,2] octane. Toutefois, il est aussi connu sous diverses autres appellations équivalentes : Eucalyptol, Limonène-1, 8-oxyde, 1,8-é époxy-p-menthane, Cinéole, et ainsi de suite [20].

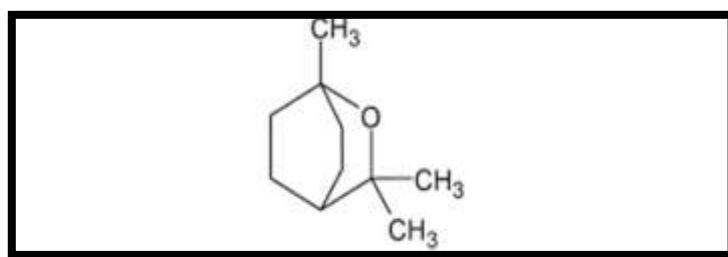


Figure 4 Structure du 1,8 cinéole.

1.7.1.2.1.1 Activités et mécanismes biologiques du 1,8-cinéole

Les huiles essentielles qui renferment du 1,8 cinéole sont employées comme remèdes populaires depuis de nombreuses années. Par ailleurs, diverses recherches ont démontré que le 1,8 cinéole, en tant que substance active, a un rôle significatif dans la gestion des affections respiratoires, des cancers, des problèmes digestifs, de la dysphorie, des maladies cardiovasculaires et des bacilles [21].

▪ Maladies respiratoires

Le 1,8-cinéole a des propriétés curatives pour diverses affections respiratoires, comme la bronchite grippale, la rhinosinusite et la pneumonie. Il est également utilisé dans certains essais cliniques.

Il est, utilisé comme aide dans le traitement de l'asthme, a permis d'améliorer la performance pulmonaire, la condition respiratoire et le bien-être des patients. Par ailleurs, le 1,8-cinéole a montré une protection croisée contre le virus grippal associé soit au vaccin, soit à l'oseltamivir, permettant d'allonger la longévité des animaux, de diminuer leur perte de poids, leur mortalité et les dommages pulmonaires. De plus, le 1,8-cinéole à lui seul a efficacement réduit les dommages aux voies respiratoires et aux poumons, a fait preuve de résistance contre les virus infectieux et a détendu les muscles des passages respiratoires.

Les données collectées indiquent que le 1,8-cinéole pourrait être un traitement potentiel pour les affections respiratoires, et des effets bénéfiques ont été démontrés dans des études cliniques concernant l'asthme, la BPCO et la rhinosinusite. La majorité des études concernant l'action thérapeutique du 1,8-cinéole se focalisent sur sa compétence à atténuer l'inflammation dans les affections respiratoires via diverses voies de signalisation. Cela a contribué à optimiser les aspects physiopathologiques des maladies chroniques des voies respiratoires, y compris les changements vasculaires pulmonaires et la sécrétion anormale de mucus [21].

▪ Activité anticancéreuse

Ces dernières années, l'étude de composés anticancéreux dérivés de plantes naturelles a suscité un vif intérêt parmi les scientifiques. D'après les études, le 1,8-cinéole a été confirmé comme un agent anticancéreux potentiel contre la leucémie, le cancer de la peau, de la bouche, du côlon, du sein, du foie et des ovaires, aussi bien en laboratoire (in vitro) que sur des sujets vivants (in vivo).

L'activation de l'apoptose des cellules cancéreuses par la voie de signalisation de la protéine suppresseur de tumeur p53 est principalement à l'origine des effets anticancéreux. Il a été démontré que le 1,8-cinéole induisait efficacement l'apoptose et l'interruption de la phase G2/M des cellules du carcinome cutané en stimulant l'expression de la protéine p53, tout en n'ayant presque aucun impact sur les kératinocytes normaux.

Par ailleurs, le 1,8-cinéole a différé l'apparition du cancer cutané et diminué les nodules tumoraux en éliminant l'expression du récepteur des hydrocarbures aryliques (AhR) [21].

▪ La maladie d'Alzheimer

La MA est une affection cérébrale dégénérative et sans retour qui affecte généralement les individus du troisième âge. Les principales manifestations de la Maladie d'Alzheimer sont le dépôt de plaques extracellulaires d'amyloïde bêta (Ab) et l'agglutination neurofibrillaire à l'intérieur des cellules. Des preuves de plus en plus nombreuses montrent que le dépôt d'Ab provoque l'inflammation. On a confirmé que le 1,8-cinéole améliore Ab25-35 dans les cellules de phéochromocytome et que l'effet anti-inflammatoire pourrait être associé au NF- κ B. Puisque le stress oxydatif est identifié comme l'un des mécanismes pathogéniques de la MA, l'action antioxydante du 1,8-cinéole pourrait également avoir un rôle dans la thérapie.

Suite à un traitement au 1,8-cinéole, l'équilibre entre les espèces oxydantes et antioxydant a été préservé grâce aux propriétés de captage des ROS activés par Nrf2. L'intervention précoce du 1,8-cinéole dans la maladie d'Alzheimer implique principalement l'inhibition de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE), bien que le processus ne soit pas totalement compris. Toutefois, bien que le 1,8-cinéole soit considéré comme un traitement prometteur pour prévenir et combattre la maladie d'Alzheimer, les recherches en laboratoire restent limitées. La méthode pour garantir un apport suffisant en 1,8-cinéole au cerveau en franchissant la barrière hémato-encéphalique est le facteur limitant dans la gestion de la maladie d'Alzheimer [21].

▪ Maladies cardiovasculaires

Les effets du 1,8-cinéole sur les pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension, l'accident vasculaire cérébral ischémique et l'athérosclérose pourraient être dus à sa capacité à abaisser la pression artérielle, détendre les vaisseaux sanguins, améliorer le transport inverse du cholestérol, protéger les cellules corticales, favoriser la guérison des lésions endothéliales et inhiber la contractilité myocardique. Le traitement des maladies

cardiovasculaires repose essentiellement sur des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires [21].

1.7.1.3 Applications et domaines d'utilisation

On rapporte que le romarin est employé dans la médecine traditionnelle et contemporaine pour traiter diverses pathologies et maux tels que les spasmes, les coliques néphrétiques, l'anti rhumatisme, comme diurétique, antiépileptique, expectorant, contre le diabète, la dysménorrhée, les affections cardiaques et pour apaiser les troubles respiratoires, entre autres. On l'a aussi utilisé pour ses propriétés antalgiques contre les douleurs dans le ventre, les troubles gastriques et les maux de gorge. En outre, il a été employé comme stimulant pour remédier à la défaillance de la mémoire, spécialement lors d'activités physiques ou intellectuelles excessives. En outre, on connaît la plante pour ses applications en tant qu'insecticide et herbicide, parmi beaucoup d'autres usages rapportés. Dans le domaine de la cuisine, le romarin est largement employé comme épice dans les régions méditerranéennes et en Angleterre pour parfumer viandes, poissons et légumes. Il y a du miel spécifiquement fabriqué à partir du nectar issu des fleurs de romarin. Ce miel hautement aromatique est connu sous le nom de miel de romarin. Son profil aromatique lui confère un rôle de substitut à la vanille dans la décoration des gâteaux. Dans le domaine de la cosmétique, l'huile de romarin a été couramment utilisée pendant des siècles comme composant des produits de beauté et des savons. Par ailleurs, il stimule la croissance des cheveux et son huile essentielle est un ingrédient dans de nombreux parfums [22].

1.7.2 L'armoise blanche (*Artemisia herba-alba*)

Le genre *Artemisia*, appartenant à la famille des Asteraceae, regroupe entre 200 et 400 espèces réparties à travers le monde. L'armoise blanche, également appelée absinthe du désert (Chih en arabe), est l'une des espèces les plus connues. *Artemisia herba-alba* est un arbuste nain vivace au feuillage verdâtre-argenté, qui se développe dans les climats arides et semi-arides ainsi que dans les steppes. On le retrouve principalement dans la région méditerranéenne, notamment en Afrique du Nord, en Espagne et dans les déserts de la péninsule du Sinaï, ainsi qu'au Moyen-Orient, dans le nord-ouest de l'Himalaya et en Inde [23].

CHAPITRE 1 : HUILES ESSENTIELLES ET COMPOSES MONOTERPENIQUES

Des études ont révélé que le genre *Artemisia* est particulièrement riche en métabolites secondaires, tels que les flavonoïdes, les acides cafféoylquiniques, les coumarines, les huiles essentielles, les stérols et les acétylènes [24].

Les espèces qui appartiennent au genre *Artemisia* possèdent des propriétés thérapeutiques, elles sont non seulement utilisées dans la médecine traditionnelle, mais aussi dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique [24].

1.7.2.1 Répartition botanique

L'armoise est une plante ligneuse qui se présente sous forme de buissons blancs et laineux, mesurant entre 30 et 80 centimètres de hauteur. Elle pousse généralement en petites touffes dispersées, souvent fragmentées par le piétinement des animaux et l'érosion causée par le vent. Sa tige développe des rameaux et des expansions latérales, portant de petites feuilles composées de trois à cinq folioles. Ces feuilles, courtes, blanches et laineuses, sont recouvertes d'un fin duvet. Les fleurs, de couleur jaune, sont regroupées en capitules, tandis que le fruit ne contient qu'une seule graine. Quant aux racines, Elles sont épaisses, laineuses et profondément ancrées dans le sol, offrant à la plante une stabilité optimale [23].

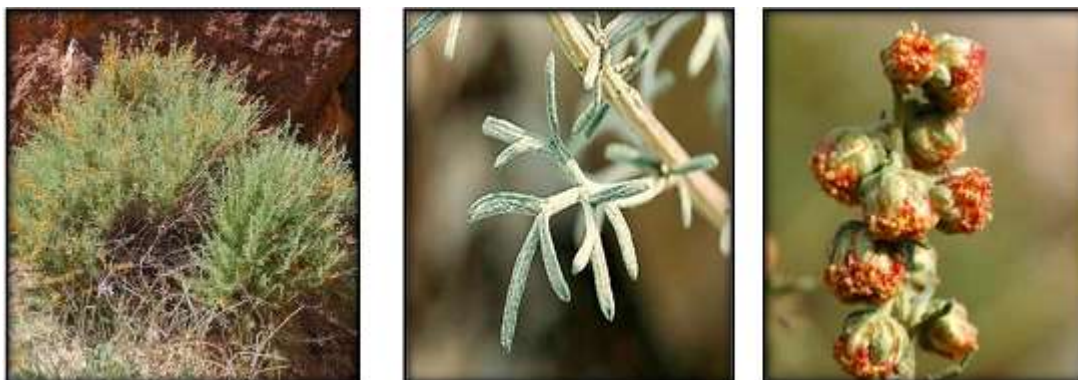


Figure 5 Aspect général, feuilles et inflorescences d'*Artemisia herba alba* Asso.

1.7.2.2 Principaux composants

L'huile essentielle d'armoise blanche est composée principalement des monoterpènes oxygénés (77,78%) sont les composants prédominants dont le camphre (39,5%), Chrysanthenone (10,38%), eucalyptol (8,60%), α thujone (7,03%), le Bornéol (3,35%) et Bornyl acetate (2,52%), suivis par les monoterpènes hydrocarbures (11, 29%) représentés par le camphène (6,0%) et les sesquiterpènes hydrocarbures (3,77%) [24].

Dans ce travail, nous exploiterons le composé majoritaire de l'HE de romarin qui est le camphre.

1.7.2.2.1 Le camphre définition

Le camphre est une substance cristalline blanche, au parfum puissant et au goût piquant. Il est dérivé du bois du camphrier, un arbre à feuilles larges qui peut atteindre jusqu'à 40 mètres de hauteur et 3 mètres de diamètre. Le camphrier se trouve dans les régions tropicales et subtropicales d'Asie. L'extraction du camphre se fait par distillation à la vapeur, suivie d'un processus de raffinage et de sublimation des bois, brindilles et écorces de l'arbre. À des fins pharmaceutiques, le camphre est utilisé comme analgésique topique et anti-inflammatoire. Il est principalement absorbé par la peau, pénétrant facilement les couches dermiques. Le camphre peut également être administré par injection, inhalation et autres méthodes. L'huile de camphre contient 1 % d'huiles essentielles, comprenant des composés tels que le cinéole, le pinène, le thymol, le menthol, ainsi que 10-15 % de 2-bornanon [3].

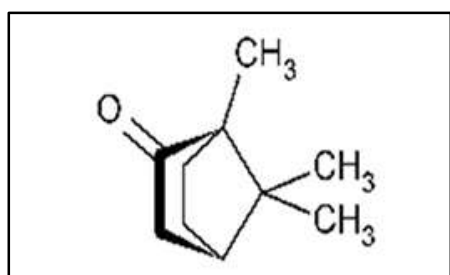


Figure 6 Structure du camphre.



Figure 7 Le camphre.

1.7.2.2.1.1 Activités et mécanismes biologiques du camphre

▪ Effet cicatrisant

Une étude menée en 2018 par (Vaghardoost R et al) ont évalué l'effet cicatrisant d'une pommade à base de plantes contenant des extraits d'huile de camphre, en le comparant à l'huile de vaseline utilisée comme traitement de référence. Quarante rats ont été divisés en deux groupes, chacun recevant une brûlure au second degré sur le dos. Le premier groupe a été traité quotidiennement avec la pommade à base de plantes, tandis que le second groupe (témoin) a reçu de l'huile de vaseline. Après 28 jours d'application, les résultats ont révélé une cicatrisation maximale de l'épithélium chez les rats traités avec la pommade végétale, tandis

qu'une cicatrisation minimale a été observée dans le groupe témoin. De plus, une néo vascularisation significativement plus importante a été constatée chez les animaux du groupe expérimental [25].

▪ Effet antitussif

L'action du camphre sur la toux a été étudiée par Laude et al. En 1994 chez des cobayes conscients. Différentes concentrations de camphre vaporisé (50, 133 et 500 mg/L) ont été administrées aux animaux afin d'évaluer son impact sur la fréquence de la toux. Les résultats ont montré qu'à la concentration la plus élevée (500 mg/L), la fréquence de la toux était réduite de 33 % [26].

▪ Effet antiviral

En 2000, (De Logu A et son équipe) ont étudié l'activité antivirale de l'huile essentielle de coton de lavande, particulièrement riche en camphre. Cette huile a démontré une capacité à inhiber in vitro les virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) et de type 2 (HSV-2), avec des valeurs d'IC₅₀ respectives de 0,88 µg/mL⁻¹ et 0,7 µg/mL⁻¹. Les tests de réduction de formation de plaques ont confirmé une inhibition de la transmission intercellulaire des deux types de virus [27,28].

▪ Effet antibactérien

L'étude menée par (Santoyo et al). en 2005 s'est intéressée à l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de romarin, dont le camphre constitue entre 15 et 30 % de la composition. Les tests réalisés ont révélé une action antibactérienne contre plusieurs micro-organismes, notamment *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Aspergillus niger*. Parmi eux, *S. aureus* s'est révélé être le plus sensible, tandis qu'*A. Niger* s'est montré le plus résistant [29].

Par ailleurs, une étude menée en 2003 par (Sökmen A et al) ont analysé l'huile essentielle d'*Achillea sintenisii*, contenant 15 % de camphre, et l'a comparée à l'huile essentielle de camphre, dont la teneur en ce composé atteint 50 %. Les résultats ont mis en évidence une activité antibactérienne notable, le camphre apparaissant comme l'un des

principaux agents actifs, aux côtés de l'eucalyptol. Cette activité a notamment été observée contre *Candida albicans* et *Clostridium perfringens* [28,30].

1.7.2.3 Applications et domaines d'utilisation

1.7.2.3.1 Applications du camphre

Utilisation dans le domaine cosmétique :

Dans les temps anciens, le camphre était utilisé comme ingrédient dans les parfums.

Utilisations culinaires :

- Le camphre était utilisé comme ingrédient dans les sucreries dans les temps anciens.
- Il est utilisé dans une variété de plats sucrés [3].

Utilisations médicinales :

- Le camphre est principalement utilisé comme médicament topique, sous forme de crème pour la peau ou de pommade, pour soulager les démangeaisons, les piqûres d'insectes, les irritations ou les douleurs articulaires.
- Il agit également comme un léger anesthésique local.
- Le camphre est utilisé sous forme d'aérosol ou en inhalation de vapeur pour inhiber la toux et soulager les symptômes du rhume.
- Des doses élevées de camphre peuvent provoquer des symptômes tels que désorientation, léthargie, spasmes musculaires, convulsions, vomissements, crampes abdominales et crises.
- Le camphre a une utilisation limitée en médecine vétérinaire en tant que tonique respiratoire pour les chevaux [3].

Utilisation en médecine traditionnelle :

- Le camphre était utilisé dans les temps anciens pour traiter les gonflements, les entorses et les inflammations.

CHAPITRE 1 : HUILES ESSENTIELLES ET COMPOSES MONOTERPENIQUES

- Il a été utilisé dans la médecine traditionnelle dans divers pays.
- Le camphre a été utilisé dans le monde entier pour diverses raisons [3].

Utilisation religieuse :

- Le camphre est couramment utilisé dans les cérémonies religieuses hindoues.
- En Inde, il est appelé Karpur Dani [3].

CHAPITRE 2

L'ENCAPSULATION

2 L'encapsulation

2.1 Introduction

L'encapsulation constitue une solution réalisable et efficace pour résoudre les problèmes liés à la libération, à la stabilité physique, à la protection contre les réactions d'oxydation avec l'environnement, à la volatilité, à la bio activité et à la toxicité des principes actifs. De nombreuses méthodes d'encapsulation ont été développées, notamment celles utilisant des polymères naturels. Cependant, les matériaux et les conditions de formulation employés doivent rester doux et non toxiques pour garantir la sécurité et l'efficacité des systèmes encapsulés. Dans ce chapitre, nous avons présenté les différents types et procédés d'encapsulation, tout en analysant leurs applications variées. Cette étude approfondie nous permet de poser les bases nécessaires pour faciliter et orienter notre travail de recherche [31].

2.2 Définition de l'encapsulation

L'encapsulation est un procédé technologique consistant à enfermer une substance active appelée (noyau, charge utile ou phase interne) dans un matériau d'enrobage nommé (membrane, enveloppe ou matrice) [32].

L'encapsulation des composés majoritaires des huiles essentielles comme (les terpènes, phénols et aldéhydes) consiste à protéger ces molécules volatiles et sensibles en les enfermant dans une matrice ou une enveloppe protectrice. Cette technique permet de stabiliser ces composés actifs face à l'oxydation, la lumière et la chaleur, tout en contrôlant leur libération et en améliorant leur biodisponibilité. Elle offre ainsi des applications prometteuses en aromathérapie, cosmétique et agroalimentaire, où la préservation des propriétés bioactives est cruciale [32].

2.3 Objectifs de l'encapsulation

L'encapsulation d'un principe actif dans un vecteur adapté permet de :

- Protéger la substance active de son environnement (oxydation, humidité, lumière...).
- Faciliter son acheminement vers des zones cibles difficiles d'accès.
- Améliorer son efficacité en optimisant sa libération et son absorption cellulaire.
- Réduire les effets indésirables en limitant son impact sur les tissus sains [33].

2.4 Différents types d'encapsulation

2.4.1 La micro-encapsulation

La micro encapsulation est une d'entre les techniques de conservation de qualité des matières fragiles et un procédé de fabrication des matériaux présentant de nouvelles qualités intéressantes, composées d'un matériau enveloppe contenant une matière active. La micro encapsulation est un procédé reposant sur le confinement des particules micrométriques dans une capsule de polymère, qui lui-même les régit et les mets en sûreté des agressivités extérieures. Le produit de cette procédure est appelé nom des microparticules, qui sont discriminez en fonction de leur morphologie et de leur structure [34]. La terminologie « microcapsules » sous-entend des entités dont le diamètre est compris entre 1 et 1000 μm [35].

2.4.2 La nano-encapsulation

La nano-encapsulation est une technologie qui permet d'encapsuler des substances à l'échelle nanométrique. Le ciblage de tout composé bioactif vers différentes zones du corps dépend directement de la taille des particules. Ainsi, la nano-encapsulation a plus de potentiel que la micro-encapsulation pour améliorer la biodisponibilité, améliorer la libération contrôlée et faciliter la délivrance ciblée de composés bioactifs. Les nanoparticules sont des particules colloïdales de 10 à 1000 nm de diamètres et sont sous forme de nano capsules et de nano sphères. Les nano capsules sont des systèmes vésiculaires où le composé bioactif est enroulé dans une cavité superficielle d'une membrane polymère unique, et les nano sphères sont des systèmes matriciels où le composé bioactif est homogénément distribué (**Figure.1**). La nano-encapsulation des agents thérapeutiques améliore leur efficacité, leur spécificité et leur potentiel de ciblage [34].

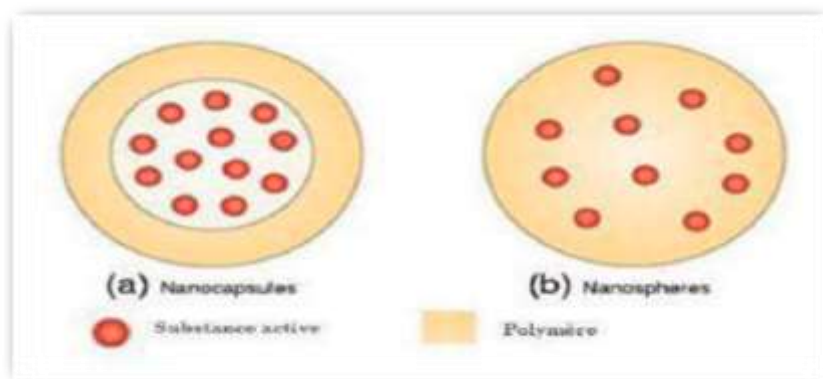


Figure 8 Différentes formes de nanoparticules.

2.5 Les différents procédés d'encapsulation

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour favoriser l'encapsulation des composés bioactifs. Le choix de la méthode d'encapsulation la plus appropriée dépend essentiellement du type de matériau de base et des caractéristiques du produit final où l'encapsulation sera appliquée. De plus, le choix de matériau de la paroi de la capsule a une grande influence sur les propriétés de la substance encapsulée, particulièrement sur l'efficacité d'encapsulation, et devrait être considéré soigneusement. Il existe plusieurs manières de classer les procédés industriels d'encapsulation suivant différents critères :

- L'utilisation ou non de solvant organique.
- La nature du milieu dispersant : liquide, gazeux ou à l'état supercritique.
- L'utilisation de polymères préformés, de lipides ou de monomères.
- Le procédé utilisé pour la réalisation de la micro encapsulation.

Cette dernière manière de classer les procédés industriels est la plus couramment utilisée, donc on distingue 3 groupes de procédés [36] :

2.5.1 Les procédés physico-chimiques :

Ils reposent sur le contrôle de paramètres tels que la solubilité et la précipitation des polymères grâce à l'ajout d'un non-solvant, le pH ou la température, mais aussi sur le contrôle des transformations d'état (fusion, solidification) des polymères. Au cours de ce procédé, la substance active est dispersée sous forme de gouttes ou de particules. L'encapsulation dépendra alors des conditions d'étalement des phases mises en jeu [34].

2.5.2 Les procédés chimiques :

Reposant sur la formation in situ de matériau d'enrobage par polycondensation, polymérisation anionique ou radicalaire d'unités monomères. En cela, ils se distinguent des procédés physico-chimiques et mécaniques faisant appel à des substances d'enrobage préformées (lipides, polymères) [34].

2.5.3 Les procédés mécaniques :

Qui utilisent des techniques de pulvérisation, de déformation en goutte ou en gouttelettes et d'extrusion [34].

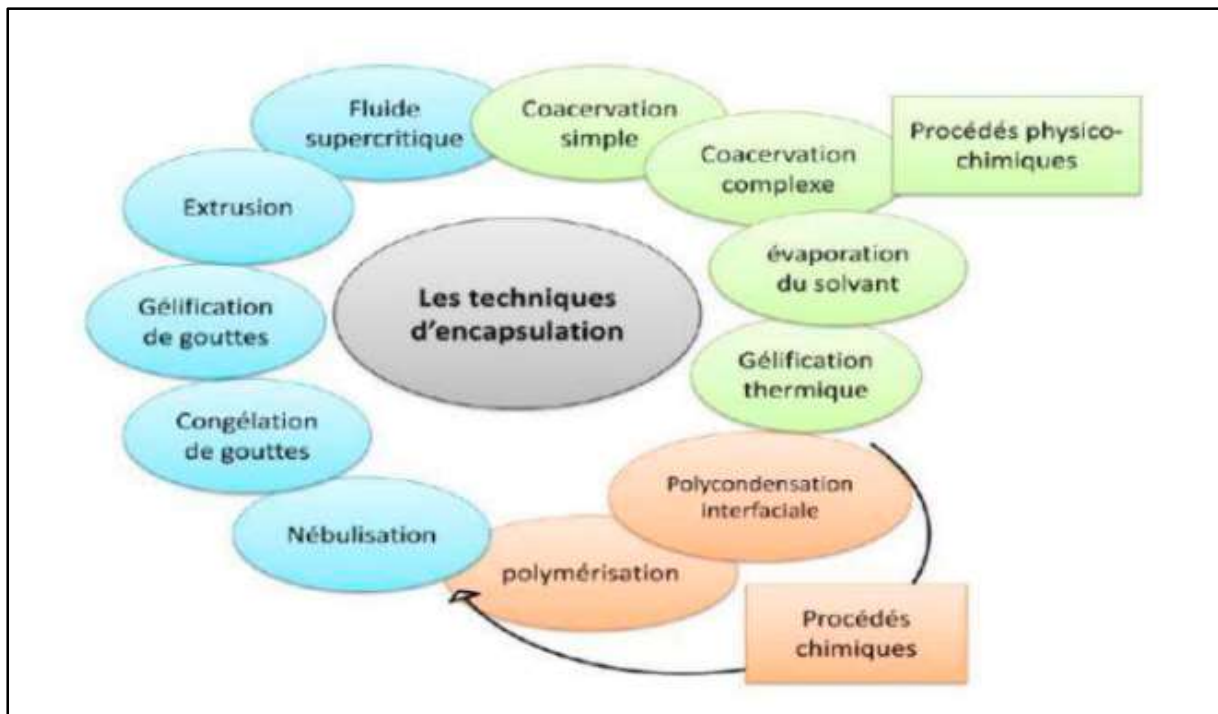


Figure 9 Les différents procédés d'encapsulation.

2.6 Les différents agents d'encapsulation

2.6.1 Les vecteurs particuliers

Les vecteurs spécifiques sont des systèmes d'encapsulation décrits par des particules sphériques à base de phospholipides (les liposomes) ou élaborées à partir de polymères biodégradables (les microparticules et les nanoparticules). En fonction de leur structure interne, on peut les distinguer en systèmes réservoirs (les capsules et les liposomes) ou matriciels (les sphères). De quelques nanomètres à un micron pour la nanoparticule ; au -delà,

on parle de microparticules. En général, le choix du vecteur se fera en fonction de la voie d'administration envisagée, mais aussi en fonction de la durée de libération souhaitée [37].

2.6.2 Agents de support à base de polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères glucidiques naturels composés de plusieurs monosaccharides avec liaison glycosidique et sont en grande quantité dans différentes sources telles que les plantes, les animaux, les algues et les microbiennes. Les polysaccharides les plus importants impliqués dans l'encapsulation des composés bioactifs ont été choisis en fonction de leurs caractéristiques moléculaires et physico-chimiques [38].

2.6.3 Agents à base de protéines

Les protéines sont souvent considérées comme des substances riches en lipides et possédant une forte valeur nutritionnelle. Leur solubilité dépend du pH : elles restent insolubles en milieu acide mais se dissolvent facilement en environnement alcalin. Parmi les protéines animales couramment utilisées dans l'encapsulation, on retrouve la caséine, la gélatine, le collagène et les protéines de lactosérum. Quant aux protéines végétales, les plus exploitées sont la zéine, la gliadine et les protéines de soja. Les protéines végétales se caractérisent par une hydrophobicité plus marquée que celles d'origine animale. Elles sont également plus abordables et présentent un risque allergène réduit [39].

2.7 Les applications de l'encapsulation

À l'heure actuelle, les recherches sur l'encapsulation se sont fortement développées, visant à concevoir de nouvelles technologies, à encapsuler des composés inédits et à explorer de nouveaux matériaux d'enrobage. Parmi ces derniers, les polymères biocompatibles suscitent un intérêt particulier pour des applications dans les secteurs pharmaceutique et médical. Le **tableau 1** présente un aperçu des diverses applications de la micro encapsulation dans différents domaines industriels, accompagné de quelques exemples de composés encapsulés [40].

CHAPITRE 2 : L'ENCAPSULATION

Tableau 1 Applications de la micro encapsulation dans différents domaines industriels

Domaines	Applications
Pharmacie	Médicaments à effet retard Vectorisation et ciblage d'un organe et libération spécifique du PA Vaccins monodoses Masquage du goût
Cosmétiques	Protection des PA (dans les formulations, lors de l'utilisation) Effet retard dans le processus de pénétration Augmentation de la biodisponibilité Amélioration de la présentation des produits d'un point de vue marketing
Agro-alimentaire	Protection et/ou libération de PA (arômes, colorants, probiotique, huiles insaturées, enzymes) Disponibilité (aspartame flash) Bioréacteurs (enzyme + composants de la particule)
Vétérinaire	Compléments alimentaires (acides animés pour les herbivores, probiotiques) Traitement thérapeutiques monodoses Masquage du goût, de l'odeur (raticide) Insémination artificielle
Phytoprotecteur	Formulation sèche de PA (insecticides volatils) Enrobage par le PA de l'entité à protéger (fongicide sur du bois, conservation de livres) Implantation persistante de PA en milieu défavorable (herbicides dans des cultures submergées)
Biotechnologies et environnement	Traitement des eaux Implantation persistante de microorganismes en milieu défavorable
Chimie	Peintures (stabilisation des pigments, des charges ; incorporations d'antiallure, de fongicides, furtives aux ondes radars) Adhésifs (écrous encollés dans l'industrie automobiles) Encres (autocopiant sans carbone, odorantes, thermochromes) Tissus (odorants, antibactériens, thermochromes)
Produits de grande consommation	Stabilisation du PA dans la formule (parfums, bactéricides, azurants...) Libération prolongée (éponges antibactériennes, litière anti-odeur)

2.8 Conclusion

L'encapsulation figure parmi les préparations pharmaceutiques en phase de développement par les grandes entreprises de santé qui consiste à encapsuler un principe actif en suivant un procédé approprié dans une autre matière inactive afin d'améliorer ses propriétés de conservation, de présentation et de biodisponibilité.

CHAPITRE 3

ASPECT GENERAL DES NIOSOMES

3 Aspect général des niosomes

3.1 Introduction

Les niosomes, également appelés vésicules de tensioactifs non ioniques, sont des structures lamellaires à l'échelle microscopique. Ils se forment par la combinaison de tensioactifs non ioniques appartenant à la catégorie des éthers d'alkyle ou du dialkyle polyglycérol et du cholestérol, suivie d'une hydratation dans un milieu aqueux. Il s'agit de systèmes vésiculaires comparables aux liposomes, qui ont la capacité d'être utilisés comme vecteurs pour les médicaments amphiphiles et lipophiles. La technique de fabrication des niosomes se base sur la technologie des liposomes [41].

Les niosomes ont montré leur potentiel lors des recherches sur la libération de médicaments et représentent une alternative plus efficace pour le système de délivrance de médicaments. C'est Handjani Vila et al qui ont présenté cette catégorie de vésicules. Il s'agit de systèmes vésiculaires similaires aux liposomes, qui peuvent être utilisés comme vecteurs de médicaments amphiphiles et lipophiles. L'une des raisons de la préparation des niosomes est la stabilité chimique supposée supérieure des tensioactifs à celle des phospholipides, utilisés dans la préparation des liposomes [41].

Dans les années 1970, des scientifiques de l'industrie cosmétique (L'Oréal ,1970) ont pour la première fois documenté l'auto assemblage de tensioactifs non ioniques, créant ainsi des vésicules à membranes bicouches. Depuis lors, les niosomes ont été l'objet d'études intensives pour diverses applications dans divers secteurs, y compris l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire, concluant une multitude de publications et brevets [42].

3.2 Les niosomes

3.2.1 Définition

Les niosomes sont des structures nanométriques formées de tensioactifs (non ioniques) et de cholestérol [43]. On peut également avoir recours à d'autres excipients. Les niosomes possèdent une capacité de pénétration plus élevée que les préparations d'émulsions antérieures. Grâce à leur bicouche, leur structure est comparable à celle des liposomes.

Toutefois, les substances employées dans leur confection leur confèrent une plus grande stabilité et procurent ainsi plusieurs bénéfices par rapport aux liposomes [44].

Les niosomes sont de petite taille et se placent à l'échelle microscopique. La dimension des particules s'étend de 10 à 100 nm [44].

3.2.2 L'origine

L'Oréal a élaboré et obtenu un brevet pour les premières formulations de niosomes en 1975. Initialement, les niosomes ont été employés pour la délivrance de traitements contre le cancer. Les formules élaborées ont pu altérer le profil pharmacocinétique, la répartition organique et le métabolisme du méthotrexate chez la souris. Les niosomes possèdent une structure, une morphologie et une dimension adaptable ; ils ont la capacité d'emprisonner des médicaments hydrophiles dans des sections aqueuses ou des médicaments lipophiles en les distribuant en zones bicouches. En outre, ils peuvent être présentés sous forme de vésicules à une seule couche, à quelques couches ou à plusieurs couches. Les niosomes offrent aussi une stabilité physique appréciable, sont peu coûteux et leur production en routine et à grande échelle est assez simple [44].

3.2.3 Structure de niosomes

Les niosomes sont des configurations de tensioactifs non ioniques en forme de bicouches circulaires, avec la capacité à générer des micelles. Quand la concentration de tensioactifs excède la concentration micellaire critique (CMC), des micelles peuvent se créer. Toutefois, les tensioactifs non ioniques ont le potentiel de constituer des structures en bicouche circulaire. L'inclusion de cholestérol dans la formulation donne de la rigidité aux vésicules, tandis que les tensioactifs ioniques diminuent l'aggrégation. Le niosome peut être unilamellaire ou multilamellaire, en fonction de la technique de préparation utilisée [43].

La membrane vésiculaire des niosomes, dotée d'une structure en bicouche, a la capacité d'encapsuler à la fois des substances lipophiles et hydrophiles. On peut réaliser cela en conservant dans le cœur aqueux les composés hydrophiles ou en les adsorbant sur la face interne de la membrane, tandis que les composés lipophiles peuvent être confinés dans la zone hydrophobe des bicouches [42].

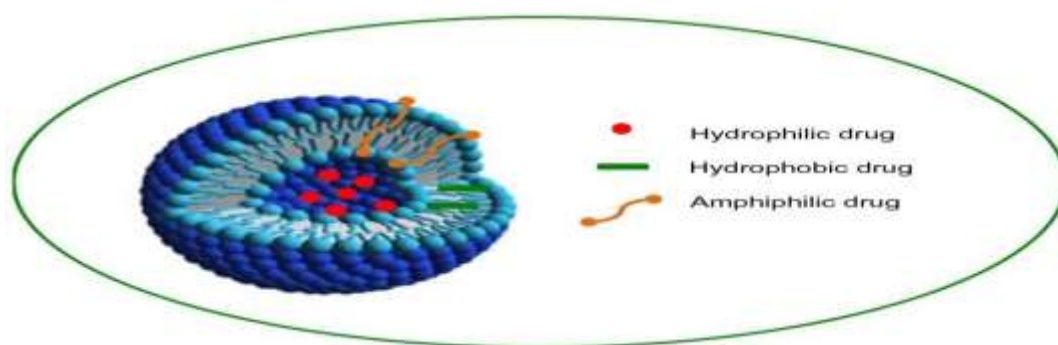


Figure 10 Structure de niosome.

3.2.4 Composants de niosomes

3.2.4.1 Tensioactif non ionique

Les tensioactifs non ioniques constituent un élément essentiel de la constitution des niosomes et surpassent en matière de toxicité, de stabilité et de compatibilité les tensioactifs anioniques et cationiques. Les tensioactifs non ioniques présentent une toxicité réduite, une moindre tendance à l'hémolyse et favorisent l'activité des surfaces cellulaires. Ils conservent aussi un pH physiologique dans la solution. On considère les tensioactifs non ioniques comme des molécules amphiphiles qui présentent deux zones distinctes (une zone hydrophile et une zone lipophile). Ces deux éléments sont habituellement connectés par des liaisons éther, ester ou amide. La structure bicouche des vésicules est déterminée par l'équilibre hydrophile-lipophile (HLB) du tensioactif. Le contrôle du piégeage des vésicules est significativement influencé par la valeur HLB. Ce critère sans dimension est aussi réputé comme un guide instantané pour la sélection des tensioactifs. La plage de valeur HLB pour les tensioactifs non ioniques se situe entre 0 et 20. Pour la production de niosomes, une valeur HBL allant de 14 à 17 n'est pas jugée acceptable, alors que l'efficacité d'encapsulation optimale est obtenue avec un HBL de 8,6. La performance d'encapsulation se réduit lorsque le niveau HBL descend de 8,6 à 1,7 [45].

CHAPITRE 3 : ASPECT GENERAL DES NIOSOMES

Tableau 2 Exemples de surfactants utilisés dans la préparation des niosomes [42].

Classes chimiques des surfactants non ioniques		Exemples
Éthers Alkyliques	Éthers Alkyliques de glycérol	Hexadécyl diglycérol éther
	Éthers Alkyliques de Polyoxyéthylène glycol	Brij 30, Brij 52, Brij 72, Brij 76, Brij 78
Esters Alkyliques	Esters d'acides gras de sorbitan	Span 20, Span 40, Span 60, Span 80, Span 65, Span 85
	Esters d'acides gras de Polyoxyéthylène sorbitan	Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, Tween 65, Tween 85
Alkyl amides	Glycosides	Glucoside de Coco
	Polyglucosides d'alkyle	Octyl-décyl-polyglucoside, Décyl-polyglucoside
Copolymère en bloc	Pluronique	Pluronique L64, Pluronique 105
Alcools gras	-	Alcool stéarylique, alcool cétylique, alcool myristylique
Acides gras	-	Acide stéarique, acide palmitique, acide myristique
Éthers couronne	-	Surfactant de Bola

3.2.4.2 Cholestérol

Les stéroïdes tels que le cholestérol (CHOL), qui améliorent la structure physique et les caractéristiques des vésicules non ioniques, ont un rôle crucial dans la création des niosomes. Il a été prouvé que les cholestérols influencent positivement la rigidité, la perméabilité, l'évasion et l'efficacité du piégeage. Le cholestérol est une substance amphiphile. Le groupe OH se situe dans la phase aqueuse, alors que la chaîne hydrocarbonée tensioactive est orientée vers la chaîne aliphatique. Quand le squelette robuste du cholestérol est intégré dans la bicouche niosome, celle-ci se rigidifie en restreignant le mouvement du carbone des hydrocarbures, ce qui est utile dans des conditions de stress élevé [45]. Le cholestérol est aussi réputé pour limiter les pertes de substance active depuis la vésicule niosomale en bloquant la transition de la phase solide à la phase fluide du tensioactif non ionique [42].

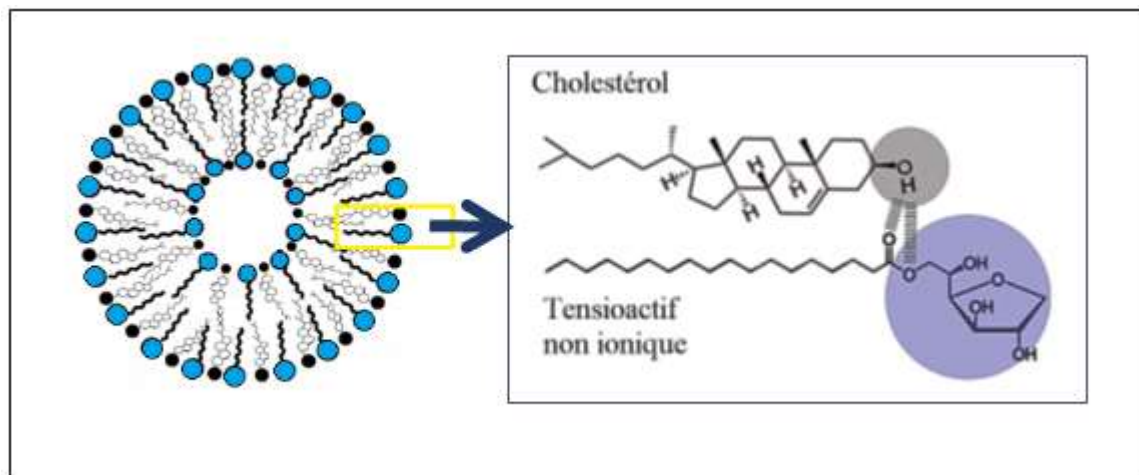


Figure 11 Placement du cholestérol dans la bicouche des niosomes.

3.2.4.3 Molécule de charge

On ajoute une molécule chargée à la préparation niosomale pour prévenir l'agrégation du niosome. Si la formulation contient une charge identique, une répulsion entre les particules se produit, rendant ainsi l'agrégation impossible. La formulation niosomale est enrichie par l'ajout d'un tensioactif ionique à charge positive et négative. Molécules chargées négativement : le phosphate de diacétyle, l'acide phosphatidique, l'acide lipoaminé et le phosphate de dihexadécyle. Molécules ayant une charge positive : la stéarylamine et le chlorure de stéarylpyridinium. Il est également nécessaire d'avoir une concentration optimale de la molécule chargée. Si l'on introduit la molécule chargée à une concentration plus élevée, la création du niosome ne se produit pas. Pour préparer le niosome, une concentration molaire variant de 2,5 à 5% de la molécule chargée est requise [43].

3.3 Type de niosomes

On classe les niosomes en fonction du nombre de bicouches, de leur dimension ou de leur mode d'élaboration [46].

3.3.1 Petites vésicules uni-lamellaires (SUV : smal uni-lamellar vesicle)

On obtient les petites vésicules uni-lamellaires en soumettant les grandes vésicules uni-lamellaires (LUV) à une sonication [43].

3.3.2 Large uni-lamellaires vésicules (LUV : large uni-lamellar vesicle)

Les vésicules uni-lamellaires de grande taille, appelées LUV, possèdent une membrane bicouche unique. Ils contiennent plus d'eau et de lipides, ce qui justifie leur taille plus grande. Généralement ces vésicules sont préparées par une injection d'éther et une évaporation en phase inverse. Les vésicules LUV offrent plus d'avantages que les vésicules MLV, dont la capacité d'encapsuler efficacement des médicaments hydrosolubles, des taux de libération constants et une consommation lipidique réduite [43].

3.3.3 Vésicules multilamellaires (MLV : Multilamellar vesicle)

Les MLV contiennent plusieurs bicouches qui renferment individuellement de petits compartiments aqueux entre elles. Ces niosomes, grâce à leur facile préparation et leur stabilité mécanique en stockage prolongé, sont les plus fréquemment employés [42].

Ces vésicules sont particulièrement efficaces en tant que vecteurs de médicaments pour les substances lipophiles [46].

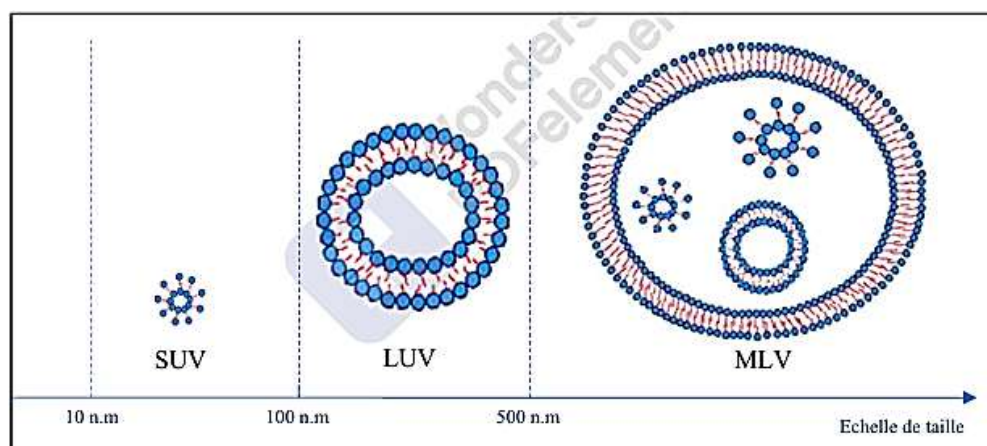


Figure 12 Structures et tailles de différentes vésicules niosomales.

3.4 Différence entre liposome et niosome :

La différence entre le liposome et le niosome est expliqué dans le tableau suivant :

Tableau 3 Niosome VS Liposome. [43]

N°	Niosome	Liposome
1	Surfactant	Phospholipide
2	Taille [10nm-100nm]	Taille [10nm-3000nm]
3	Peu couteux	Couteux
4	Aucune condition de stockage n'est requise	Condition de stockage particulière requise
5	Tensioactif plus stable	Tensioactif instable
6	Moins toxique	Plus toxique
7	Présence de cholestérol	Ne contient pas de cholestérol
8	Les tensioactifs non ioniques ne sont pas chargés	Les phospholipides peuvent avoir une charge neutre

3.5 Processus de préparation

3.5.1 Méthodes de préparation

3.5.1.1 Méthode d'injection d'éther

Dans cette technique, le constituant lipidique (cholestérol) et le tensioactif non ionique sont dissous dans de l'éther puis introduits progressivement à l'aide d'une seringue dans la phase aqueuse renfermant un médicament ou une substance naturelle, tout en agitant à une température dépassant les 60 °C dans un bain-marie réchauffé. Parmi les points négatifs, on note la lenteur excessive du procédé et la quantité restreinte d'éther contenue dans la suspension vésiculaire [47].

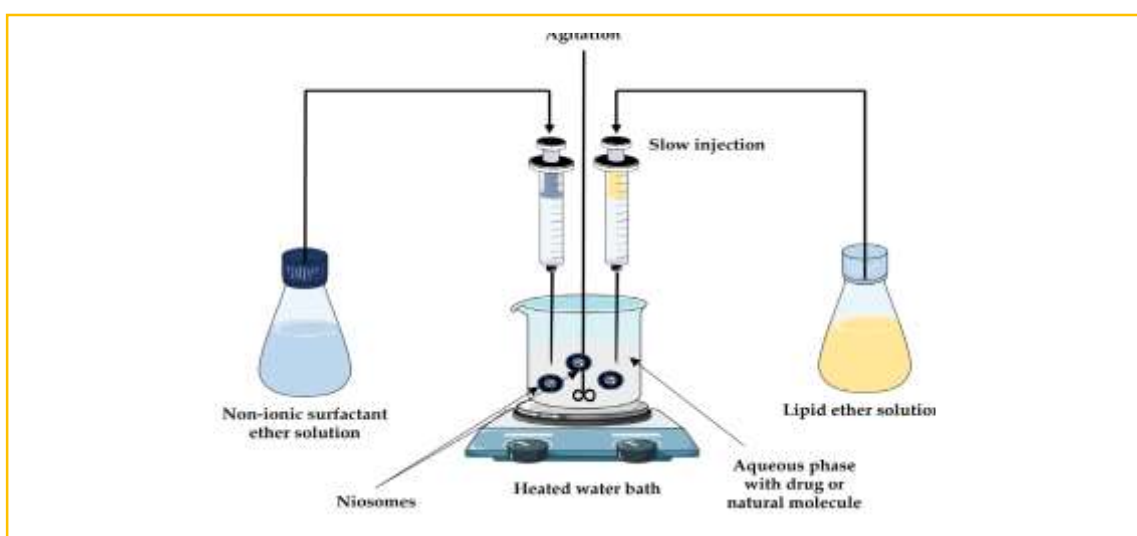


Figure 13 Technique d'injection d'éther.

3.5.1.2 Méthode d'injection de lipides :

Cette méthode fait appel à des solvants. L'injection rapide du tensioactif fondu et du cholestérol dans une phase aqueuse chauffée contenant le médicament dissous ou des molécules naturelles conduit à la formation de niosomes. [47]

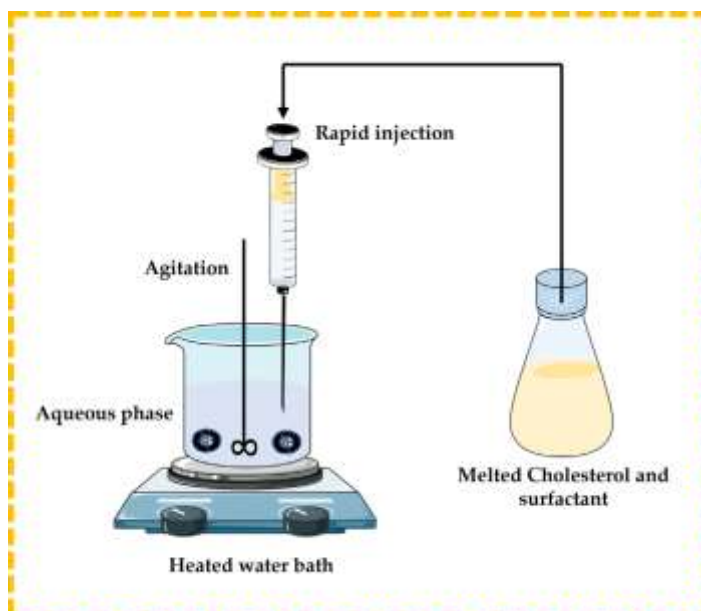


Figure 14 Technique d'injection de lipides.

3.5.1.3 Méthode des bulles

Le procédé des bulles est une technique simple qui n'utilise aucun solvant organique. On obtient le LUV en ajoutant des tensioactifs et du cholestérol à une solution tampon à 70 °C, en uniformisant la dispersion pendant quinze secondes avec un homogénéisateur à haute pression de cisaillement, puis en faisant circuler de l'azote gazeux dans le mélange [48].

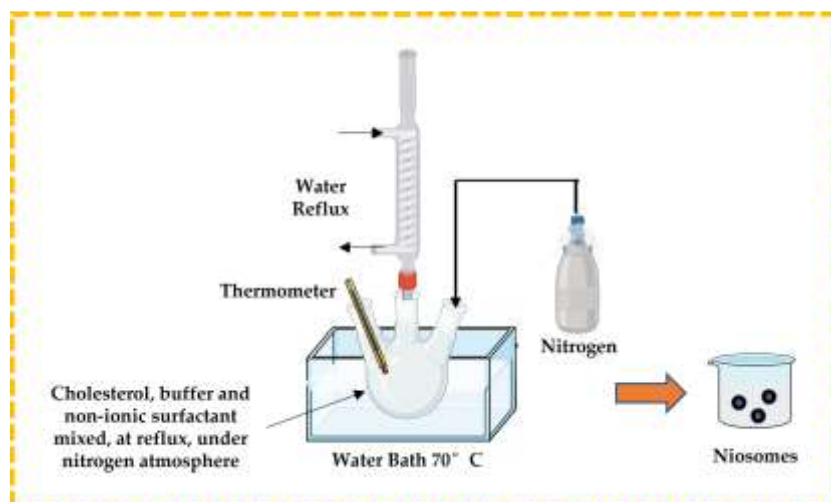


Figure 15 Schéma illustratif de la technique des bulles.

3.5.1.4 Méthode d'évaporation en phase inverse

La méthode d'évaporation en phase inverse emploie un mélange comprenant un agent tensioactif et du cholestérol dans une proportion de 1 :1, ainsi que de l'éther et du chloroforme. On ajoute une phase aqueuse contenant le médicament visé à la préparation, puis on la soumet à une sonication à 4-5 °C. L'ajout d'une petite dose de tampon phosphate salin au mélange est suivi par la poursuite de la sonication. À 40 °C sous pression réduite, le solvant organique est retiré et la suspension restante est ensuite diluée à l'aide d'un tampon saline phosphaté. Le produit final de niosomes est obtenu après avoir chauffé le mélange à 60 °C pendant une durée de 10 minutes [49].

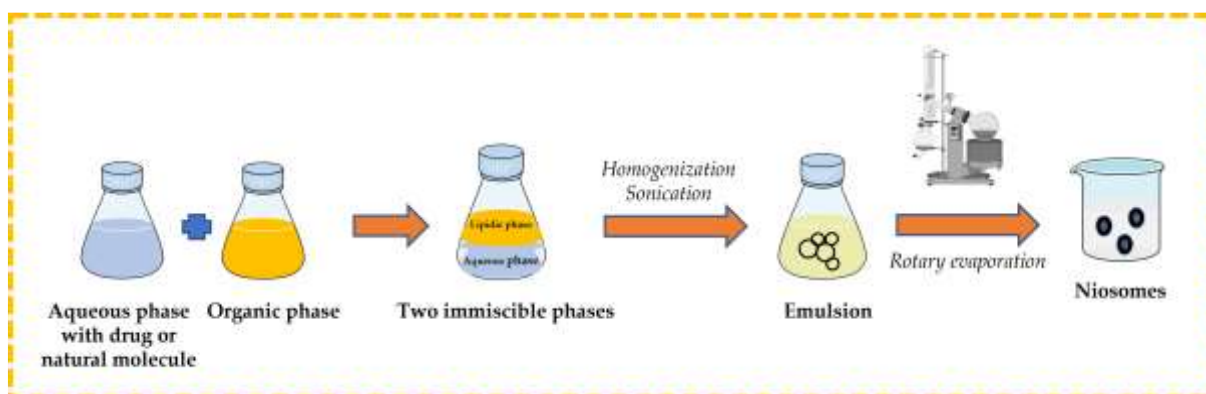


Figure 16 Schéma illustratif de la technique d'évaporation en phase inverse.

3.5.1.5 Méthode de sonication

Dans cette technique, une dose appropriée de solution pharmaceutique dans le tampon est intégrée au mélange de tensioactif et de cholestérol dans un flacon en verre d'une capacité de 10 ml. On sonifie le mélange à 60 °C pendant 3 minutes avec un sonificateur muni d'une sonde en titane pour produire le niosome [46].



Figure 17 Schéma illustratif de la technique de sonication.

3.5.1.6 Méthode d'hydratation en couche mince

L'élaboration des niosomes utilise fréquemment cette méthode. On dissout le tensioactif et le cholestérol dans un solvant organique convenable (comme l'éther, l'éthanol ou le chloroforme). Après l'évaporation du solvant organique sous vide/rotative, une fine couche séchée se crée à l'intérieur du flacon. Le médicament est mélangé à une solution aqueuse, puis étalé sur le film formé pour l'hydrater. Pour la fabrication de niosomes, le film hydraté doit être placé dans un bain-marie à une température plus élevée que celle de transition des tensioactifs [47].

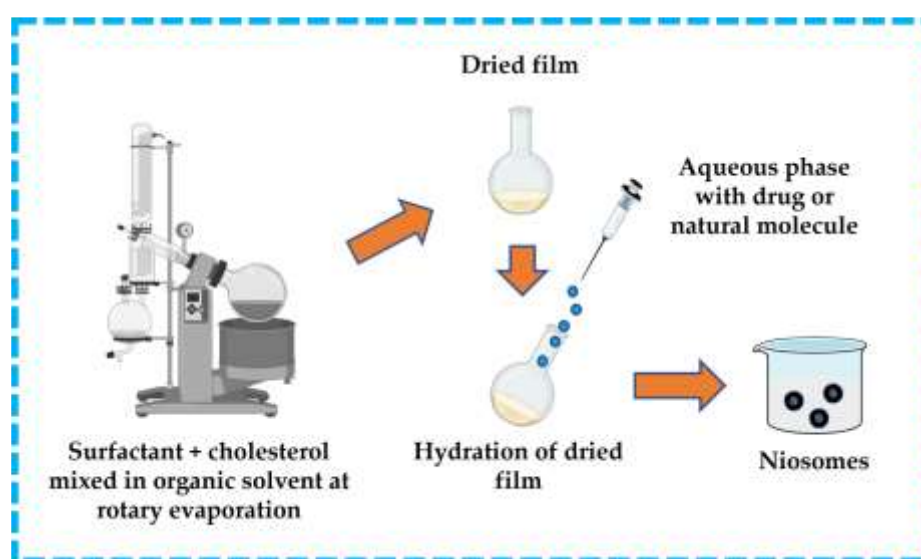


Figure 18 Schéma illustratif de la technique d'hydratation en couche mince.

3.5.1.7 Méthode de micro fluidisation

C'est une méthode moderne employée pour la préparation de vésicules uni-lamellaires. Dans cette technique, deux courants fluidisés interagissent à une vitesse extrêmement élevée dans la chambre d'interaction. Cette technique offre une uniformité accrue, une reproductibilité supérieure et la production de niosomes plus petits [43].

Les deux courants (phase aqueuse et phase lipidique dispersée) sont dirigés vers la membrane et le conteneur pressurisé à une pression extrêmement élevée et à grande vitesse par des pompes pneumatiques, où ils se heurtent. Le micro canal continu constitué par l'ensemble membrane et récipient sous pression favorise un mélange turbulent, générant un profil de pression uniforme à haute pression, indispensable pour obtenir une taille et une répartition précise des niosomes. Cette méthode offre des bénéfices tels qu'une uniformité

accrue, une dimension réduite, une encapsulation idéale de la phase aqueuse et des indices de production substantiels. L'interaction sous haute pression pourrait éventuellement entraîner la dégradation de la phase lipidique [47].

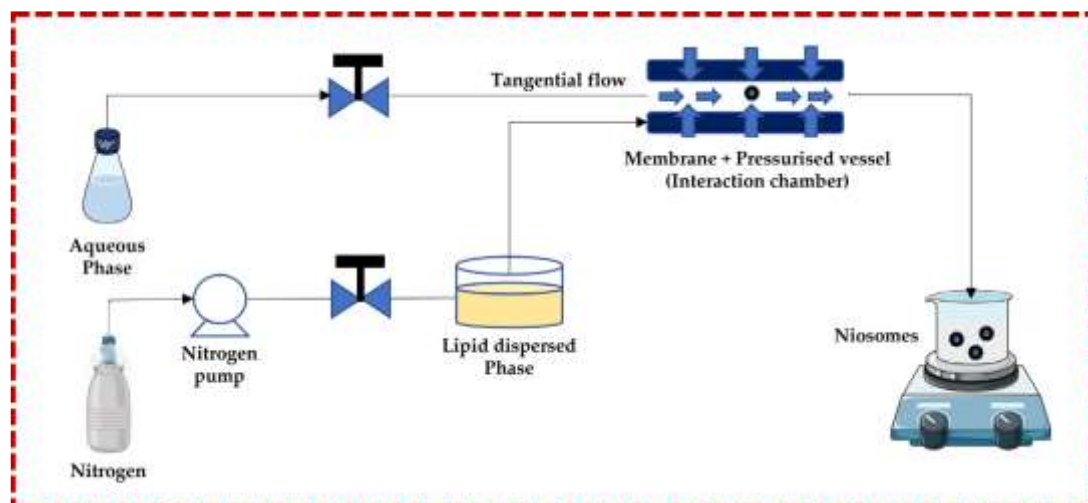


Figure 19 Schéma illustratif de la technique de micro fluidisation.

3.5.1.8 Méthode de séparation

L'étape de purification des niosomes est essentielle, car bien qu'il y ait eu des avancées dans les techniques de chargement des médicaments, l'encapsulation intégrale des molécules au sein des niosomes se révèle peu fréquente. Au cours d'expériences *in vitro* et *in vivo*, il est nécessaire d'extraire le médicament libre afin d'éviter la libération soudaine des niosomes. Les méthodes de purification comme la dialyse, la filtration sur gel et la centrifugation sont employées pour se débarrasser des molécules non capturées [48].

▪ Dialyse

À température ambiante, on effectue la dialyse de la suspension aqueuse niosomale à l'aide d'un tube de dialyse, d'une membrane de dialyse ou d'un sac en cellulose, grâce à un solvant approprié. On prélève l'échantillon à des intervalles réguliers, on le centrifuge ensuite et on procède à une analyse par spectroscopie UV ou HPLC afin de déterminer sa concentration en médicament [43].

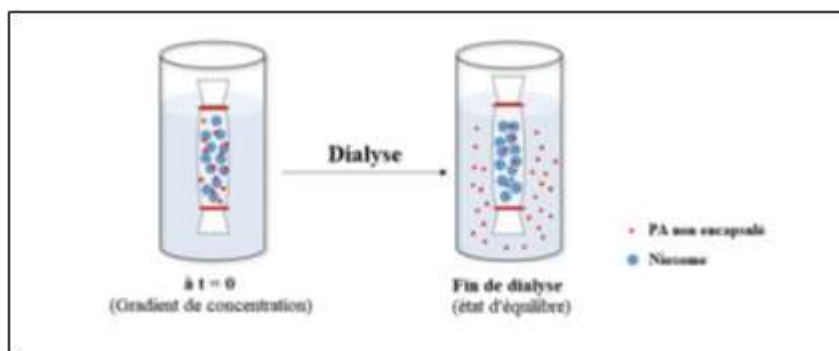


Figure 20 Schéma présentatif de la dialyse.

▪ Filtration sur gel

Le médicament non retenu est éliminé par filtration sur gel de la dispersion niosomale via une colonne Sephadex-G-50, suivie d'une élution avec une solution saline tamponnée au phosphate ou une solution saline standard [48].

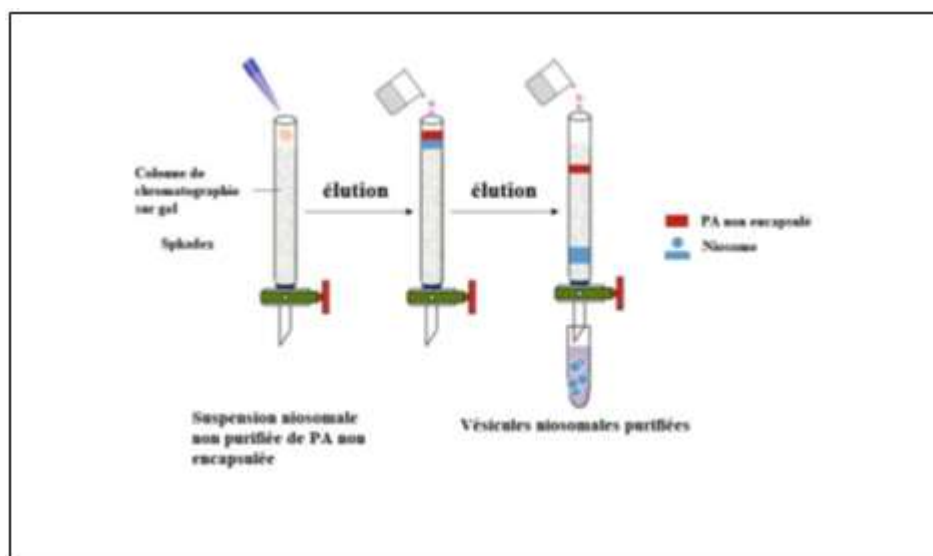


Figure 21 Schéma présentatif de la technique de la filtration sur gel.

▪ Centrifugation

Après centrifugation de la solution niosomale, le surnageant est isolé. Afin d'obtenir une suspension niosomale sans aucune trace de médicament non capturé, le culot (résidu) est d'abord lavé puis remis en suspension [48].



Figure 22 Schéma représentatif de la centrifugation.

3.6 Facteurs influençant la formulation niosomale

▪ Médicament

Le confinement du médicament dans les niosomes accroît la dimension des vésicules, probablement en raison de l'interaction entre le soluté et les têtes du tensioactif, ce qui intensifie la charge et la répulsion réciproque des bicouches de tensioactif, augmentant par conséquent la taille des vésicules. Dans les vésicules enveloppées de polyoxyéthylène glycol (PEG), une portion du médicament est capturée dans les longues chaînes de PEG, minimisant ainsi la propension à la croissance de taille. Le niveau d'emprisonnement est influencé par l'équilibre entre les propriétés hydrophiles et lipophiles du médicament [50].

▪ Equilibre hydrophile lipophile (HLB)

Ce paramètre a un impact sur la quantité et la dimension du médicament chargé. Les tensioactifs dont le HLB est entre 4 et 8 peuvent encourager la création de vésicules. L'intégration de cholestérol est essentielle pour la formation des niosomes, étant donné que les tensioactifs avec un HLB supérieur à 6 ne génèrent quasiment jamais de vésicules [48].

▪ Température de transition gel-liquide (T_c)

Elle influence l'EE, la perméabilité des membranes, ainsi que la fluidité et la stabilité. Dans les tensioactifs non ioniques, il existe une association entre la température critique et la longueur de la chaîne alkyle. La génération de niosomes « fuites » est attribuée à la température critique plus basse des chaînes alkyles plus courtes. Les tensioactifs ayant une température critique plus élevée ont beaucoup plus de chances d'être présents dans une phase

CHAPITRE 3 : ASPECT GENERAL DES NIOSOMES

gel structurée comparativement à ceux ayant une température critique plus basse, ce qui diminue les fuites bicouches [48].

▪ Quantité et type de tensioactif

Comme le montre le tableau 3, l'hydrophilie et la lipophilie du tensioactif influencent le niosome. L'accroissement de la taille de la vésicule du niosome est observé en passant d'un tensioactif Span-85 (HLB-1,8) à un Span-20 (HLB-8,6), en raison de l'augmentation de la lipophilie du tensioactif lié à la réduction de l'énergie libre de surface [43].

Les bicouches des vésicules peuvent être soit liquides, soit gélifiées, en fonction de la température, du type de lipide ou de tensioactif utilisé et de la présence d'autres éléments comme le cholestérol. En état gélifié, les chaînes alkyles présentent une structure bien organisée, alors qu'en état liquide, cette structure devient plus chaotique. Les lipides et les tensioactifs sont définis par leur température de transition de phase (TC) entre l'état gélifié et l'état liquide. De plus, la température de transition du tensioactif joue un rôle dans l'efficacité du piégeage : un Span 60 avec une TC plus élevée permet un piégeage plus efficace [50].

Tableau 4 Effet de l'hydrophilie et de la lipophilie du surfactant sur le niosome [43].

Augmentation de l'hydrophilie du surfactant	Augmentation de la lipophilie du surfactant
Faible transition de phase (TC)	Haute transition de phase (TC)
Faible poids moléculaire du médicament, plus de fuite du compartiment aqueux.	Faible poids moléculaire du médicament, moins de fuite du compartiment aqueux.
Stabilité de la suspension niosomale diminue.	Stabilité de la suspension niosomale augmente avec plus d'encapsulation.
La livraison transdermique du médicament hydrophobe s'améliore.	La toxicité diminue.

▪ Teneur en cholestérol et charge

L'intégration de cholestérol dans les niosomes a entraîné une augmentation de leur diamètre hydrodynamique ainsi que de leur capacité de capture. De manière générale, le cholestérol a deux effets : d'une part, il accroît l'organisation des chaînes dans les bicouches à l'état liquide et, d'autre part, il réduit cette organisation dans les bicouches à l'état gélifié. À une concentration élevée de cholestérol, l'état gélifié évolue vers une phase liquide structurée. L'accroissement du cholestérol dans les bicouches a provoqué une réduction de la vitesse de libération du contenu encapsulé, conduisant ainsi à une hausse de la rigidité des bicouches produites.

L'augmentation de la distance entre les bicouches successives dans la structure vésiculaire multi lamellaire est favorisée par l'existence de charges, ce qui engendre un volume global piégé plus conséquent [50].

▪ Résistance au stress osmotique

Quand on introduit une solution saline hypertonique dans la suspension de niosome, le diamètre de la vésicule se réduit. Lorsqu'une solution saline hypotonique est incorporée à la suspension de niosome, le processus de libération commence lentement, provoquant un agrandissement de la structure vésiculaire en raison de l'entrave à l'éjection du fluide vésiculaire, avant de devenir finalement très rapide grâce au surfactant. Par exemple, le span-60, qui possède un taux de change plus élevé, manifeste une plus grande tendance au piégeage. La préparation du niosome n'est pas adéquate si la valeur HLB du surfactant se situe entre 14 et 17 [43].

▪ Composition de la membrane

On peut préparer le niosome en incorporant des tensioactifs, des médicaments et divers autres additifs. Il possède plusieurs caractéristiques de perméabilité, de stabilité et de morphologie, qui peuvent être ajustées par l'incorporation de divers additifs. Les niosomes C12G2 créent un niosome polyédrique ne sont pas influencés par l'incorporation d'une concentration de solulane C24 (éther cholestérol -24-oxyéthylène). Cela empêche l'agrégation du niosome causée par la déshydratation stéarique. Le mélange C16G2 : cholestérol : solution (49 :49 :2) crée un niosome de forme sphérique. La composition de la membrane influence la dimension du niosome. Les niosomes polyédriques de C16G2 : solution C24 (91 :9) présentent une taille significative ($8,0 \pm 0,03$ mm), tandis que les niosomes sphériques de C16G2 : cholestérol : solution (49 :49 :2) ont une dimension approximative de $6,6 \pm 0,2$ mm [43].

3.7 Caractérisation de niosome

▪ Microscopie électronique à balayage

La taille des niosomes est une caractéristique cruciale. Par microscopie électronique à balayage (MEB), nous avons examiné la morphologie de surface (rondeur, lissage et agrégation) ainsi que la distribution granulométrique des niosomes. Des niosomes ont été dispersés sur un ruban adhésif double-face appliqué sur des supports en aluminium. Ils ont été disposés dans la chambre sous vide d'un microscope électronique à balayage. Pour

CHAPITRE 3 : ASPECT GENERAL DES NIOSOMES

caractériser les échantillons, nous avons eu recours à un détecteur d'électrons secondaires gazeux (conditions de travail : pression de 0,8 torr, tension d'accélération : 30,00 kV) [51].

▪ Potentiel zêta

Le potentiel zêta, souvent appelé charge de surface, est essentiel pour déterminer la stabilité physique des niosomes. L'anémométrie laser Doppler permet de mesurer le potentiel de surface, tandis que la valeur du potentiel zêta indique la force de l'attraction électrostatique entre deux particules adjacentes. On définit une stabilité correcte comme un potentiel zêta supérieur à +30 mV ou inférieur à -30 mV pour les niosomes [48].

▪ Taille des particules

On mesure généralement la taille des niosomes à l'aide d'un appareil ZetaSizer. Cet appareil dispose du programme Malvern PCS. Avant d'obtenir le résultat de l'échantillon, il faut le diluer dans de l'eau distillée. La présence d'eau distillée n'a pas d'impact sur le résultat. Le résultat est pris après dilution. La taille des particules devrait être à l'échelle du nanomètre. Ce programme a calculé la taille moyenne des niosomes. La taille des particules de la solution d'échantillon a été établie grâce à la diffusion de lumière et à l'aide d'un microscope électronique en transmission. La dimension des particules est essentielle : les niosomes de taille nanométrique favorisent une délivrance plus efficace du médicament par rapport à ceux de taille micronique [43].

▪ Efficacité de piégeage (EE)

L'efficacité du piégeage de la dispersion niosomale peut être réalisée en séparant le médicament non piégé par centrifugation par dialyse ou filtration sur gel comme décrit ci-dessus. L'analyse de la rupture totale des vésicules et l'examen de la solution résultante par une méthode de dosage appropriée permettent de déterminer le médicament qui est resté enfermé dans les niosomes [51].

EE peut être exprimé par l'équation suivante [48].

$$EE = (\text{Quantité de médicament piégée} \div \text{Quantité totale de médicament ajoutée}) \times 100 \%$$

▪ Morphologie

On examine la morphologie des niosomes à l'aide de techniques microscopiques. Concernant les échantillons liquides, on privilégie la microscopie électronique à balayage (MEB) plutôt que d'autres méthodes de microscopie électronique telles que la microscopie électronique à transmission (MET), la microscopie électronique à coloration négative (MET-NS) et la microscopie électronique à cryofracture (MET-FF) [48].

▪ Libération de médicaments in vitro

On utilise souvent une membrane de dialyse pour examiner la libération de substances thérapeutiques par les niosomes. À cet effet, une poche de dialyse est remplie d'une solution niosomale purifiée, dépourvue de médicament libre. Elle est ensuite fermée aux extrémités et positionnée dans un bécher contenant un tampon phosphate salin (PBS), à une température stable de 37 °C, sous agitation magnétique. Des échantillons sont recueillis à des intervalles réguliers, ensuite ils sont substitués par une même quantité de nouveau milieu. Ces échantillons sont par la suite soumis à des analyses avec des dosages adaptés pour quantifier la libération du médicament au cours du temps. Le paramètre crucial du comportement de libération in vitro des niosomes est affecté par différents facteurs, comme le volume d'hydratation, la composition de la membrane et la concentration en principe actif [48].

▪ Etude de stabilité

Toutes les formules niosomales ont été soumises à des études de stabilité, en les entreposant à 4°C, 25°C et 37°C dans un four à température contrôlée. Les échantillons de niosomes ont été prélevés à des intervalles réguliers (0, 1, 2 et 3 mois), examinés afin de vérifier toute modification de couleur et d'observer leurs propriétés de surface, puis évalués pour déterminer le taux de médicament retenu après leur hydratation pour former des niosomes. Ils ont ensuite été étudiés grâce à des techniques analytiques appropriées (spectroscopie UV, méthodes HPLC, etc.) [52,53].

3.8 Voies d'administration de niosomes

Le **tableau 5**. détaille les diverses voies d'administration du niosomes.

Tableau 5 Voie d'application des médicaments à base de niosomes [51].

Route d'administration	Exemples de médicaments
Voie intraveineuse	Doxorubicine, camptothécine, insuline, zidovudine, cisplatine, rifampicine
Inhalation	Acides rétinoïques tout-trans
Voie transdermique	Piroxicam, estradiol, nimésulide
Voie oculaire	Timolol maléate, cyclopentolate
Voie nasale	Sumatriptan, vaccins contre la grippe

3.9 Application

Le niosome utilisé pour plusieurs applications [51].

- On l'utilise pour l'administration destinée aux yeux.
- On l'utilise pour la sélection des médicaments.
- Le système de ciblage niosomale peut servir d'outil diagnostic.
- Le niosome a servi à examiner la nature de la réaction immunitaire déclenchée par les antigènes.
- Système de délivrances médicamenteuses transdermiques basées sur l'utilisation du niosome.
- On l'emploie comme une thérapie antinéoplasique et sélective, par exemple pour lutter contre le cancer.
- Il sert à examiner la réaction du système immunitaire.
- on l'emploie pour combattre le leishmaniose (affections cutanées et muqueuse), à l'instar du stibogluconate de sodium.
- On l'emploie pour l'administration de médicaments à base de peptides.
- Il est également utilisé dans la transmission de gènes.

3.10 Avantages des niosomes

Les niosomes présentent plusieurs avantages notables dans le domaine de la vectorisation des principes actifs :

- Ils permettent une amélioration significative de la biodisponibilité des médicaments, notamment ceux à faible solubilité ou à faible absorption orale.
- Grâce à leur structure fermée en vésicules, ils assurent une libération prolongée et contrôlée du principe actif, tout en le protégeant des conditions environnementales

défavorables (pH, enzymes, oxydation, etc.) et en ciblant plus efficacement les cellules d'intérêt.

- Les dispersions niosomales dans une phase aqueuse peuvent être émulsionnées dans une phase non aqueuse afin d'optimiser la libération et l'absorption du médicament.
- Ils sont osmotiquement actifs et physiquement stables, ce qui contribue à la stabilité du principe actif encapsulé.
- De plus, ils favorisent la pénétration cutanée des substances actives et améliorent l'efficacité des formulations orales pour les médicaments faiblement absorbés [54].

3.11 Inconvénients des niosomes

Malgré leurs nombreux avantages, les niosomes présentent certaines limites :

- Ils peuvent souffrir d'une instabilité physique au cours du temps, affectant leur efficacité.
- On observe fréquemment des phénomènes d'agrégation (coalescence des vésicules) et de fusion, pouvant entraîner des modifications de taille et de structure.
- La fuite du principe actif encapsulé est également un problème récurrent, réduisant l'efficacité thérapeutique attendue.
- Enfin, la dégradation hydrolytique des substances encapsulées peut survenir, ce qui limite la durée de conservation des formulations niosomales [55].

3.12 Conclusion

Ce chapitre a permis de présenter une vue d'ensemble sur les niosomes, en mettant en évidence leur structure, leur mode de préparation, ainsi que leurs principales propriétés. Ces vésicules, formées à partir de tensioactifs non ioniques, représentent une plateforme de choix pour l'encapsulation de divers principes actifs, qu'ils soient hydrophiles ou lipophiles. Les nombreux avantages des niosomes, tels que l'amélioration de la biodisponibilité, la protection du principe actif, la libération contrôlée, ou encore la capacité à cibler des cellules spécifiques, en font des vecteurs prometteurs pour le développement de nouvelles formulations thérapeutiques et dermo-cosmétiques. Toutefois, des limites subsistent, notamment en ce qui concerne leur stabilité physique, les phénomènes de fusion ou d'agrégation, et la fuite éventuelle du principe actif encapsulé, qui peuvent compromettre leur efficacité. Ces considérations soulignent l'importance d'une optimisation fine des paramètres de formulation et des conditions de stockage. Ainsi, une maîtrise approfondie de l'aspect

CHAPITRE 3 : ASPECT GENERAL DES NIOSOMES

général des niosomes constitue une étape essentielle pour leur mise en œuvre efficace dans des applications biologiques ciblées.

3.13 Travaux antérieurs

Tableau 6 Travaux antérieurs.

Le titre	L'auteur	L'année	Le travail	La méthode de préparation	La référence
Synthèse et caractérisation de vésicules tensioactives non ioniques chargées d'huile de curcuma (niosomes) et de son activité larvicide améliorée contre les moustiques vecteurs.	Asaithambi, K et al.	2017	Cette recherche visait à exploiter les niosomes comme moyen de transport pour encapsuler l'huile de curcuma et par la suite, d'évaluer l'effet antilarvicide des niosomes préparés sur les larves de différents stades des espèces <i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles stephensi</i> et <i>Culex quinquefasciatus</i> .	Les niosomes chargés en TO ont été synthétisés par la méthode du gradient de pH modifiée, utilisant différents tensioactifs (Span 20, 60, 80) et du cholestérol (rapport 1 :1). Le mélange, additionné de DCP 0,001 M pour éviter l'agglomération, a été dissous dans du chloroforme (20 ml), puis évaporé sous vide (évaporateur rotatif IKA-RV 10) pour former un film mince. Celui-ci a été hydraté avec une solution de citrate 300 mM (pH 4,0), soumis à des cycles de congélation-décongélation, puis chargé avec du TO (1 mg/ml). Le pH a été ajusté à 7,0–7,2 avec un tampon phosphate, suivi d'une sonication (0,5 impulsion, 2 min) et d'un chauffage à 60–62 °C (10 min). Les échantillons ont finalement été conservés à 4 °C pour analyses ultérieures.	[56]
Activité anti-inflammatoire des niosomes piégés avec de l'huile de Plai	Leelarungrayub, J et al.	2017	Cette recherche visait à examiner les propriétés antioxydantes et anti-	Des niosomes encapsulant de l'huile de Plai à 0,1 % ont été préparés par la méthode d'hydratation	[57]

CHAPITRE 3 : ASPECT GENERAL DES NIOSOMES

(Zingiber cassumunar Roxb.) par ultrasons thérapeutiques dans un modèle de rat.			inflammatoires des niosomes encapsulés dans l'huile de Plai (Zingiber cassumunar Roxb.) sur la peau sous-cutanée enflammée du rat Wistar à travers des ultrasons thérapeutiques.	du film modifiée. Le mélange de Tween 60 et de cholestérol (ratio molaire 3:7) a été dissous dans du chloroforme, puis évaporé sous vide (50 °C-70 °C) pour former un film mince, séché pendant 24 h. Le film a ensuite été hydraté avec de l'eau distillée pour obtenir une suspension de niosomes, soumise à une sonication par sonde (4 cycles de 2 s avec pauses de 2 s) pour homogénéiser la taille des particules.	
Développement, caractérisation physicochimique et évaluation antimicrobienne de l'huile essentielle de myrte niosomal.	Raeiszadeh et al.	2018	Cette étude a évalué le potentiel antimicrobien de l'huile essentielle de myrte (MEO) et de sa formulation niosomale (nMEO) contre des bactéries pathogènes impliquées dans les infections cutanées et les plaies.	Les niosomes chargés d'huile essentielle de myrte (MEO) ont été préparés par hydratation du film. Un mélange de tensioactifs (Span, Tween) et de cholestérol (Chol) dans différents ratios molaires (50 :50, 60 :40, 70 :30) a été dissous dans du chloroforme, puis combiné à une solution de MEO (2 %). Après évaporation du solvant sous vide, le film lipidique obtenu a été hydraté à 50 °C avec de l'eau déionisée, produisant une suspension niosomale à 0,5 % de MEO.	[58]
Une nouvelle formulation d'huile essentielle encapsulée dans du niosome pour prévenir la croissance	Marta Gracia - Diaz et al.	2019	Ce travail visait à examiner les propriétés antifongiques et antitoxigènes in vitro de diverses huiles essentielles des herbes	Les niosomes ont été obtenus en employant la technique d'hydratation en film mince, couplée à l'homogénéisation et la sonication, afin de produire des niosomes	[59]

CHAPITRE 3 : ASPECT GENERAL DES NIOSOMES

d'Aspergillus flavus et la contamination des grains de maïs par les aflatoxines pendant le stockage.			aromatiques (HE de Romarin, de la Menthe verte, d'Ageratum Conyzoides, de l'Origan d'Espagne) tout en développant une méthode d'encapsulation efficace utilisant des niosomes pour prévenir la contamination par les AF (aflatoxines) lors de l'entreposage du maïs.	présentant un indice de polydispersité (PDI) satisfaisant et une taille variant entre 100 et 200 µm, avec une concentration d'HE de 12 µl/ml.	
Sécurité des niosomes chargés d'huile de lavande pour la culture in vitro et les applications biomédicales.	Vilela, J et al.	2022	Cette recherche visait à examiner la toxicité du LO et des niosomes LO(LON) sur les ASC et les cellules myométriales cultivées in vitro, servant de modèles pour les cellules mésenchymateuses et les myofibroblastes.	Les niosomes (LON) ont été préparés par évaporation en phase inverse (REV). Un mélange de Span60 et de cholestérol (1:1) a été dissous dans du chloroforme-méthanol (9:1, 5 ml), puis combiné avec 50 mg d'huile essentielle. Après ajout de PBS (3 ml), le mélange a été vortexé pendant 1 min à température ambiante, puis soniqué pendant 5 min à 10 °C. L'évaporation des solvants a été réalisée par évaporateur rotatif à 65 °C (température supérieure à la transition de phase du Span60, ~53 °C, et au point d'ébullition des solvants, ~62 °C) pendant environ 40 min.	[60]
Effets cytotoxiques et antioxydants de l'huile de géranium et de l'acide ascorbique	Fahmy, S.A et al.	2023	Cette recherche avait pour objectif d'examiner les propriétés anticancéreuses et antioxydantes accrues de GO et	Les AA-GO/NS ont été préparés par hydratation en couche mince modifiée : un mélange de cholestérol, Span 60 et Tween 60 (ratio	[61]

CHAPITRE 3 : ASPECT GENERAL DES NIOSOMES

cochargés dans les niosomes contre les cellules cancéreuses du sein MCF-7.			AA lorsqu'ils sont conjointement chargés dans des nanovésicules niosomales.	2 : 1 : 1, 120 mol) et de GO a été dissous dans du chloroforme, puis évaporé sous vide (60 °C, 60 min) pour former un film lipidique. Ce film a été hydraté avec une solution d'AA dans du PBS (pH 7,4) sous agitation (60 min, 60 °C), suivi d'une sonication (5 min). Des NS vierges (sans AA ni GO) ont été préparés de la même manière. Les suspensions ont ensuite été stabilisées 45 min à température ambiante avant stockage à 4 °C pour analyses ultérieures.	
Extraction verte d'huiles essentielles à partir de résines de Pistacia lentiscus : l'encapsulation dans des niosomes a montré des effets cytotoxiques et apoptotiques préférentiels améliorés contre les cellules cancéreuses du sein et de l'ovaire.	Fahmy, S .A et al.	2023	Cette recherche a tiré parti des caractéristiques uniques des niosomes pour encapsuler l'huile essentielle issue des résines de Pistacia Lentiscus Variété chia, avec l'objectif de traiter de manière efficace les cancers de l'ovaire et du sein.	L'encapsulation du PO issu de Pistacia lentiscus dans des niosomes a été réalisée par une technique modifiée d'hydratation en couche mince. Un mélange de cholestérol, Span 60 et Tween 60 (ratio molaire 2:1:1) a été dissous dans du chloroforme/méthanol, puis évaporé sous vide à 60 °C pour former un film lipidique. Ce film a été hydraté sous agitation avec du tampon PBS (1 h, évaporateur rotatif), puis la suspension obtenue a été ultrasonifiée (5 min) pour affiner les vésicules. Les niosomes formés ont enfin été conservés à 4 °C pour caractérisation ultérieure. Les	[4]

CHAPITRE 3 : ASPECT GENERAL DES NIOSOMES

				niosomes incorporés en PO (PO/Ns) ont été élaborés de la même manière, exceptée pour l'inclusion de 1 mg/ml de PO en plus du cholestérol et des agents tensioactifs pour constituer la pellicule fine.	
Développement, caractérisation physicochimique et évaluation antimicrobienne de l'huile essentielle d'origan chargée de niosomes contre les agents pathogènes transmis par les poissons.	Sirati, R et al.	2024	Dans cette recherche, les scientifiques ont tenté d'examiner l'emploi des niosomes comme méthode de délivrance dans le but d'optimiser l'efficacité de l'huile essentielle d'origan face aux microorganismes responsables des maladies alimentaires.	La méthode employée est l'évaporation par film mince (thin-film hydration). Dans un premier temps, le cholestérol, le Span 60 et le Tween 60 sont dissous dans un mélange de chloroforme et de méthanol pour former une solution homogène. Ensuite, cette solution est évaporée sous vide à 60 °C avec une rotation de 150 tr/min, ce qui permet d'obtenir un film lipidique sec sur les parois du récipient. Enfin, le film est hydraté avec 10 ml d'une solution d'huile essentielle (1 mg/ml) dans du PBS sous agitation à 120 tr/min pendant 30 minutes, conduisant à la formation des niosomes.	[62]

CHAPITRE 4

MATERIELS ET METHODES

4 Matériels et méthodes

4.1 Introduction

Dans ce chapitre, nous présenterons l'ensemble des étapes expérimentales réalisées au cours de ce travail. Nous commencerons par l'élaboration des courbes d'étalonnage des composés étudiés, notamment le 1,8-cinéole et le camphre, à l'aide de la spectrophotométrie UV-visible. Ces courbes nous ont permis de quantifier avec précision les concentrations de ces substances dans les différentes formulations. Par la suite, nous détaillerons la méthode de préparation des suspensions niosomales contenant ces composés, en mettant l'accent sur l'optimisation des conditions de formulation. Enfin, les techniques utilisées pour la caractérisation des niosomes seront brièvement décrites, dans le but d'évaluer leurs propriétés physico-chimiques et de mieux comprendre leur comportement en tant que systèmes d'encapsulation.

4.2 Produits chimiques et matériels de préparation

4.2.1 Produits chimiques

Tableau 7 Les produits chimiques utilisés dans la préparation

CHAPITRE 4 : MATERIELS ET METHODES

Produit chimique	Image	Description	Utilisation	Forme physique	Précautions
Camphre		Composé monoterpénique extrait de l'armoise blanche. Possède des propriétés biologiques intéressantes.	Composé actif pour les tests biologiques.	Solide cristallin à odeur forte.	Irritant, à manipuler avec précaution.
1,8-cinéole		Monoterpène naturel. Principal composé de l'huile de romarin.	Standard pour les tests biochimiques.	Liquide incolore à jaune pâle.	Inflammable, éviter le contact prolongé.
Cholestérol		Réactif analytique utilisé dans les formulations de niosomes.	Stabilisant de membranes.	Solide blanc cireux.	Eviter l'inhalation et le contact prolongé.
Span 60		Surfactant non ionique utilisé dans la préparation des niosomes. Aussi appelé sorbitan monostearate.	Agent tensioactif pour niosomes.	Solide cireux blanc à jaunâtre.	Eviter l'inhalation de poussière, usage en hotte recommandé.
Ethanol absolu		Solvant organique très pur (>99%). Formule : C_2H_5OH . Masse molaire : 46,07g/mol.	Solvant, désinfectant, extraction.	Liquide incolore.	Inflammable, irritant.
2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)		Radical libre stable, de couleur violette, utilisé comme réactif pour mesurer la capacité antioxydante des composés.	Test antioxydant (méthode DPPH), recherche en biochimie et pharmacologie.	Solide cristallin violet.	Porter des gants et des lunettes de protection. Conserver à l'abri de la lumière.

CHAPITRE 4 : MATERIELS ET METHODES

TRIS-(hydroxymethyl) aminomethane		Tampon organique basique, soluble dans l'eau.	Préparation de tampons biologiques et biochimique.	Poudre blanche cristalline.	Eviter l'inhalation, contact avec les yeux. Utiliser gants et lunettes de protection.
D-Fructose		Sucre naturel simple (cétose) présent dans les fruits et le miel.	Additif alimentaire, substrat dans la fermentation.	Poudre ou cristaux blancs.	Manipuler avec propreté, peu dangereux, mais éviter l'inhalation de poussière.
acide Citrique anhydres		Acide organique faible, soluble dans l'eau, sans molécule d'eau.	Régulateur de pH, conservateur, chélateur.	Poudre blanche.	Peut irriter les yeux/peau. Porter des gants et lunettes.
Gectapen		Antibiotique.	Usage pharmaceutique.	Poudre blanche.	Porter des gants, lunettes, éviter inhalation.

4.2.2 Matériels de préparation

Tableau 8 Récapitulatif de la verrerie utilisée dans la préparation

CHAPITRE 4 : MATERIELS ET METHODES

Matériels	Description
Béchers	En verre, De différents volumes : 25ml, 50ml, 30ml. 
Spatules	En acier inoxydable, d'un côté cuillère et de l'autre côté une spatule. 
Ballon	En verre à col rodé à fond rond, de volume 100 ml. 
Eprouvettes	En verre de différents volumes 10 ml, 25 ml. 
Barreau et tige magnétique	De petites tailles, revêtues en PTFE (Polytétrafluoroéthylène). 
Tubes	Tubes coniques en polypropylène (PP) de 15 ml. 
Pipette	Instrument de laboratoire utilisé pour prélever et transférer avec précision de petits volumes de liquide. 

CHAPITRE 4 : MATERIELS ET METHODES

Thermomètre	Instrument de mesure utilisé pour déterminer la température d'un corps, d'un liquide ou d'un gaz. 
Coupelle	Petit récipient utilisé en laboratoire pour contenir, pesé, de petites quantités de substances, généralement solide. 
Fiole jaugée	Fiole en verre pour mesurer et préparer un volume précis de liquide. 
Lame médicale	Lame fine, tranchante et stérile pour réaliser des incisions précises en milieu médical ou de laboratoire. 

➤ Balance analytique

Il s'agit d'une balance de précision de la série DENVER INSTRUMENT, avec une capacité de 0,1 mg à 210 g, un écran digital avec affichage rapide et clair.

➤ Agitateur magnétique chauffant

Il s'agit d'un agitateur magnétique de la série IKA RCT utilisé pour mélanger et homogénéiser les différents composants de la formulation et, également, pour chauffer la solution de réhydratation.

➤ Évaporateur rotatif

C'est l'équipement de base dans lequel se fait notre préparation. C'est un rotavap de type IKA HB digital, sa composition est indiquée sur la **figure 23**.

○ Principe de fonctionnement

Son fonctionnement sous vide permet d'effectuer des distillations rapides tout en épargnant le produit. La base du procédé est la vaporisation et la condensation des solvants à l'aide d'un ballon vaporisateur rotatif. La distillation peut être effectuée aussi bien sous vide qu'à la pression atmosphérique.

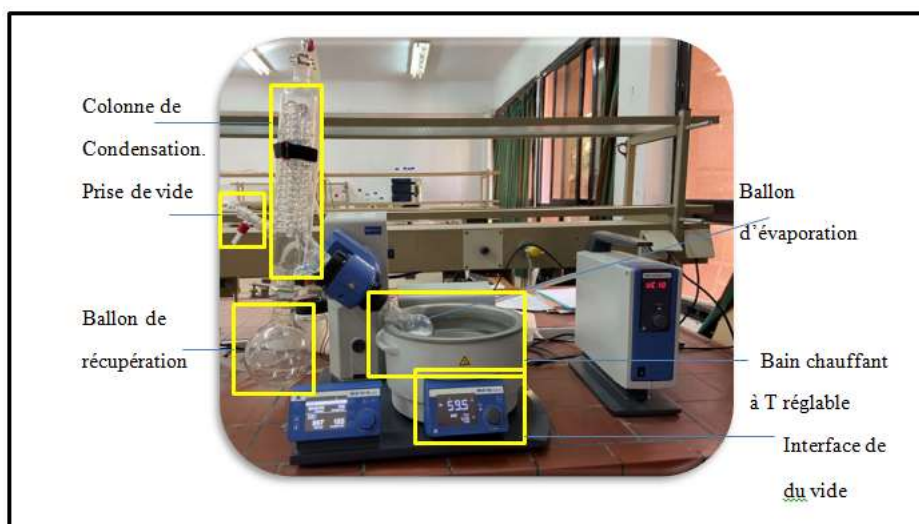


Figure 23 Évaporateur rotatif de type « IKA HB digital » et ses différents composants.

4.2.3 Matériel de caractérisation

La verrerie et les matières consommables utilisées sont indiquées dans le **tableau 9**.

CHAPITRE 4 : MATERIELS ET METHODES

Tableau 9 La verrerie et les matières consommables utilisées pour la caractérisation

Matériels	Description
Micropipettes	• Micropipette mécanique à volume réglable de 0,5 à 10μl. • Micropipette mécanique à volume réglable de 10 à 100μl. • Micropipette mécanique à volume réglable de 100 à 1000μl. 
Lames et lamelles	Pour l'observation par le microscope. 
Eppendorfs	de 2 ml utilisés pour stocker, centrifuger ou manipuler de petits volumes de liquides. 
Seringue embout de cathéter	Pour injection de la phase organique dans la phase aqueuse. 
Filtres seringue	Les membranes de 0,45 μm sont généralement utilisées pour les applications générales de filtration et d'élimination des particules. 

➤ **Centrifugeuse**

Il s'agit d'une centrifugeuse Hettich Mikro dont la vitesse de rotation peut atteindre 15 000 tr/min, ce qui permet de séparer les constituants d'un mélange sous l'effet de la force centrifuge, tout en maintenant une température contrôlée grâce à un système de réfrigération intégré.

➤ **Agitateur vortex**

C'est un mélangeur qui assure un mélange rapide et vigoureux des échantillons contenus dans des tubes, en formant un vortex à l'intérieur du tube, avant de les analyser dans le spectrophotomètre UV-Visible. Cet appareil de type « VELP SCIENTIFICA ».

➤ **Spectrophotomètre UV-Visible**

C'est un spectrophotomètre de la marque "SHIMADZU". Il permet la fonction de balayage de longueur d'onde, de cinétique et de concentration avec un affichage graphique complet. Il est utilisé pour la lecture des absorbances dans une cuvette en quartz.

➤ **Microscope optique**

Il s'agit d'un microscope optique binoculaire à trois grossissements X10, X40 et X100. Il permet l'observation de microstructures avec capture d'images en temps réel via un logiciel connecté, utilisé ici pour visualiser la morphologie des niosomes.

➤ **Plaque agitatrice multipostes**

Elle permet l'agitation simultanée de plusieurs béchers, et est utilisée dans cette étude pour homogénéiser les culots dispersés dans l'éthanol après centrifugation, en vue de leur analyse spectrophotométrique UV.

➤ **Analyseur thermique**

L'Analyseur thermique de type Parkin elmer STA 8000, est l'appareil de laboratoire utilisé pour étudier les propriétés physique d'un matériau en fonction de la température. Il permet d'analyser des phénomènes comme la fusion, la décomposition, ou les changements de phase. Ce type inclue la DSC et ATG.

4.3 Méthodes

4.3.1.1 Méthodes de préparation

4.3.1.2 Optimisation d'un système d'encapsulation du camphre et du cineole par les niosomes

4.3.1.2.1 Plan d'expériences

Pour préparer un système d'encapsulation du camphre et du cineole, une optimisation a été réalisée à l'aide d'un plan d'expériences. Le plan Box-Behnken, généré par le logiciel **MODDE 6.0**, a été choisi pour étudier l'influence de trois facteurs clés : la concentration du Span 60 (variant de 20 à 60 mg/ml), la concentration du cholestérol (de 2 à 10 mg/ml), la concentration du cineole (de 1 à 10 µl/ml) et la concentration du camphre (de 1 à 10 mg/ml). Un total de 15 expériences a été généré. L'efficacité d'encapsulation et la taille des particules obtenues ont été choisis comme réponse. La matrice expérimentale obtenue est présentée dans **le tableau 10**.

Cette approche permet d'analyser systématiquement l'impact des variables sur les propriétés du système, en vue d'identifier les conditions optimales de formulation.

Tableau 10 Matrice d'essais

Exp No	Exp Name	Cholestérol (mg/ml)	Span60 (mg/ml)	Camphre (mg/ml)	Cinéole (µl/ml)	Taille des niosomes (µm)	Efficacité (%)
1	N1	2	20	5,5	5,5		
2	N2	10	20	5,5	5,5		
3	N3	2	60	5,5	5,5		
4	N4	10	60	5,5	5,5		
5	N5	2	40	1	1		
6	N6	10	40	1	1		
7	N7	2	40	10	10		
8	N8	10	40	10	10		
9	N9	6	20	1	1		
10	N10	6	60	1	1		
11	N11	6	20	10	10		
12	N12	6	60	10	10		
13	N13	6	40	5,5	5,5		

CHAPITRE 4 : MATERIELS ET METHODES

14	N14	6	40	5,5	5,5		
15	N15	6	40	5,5	5,5		

4.3.1.2.2 Préparation des courbes d'étalonnage

Des solutions mères de 1,8-cinéole et de camphre ont été préparées en les dissolvant séparément dans de l'éthanol pur. Un volume identique de solvant a été utilisé pour les deux substances afin de garantir une homogénéité dans les conditions expérimentales. A partir de ces solutions mères, une série de dilutions a été réalisée pour obtenir une gamme de concentrations étalons.

Les absorbances des différentes solutions ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. La longueur d'onde de mesure a été choisie en fonction du maximum d'absorption de chaque composé : 206nm pour le 1,8-cinéole et 287 nm pour le camphre.

Les courbes d'étalonnage ont été obtenues en traçant l'absorbance en fonction de la concentration. Ces courbes ont permis de vérifier la linéarité de la réponse spectrophotométrique dans l'intervalle de concentrations étudié, condition indispensable pour l'utilisation quantitative de la méthode.

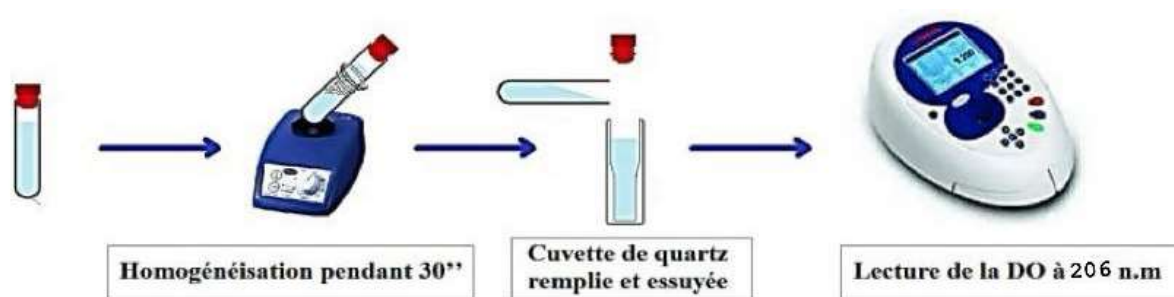


Figure 24 Description de l'étape de la lecture par spectrophotomètre.

4.3.1.3 Formulation des niosomes

La formulation des niosomes a été réalisée selon la technique (éthanol injection). Les composants lipidiques (cholestérol et Span 60) ainsi que les principes actifs (camphre ou cineole) ont été dissous dans de l'éthanol absolu (phase organique) sous agitation magnétique à 60°C pendant 30 min. Cette phase organique a ensuite été injectée progressivement dans une phase aqueuse maintenue à 60°C sous agitation à l'aide d'une seringue. L'éthanol a été éliminé par évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif. Enfin, des suspensions niosomales stables ont été obtenues, prêtes pour les caractérisations ultérieures [63].

4.3.1.4 Préparation de la formulation optimale et du placebo

Après avoir inséré les valeurs expérimentales de la taille des particules et du taux d'encapsulation dans le plan d'expérience de type Box-Behnken à l'aide du logiciel MODDE 6, une analyse statistique a été réalisée afin d'établir un modèle prédictif et de déterminer les conditions optimales de formulation. Le logiciel a permis de générer des surfaces de réponse et d'identifier les conditions expérimentales optimales permettant de minimiser la taille des niosomes tout en maximisant leur capacité d'encapsulation. A partir des résultats fournis par le modèle, la formulation optimale a été préparée expérimentalement en respectant les quantités optimales de Span60, de cholestérol et de composé actif. En parallèle, une formulation placebo, ne contenant pas le composé actif, a également été préparée dans les mêmes conditions afin de servir de témoin lors des évaluations biologiques ultérieures. Ces deux formulations ont ensuite été caractérisées afin de vérifier la concordance entre les valeurs prédites et les résultats expérimentaux, validant ainsi la fiabilité du modèle d'optimisation.

4.3.2 Méthodes de caractérisation

4.3.2.1 Centrifugation

La séparation des niosomes a été effectuée par centrifugation dans des micro tubes Eppendorf, afin d'isoler les vésicules formées des composés non encapsulés. La suspension a été soumise à une centrifugation à 15000 tr /min pendant 90 min à une température de 4° C, à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée. A l'issue de la centrifugation, le culot contenant les niosomes a été récupéré délicatement pour les analyses ultérieures, tandis que le surnageant, contenant les substances non encapsulées, a été éliminé.

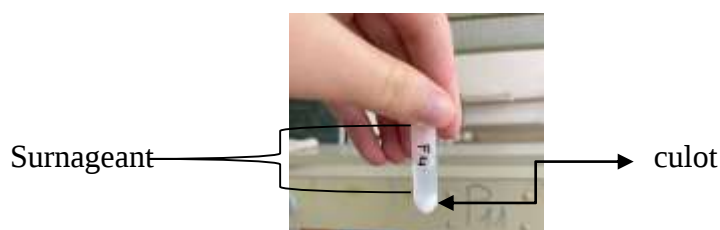


Figure 25 Solution niosomale après séparation.

▪ Evaluation de l'efficacité d'encapsulation

Après centrifugation, les culots contenant les niosomes ont été soigneusement récupérés à partir des tubes Eppendorfs, puis transférés dans des béchers propres en verre. Pour libérer le

CHAPITRE 4 : MATERIELS ET METHODES

principe actif encapsulé, chaque culot a été mélangé avec un volume déterminé d'éthanol. Les béchers ont été soumis à une agitation douce (agitation magnétique) afin de favoriser la désintégration complète des vésicules et d'assurer une extraction homogène du principe actif. La solution obtenue, contenant le composé initialement encapsulé, a ensuite été filtrée, puis analysée par une méthode analytique appropriée (spectrophotométrie UV) pour déterminer la concentration de PA libéré. L'efficacité d'encapsulation a été calculée selon la formule suivante :

$$EE (\%) = (\text{quantité de composé encapsulé} / \text{quantité totale initiale}) * 100.$$

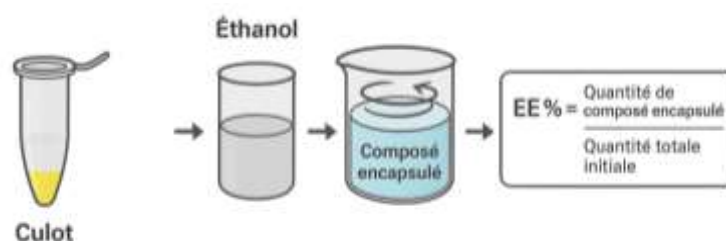


Figure 26 Schéma illustratif de la méthode d'évaluation de l'efficacité d'encapsulation d'un composé actif dans des niosomes.

▪ Evaluation de la taille des particules

Après la préparation des formulations niosomales, l'optimum et le placebo, la taille des particules a été mesurée à l'aide d'un microscope optique.

4.3.2.2 Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'analyse thermogravimétrique (ATG) qui permet la variation de masse d'un échantillon en fonction de la température, a été utilisée pour évaluer la stabilité thermique des formulations. Elle a été réalisée à l'aide d'un analyseur thermique (Parkin elmer STA 8000) à fin d'évaluer le profil de dégradation thermique des échantillons (cineole pur, suspension niosomale du cineole) ont été déposées dans une nacelle en platine. L'analyse a été conduite sous atmosphère d'azote, à un débit de (10 ml/min), avec un programme de chauffage allant de la température ambiante à 600 °C, à une vitesse de chauffage de 10 °C /min [64].

4.3.2.3 Analyse calométrique différentielle à balayage (DSC)

L'analyse différentielle à balayage (DSC) est une technique thermo analytique qui permet de mesurer les flux de chaleur associés aux transitions thermiques d'un matériau en fonction de

la température. Elle permet notamment de détecter les phénomènes tels que la fusion, la cristallisation et les interactions éventuelles entre composants. La DSC a été effectuée à l'aide d'un analyseur (Parkin elmer STA 8000) thermique dans le but de détecter les transitions thermiques caractéristiques des différents échantillons, une quantité de masse de chaque échantillon (cineole pur, suspension niosomale du cineole) a été scellé hermétiquement dans une capsule en aluminium. Les mesures ont été réalisés sous atmosphère d'azote (10ml /min), avec un programme de chauffage allant de 25 °C à 600 °C, à une vitesse de 10 °C /min.

4.3.3 Les Tests

4.3.3.1 Test chimique (DPPH)

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) a été réalisé ans le cadre de l'évaluation de l'activité antioxydante, qui repose sur la capacité des composés antioxydants à réduire le radical libre DPPH, se traduisant par une diminution de l'absorbance mesurée à 517 nm. Une solution mère de DPPH à 0,3 Mm a été préparée dans l'éthanol. Parallèlement, différentes concentrations de camphre et de cineole ont été préparées dans l'éthanol, sous agitation magnétique. Des solutions ont également été élaborées en mélangeant la formulation optimale de camphre et de cineole dans un volume approprié d'éthanol, une solution témoin positive a été préparée en dissolvant une quantité déterminée de la vitamine C (acide ascorbique) dans un volume d'éthanol. Enfin, 1 ml de la solution de DPPH a été ajouté à chaque échantillon (camphre, cineole, mélange et témoin positif) [65]. Les mélanges ont été incubés à l'abri de la lumière pendant 30 min, puis les absorbances ont été mesurés à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le pourcentage d'inhibition de radical DPPH a été calculé selon la formule suivante :

% d'inhibition = $[(AC-AS) / AC] * 100$, permettant ainsi de comparer l'efficacité anti oxydante des différentes formulations étudiées.

Avec

AC : c'est l'absorbance de la solution DPPH (témoin négatif).

AS : c'est l'absorbance de l'échantillon.



Figure 27 Solution DPPH.

4.3.4 Test biologique

4.3.4.1 Cytotoxicité et cryopréservation de la semence de type ovine

4.3.4.1.1 Préparation des échantillons et traitement des spermatozoïdes

Dans un premier temps, une solution tampon de type TRIS a été préparée pour assurer un environnement adéquat à la survie et à la motilité des spermatozoïdes. Cette solution était composée de TRIS-(hydroxyméthyl) aminométhane, de fructose (source d'énergie), d'acide citrique (agent tampon, et d'antibiotique).

Par la suite, différentes solutions de traitement ont été préparées. Il s'agissait de :

- Camphre seul;
- Camphre encapsulé dans des niosomes ;
- Cineole seul ;
- Cineole encapsulé dans des niosomes ;
- Un témoin négatif (blanc) ;
- Un témoin contrôle positif ;

4.3.4.1.2 Évaluation de la motilité des spermatozoïdes par analyse assistée (CASA)

Le sperme a été prélevé à partir d'une gonade de type ovin fraîche. Après récupération, il a été transféré dans un tube Eppendorf stérile.

Par la suite, les différentes solutions de traitement, préalablement préparées (solution de TRIS, camphre, cineole, niosomes, etc.), ont été distribuées à raison de 900 µl dans des tubes Eppendorfs séparés. Ensuite, 100µl de sperme ont été ajoutés à chacun des tubes contenant les traitements respectifs. Les échantillons ont été vortexés afin d'assurer une bonne homogénéisation, puis incubés à 4°C afin de stimuler des conditions de cryoconservation qui ont été faites allant de 0 à 96 h, ainsi qu'une évaluation de la cytotoxicité sur une période de 0 à 60 min. L'analyse de la motilité des spermatozoïdes a été réalisée à l'aide du système d'analyse assistée par ordinateur CASA (computer Assisted Sperm Analysis). Le logiciel CASA a permis la mesure automatique de la vitesse en ligne droite (VSL) [63].

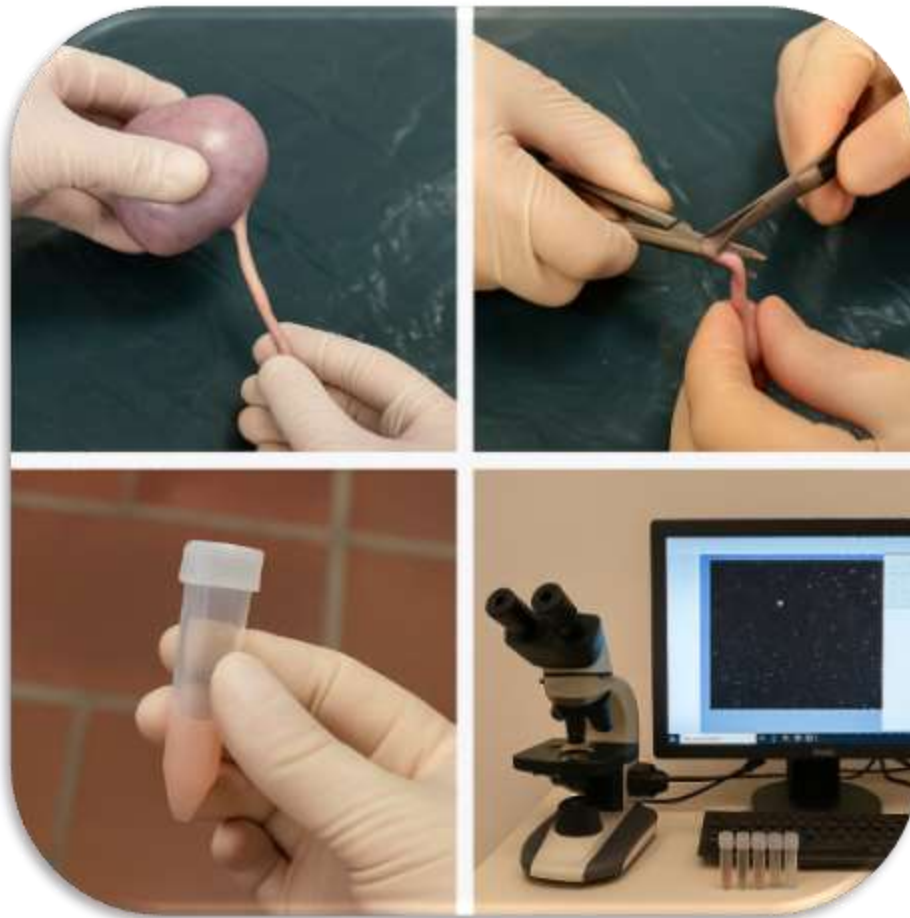


Figure 28 Étapes du test spermatique.

CHAPITRE 5

RESULTATS ET DISCUSSIONS

5 Résultats et discussions

Introduction

Ce chapitre présente et analyse les résultats de l'étude portant sur l'encapsulation du camphre et du cinéole, principaux constituants de l'armoise blanche et du romarin, à l'aide de niosomes. L'objectif est d'obtenir des niosomes de taille minimale avec un taux d'encapsulation maximal, en optimisant les paramètres de formulation à l'aide d'un plan d'expérience.

5.1 Préparation des formulations niosomales

5.1.1 Le camphre

a) Courbe d'étalonnage

Le dosage par spectrophotométrie UV-visible a permis d'établir la courbe d'étalonnage du camphre, en représentant l'absorbance en fonction de leur concentration, comme illustré dans la **Figure 29**.

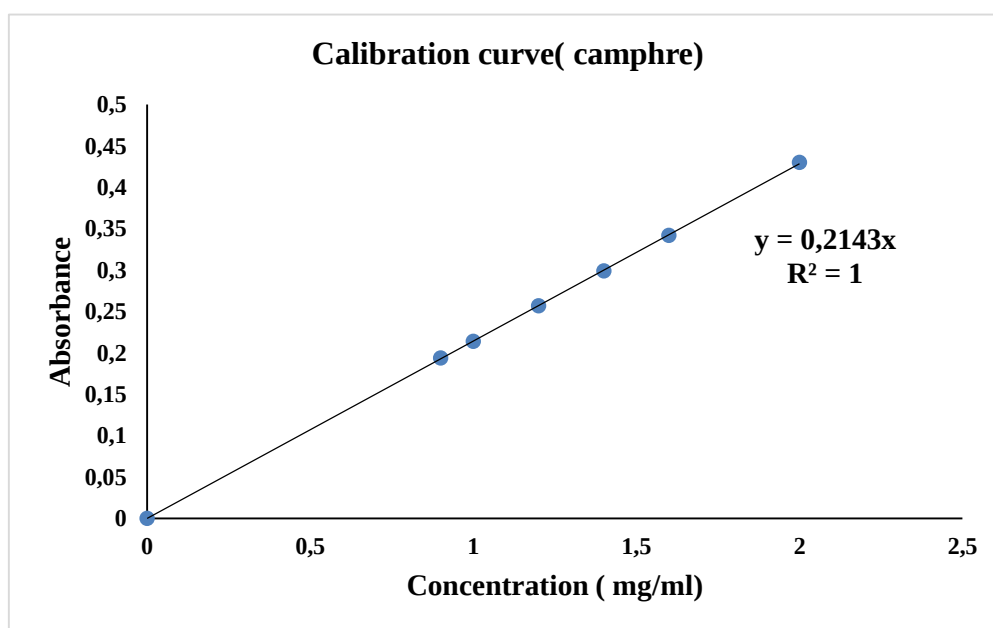


Figure 29 Courbe d'étalonnage du camphre.

- Interprétations

La courbe d'étalonnage obtenue pour le camphre (**Figure 1**) révèle une linéarité parfaite sur la plage de concentration de 0 à 2 mg/ml, exprimée par l'équation $y=0,2143x$ et un coefficient de détermination exceptionnel $R^2=1$. Cette relation linéaire met en évidence une corrélation directe et exacte entre l'absorbance mesurée et la concentration en camphre, démontrant

l'application rigoureuse de la loi de Beer-Lambert. La pente (0,2143) reflète la sensibilité analytique de la méthode, traduisant la variation d'absorbance par unité de concentration. Cette sensibilité permet de déterminer avec précision la concentration d'échantillons inconnus par interpolation directe.

b) Détermination des réponses du plan expérimental

Après avoir réalisé la préparation des suspensions niosomales (Camphre-niosome) en variant les quantités du Span 60 et du Cholestérol conformément au plan d'expérience, nous avons réussi à déterminer à la fois le taux d'encapsulation et les tailles des niosomes (voir le **Tableau 11**).

Tableau 11 Résultats expérimentaux de la matrice (Camphre).

Exp No	C Cholestérol (mg/ml)	C Span 60 (mg/ml)	Camphre (mg/ml)	Taille des niosomes (µm)	Taux d'encapsulation (%)
1	2	20	5,5	1,44	1,28
2	10	20	5,5	1,31	6,34
3	2	60	5,5	1,4	3,9
4	10	60	5,5	1,63	2,28
5	2	40	1	1	15,48
6	10	40	1	1	15,01
7	2	40	10	1,56	2,87
8	10	40	10	1,42	1,52
9	6	20	1	0,91	18,74
10	6	60	1	1,2	14,92
11	6	20	10	1,6	1,85
12	6	60	10	1,5	2,5
13	6	40	5,5	1,4	5,91
14	6	40	5,5	1,2	4,4
15	6	40	5,5	1,3	5,93

- Interprétation

Les résultats obtenus montrent que la taille des niosomes et le taux d'encapsulation varient selon les quantités de cholestérol, de Span 60 et de camphre utilisées. La taille des niosomes se situe entre 0,91 µm et 1,56 µm, tandis que le taux d'encapsulation varie de 1,28% à 18,74%. Le meilleur taux d'encapsulation (18,74%) est observé lorsque la formulation contient peu de cholestérol (2mg), une quantité moyenne de Span 60 (40mg) et une quantité maximale de camphre (10mg). Ce résultat est en accord avec les travaux d'Aziz et al. (2020), qui ont montré que le cholestérol stabilise la bicouche niosomale en réduisant la perméabilité et les fuites du principe actif, mais qu'en excès, il rigidifie la membrane, réduisant ainsi l'espace interne disponible pour l'encapsulation [66].

Les résultats concordent également avec ceux de Chen et al. (2019), qui ont démontré que les formulations à base de Span 60 présentent une bonne stabilité et un fort potentiel d'encapsulation pour les composés lipophiles [67]. Cela suggère qu'une faible concentration de cholestérol favorise l'encapsulation du camphre. Goyal et al. (2015), dans une étude sur le peroxyde de benzoyle, ont observé un phénomène similaire : à des concentrations trop élevées, le principe actif induit une instabilité de la membrane et une augmentation de la taille des vésicules [68].

En ce qui concerne la taille des niosomes, les plus petites dimensions sont obtenues avec de faibles concentrations de camphre et de cholestérol. Ces observations sont en accord avec celles de Yasamineh et al. (2022), qui ont montré qu'une taille réduite des niosomes améliore la surface spécifique des vésicules, augmentant ainsi leur capacité d'encapsulation [69].

c) Modèles mathématiques

La modélisation par le plan d'expérience box-Behnken nous a permis d'obtenir le modèle suivant :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3.$$

 a_0 : terme constant de l'équation.

 Les constantes : a_1, a_2, a_3 sont les coefficients linéaires polynomiales.

 a_{11}, a_{22}, a_{33} : effets quadratiques.

Réponse (camphre) = $a_0 + a_1\text{chol} + a_2\text{span} + a_3\text{cam} + a_{11}\text{chol}^2 + a_{22}\text{span}^2 + a_{33}\text{cam}^2 + a_{12}\text{chol*span} + a_{13}\text{chol*cam} + a_{23}\text{span*cam}$.

Taille des niosomes = $1,3 - 0,004\text{chol} + 0,058\text{span} + 0,246\text{cam} + 0,043\text{chol}^2 + 0,101\text{span}^2 - 0,098\text{cam}^2 + 0,0899\text{chol*span} - 0,035\text{chol*cam} - 0,097\text{span*cam}$.

Taux d'encapsulation = $5,413 + 0,202\text{chol} - 0,576\text{span} - 6,926\text{cam} - 1,372\text{chol}^2 - 0,590\text{span}^2 + 4,679\text{cam}^2 - 1,67\text{cho*span} - 0,22\text{cho*cam} + 1,117\text{span*cam}$.

Ce modèle offre la possibilité de déterminer un optimum, qui sera examiné ultérieurement.

d) Analyse statistique

Les paramètres et les valeurs statistiques présentés dans la (Figure2) et (Tableau2) sont R^2 et Q^2 , qui représentent respectivement l'aptitude du modèle à expliquer et à prédire les résultats observés. Dans notre étude, pour la taille des niosomes, les valeurs de R^2 et Q^2 se situent autour de 0,960 et 0,749, ce qui indique que le modèle est capable d'expliquer la variation des données. De même, pour le taux d'encapsulation, les valeurs de R^2 et Q^2 atteignent environ 0,987 et 0,831, ce qui témoigne également de la qualité explicative et prédictive du modèle.

Lorsque ces paramètres se rapprochent de 1, cela indique que le modèle est valide et fiable. En revanche, lorsque ces paramètres tendent vers 0, le modèle ne peut ni expliquer la variation des données ni fournir des prédictions précises, suggérant ainsi qu'il ne serait pas utilisable.

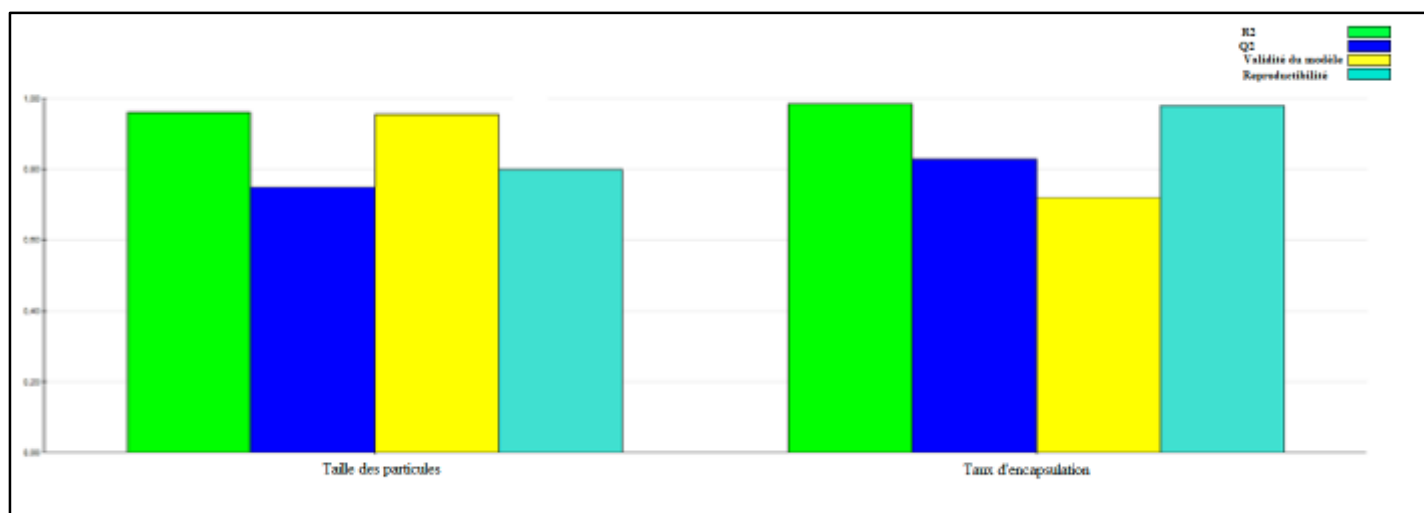


Figure 30 Facteurs statistiques explicatifs du modèle du plan d'expérience 'niosomes de camphre'.

Les valeurs numériques des facteurs statistiques les plus significatifs sont récapitulées dans le **Tableau 12**.

Tableau 12 Présentation des valeurs de l'analyse statistiques.

(Camphre)	R2	R2 Adj	Q2	Reproductibilité
Taille des Niosomes	0,960	0,888	0,749	0,801
Taux d'encapsulation	0,987	0,963	0,831	0,979

e) Etude des effets propres

▪ L'influence des facteurs sur la taille des niosomes

Les effets propres des facteurs sur les tailles des niosomes sont présentés dans la (**Figure 3**).

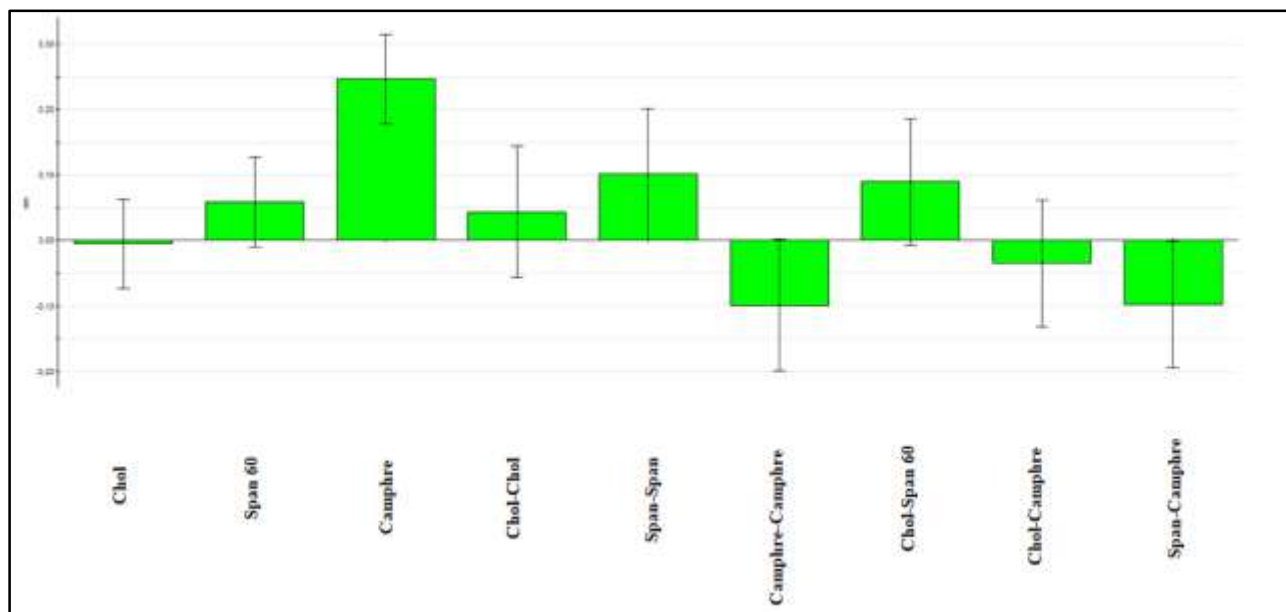


Figure 31 Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la taille des niosomes.

Nous remarquons que le Span60, le Camphre, ainsi que les interactions Chol-Chol, Span-Span et Chol-Span60 ont un effet positif sur la taille des niosomes, ce qui se traduit par une augmentation (barre dirigée vers le haut). En revanche, le Chol, les interactions Camphre-Camphre, Chol-Camphre et Span-Camphre ont une influence négative sur la taille des niosomes ce qui se traduit par une diminution de la taille (barre dirigée vers le bas).

Ces observations sont en accord avec les travaux de Zolghadri et al. (2023), qui ont montré que le Span 60 favorise la formation de vésicules stables de taille plus grande en raison de sa structure rigide [70]. De même, l'ajout de camphre, un composé lipophile, peut perturber l'organisation de la bicouche et favoriser l'élargissement des vésicules. En revanche, le cholestérol seul et ses interactions avec le camphre (Camphre-Chol, Chol-Camphre) ou avec le Span 60 (Span-Camphre) ont un effet négatif sur la taille, conduisant à des niosomes plus petites. Ces résultats corroborent ceux de Ruwizhi et al. (2020), qui ont montré qu'une concentration modérée de cholestérol stabilise la bicouche et réduit la taille des vésicules en diminuant leur fluidité [71]. Par ailleurs, Yasamineh et al. (2022) ont mis en évidence qu'une taille réduite favorise une plus grande surface spécifique, bénéfique pour l'efficacité d'encapsulation [69].

▪ Les effets propres des facteurs sur le taux d'encapsulation

Les effets propres des facteurs sur le taux d'encapsulation sont présentés dans la (Figure 4)

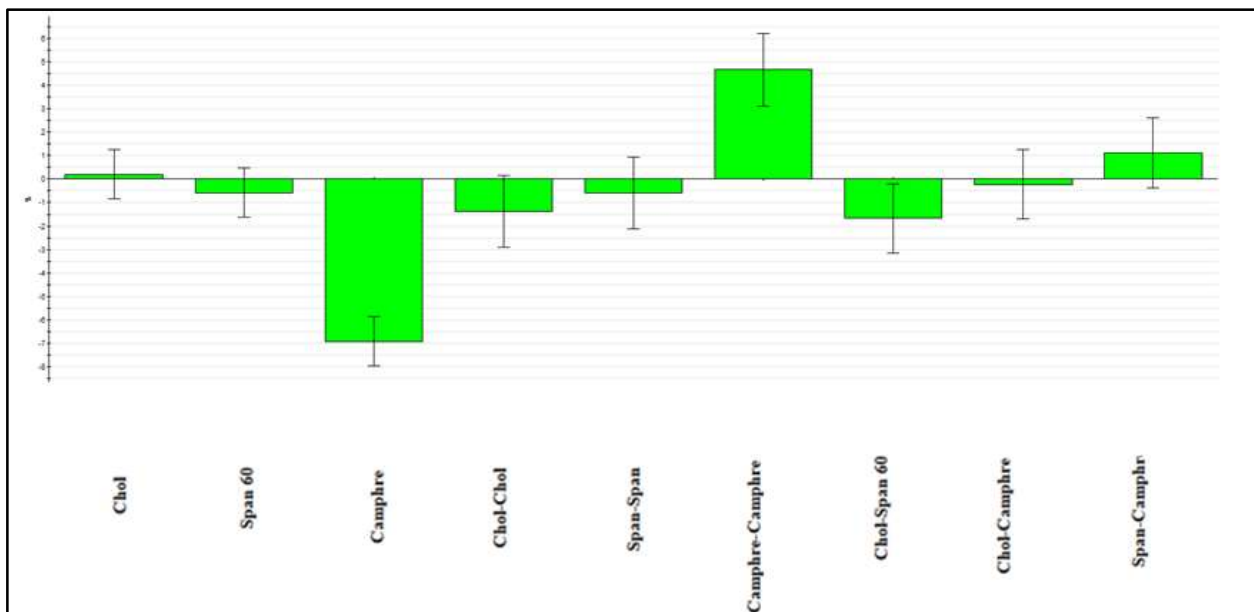


Figure 32 Histogramme représente l'influence des facteurs sur le taux d'encapsulation.

Le Chol et les interactions Camphre-Camphre et Span-Camphre exercent un effet positif sur le taux d'encapsulation. Le span, camphre et les interactions Chol-Chol, span-span, chol-span et chol-camphre ont une influence négative sur le taux d'encapsulation.

Le cholestérol est souvent utilisé dans les formulations de liposomes ou de nanoparticules pour stabiliser les membranes lipidiques. Son effet positif sur le taux d'encapsulation est cohérent avec des études antérieures, comme celles de Liu et al. (2019), qui ont montré que le cholestérol améliore l'encapsulation des monoterpènes (ex. limonène) en réduisant la perméabilité de la membrane lipidique [72].

Cependant, d'autres travaux (Pando et al. 2017) ont montré des résultats opposés, indiquant ainsi que le Span peut avoir un effet positif lorsqu'il est utilisé à des concentrations optimales [73].

Le camphre, bien qu'étant le composé à encapsuler, pourrait réduire le taux d'encapsulation en raison de ses propriétés volatiles ou de son interaction compétitive avec d'autres lipides. Cela rejoint les observations de Tavares et al. (2021) sur l'encapsulation du menthol, où une forte concentration en monoterpène diminuait la stabilité des nanoparticules [74].

En revanche, l'étude de Gortzi et al. (2016) ont rapporté que des taux d'encapsulation élevés pour des monoterpènes comme le thymol, suggérant que la nature chimique du composé (polarité, volatilité) jouent un rôle clé [75].

L'interaction positive Camphre-Camphre pourrait indiquer un effet coopératif à certaines concentrations, tandis que l'interaction négative Chol-Camphre suggère une compétition pour les sites d'incorporation dans la membrane. Ces résultats sont partiellement en accord avec une étude de López-Pinto et al. (2022) sur les interactions entre le cholestérol et les terpènes dans les systèmes lipidiques [76].

L'effet négatif des interactions Span-Span et Chol-Span pourrait refléter une perturbation des assemblages lipidiques, comme décrit par Battaglia et al. (2019) [77].

f) Détermination des conditions optimales

Afin d'obtenir des niosomes les plus petits possible et à des taux d'encapsulation les plus élevés possible dans l'intervalle de travail, une optimisation a été réalisée à l'aide des modèles obtenus, les conditions optimales de formulation des niosomes sont présentées dans le **Tableau 13**.

Tableau 13 Les conditions optimales des tailles des niosomes et le taux d'encapsulations.

C camphre	C Span	C Chol	Tailles des niosomes	Taux d'encapsulations
1,00 mg/ml	20,00 mg/ml	8,89 mg/ml	0,88 μ m	18,92 %



Figure 33 Suspension niosomale

- Résultats

Pour atteindre l'optimum, les résultats suggèrent l'utilisation d'une concentration de 1,00 mg/ml de camphre et de 20,00 mg/ml de span et 8,89 mg/ml de cholestérol pour obtenir la taille et le taux désirés.

Afin de valider et vérifier la conformité des conditions obtenues, deux types de suspensions niosomales optimales ont été préparé : l'une contenant du camphre et l'autre sans (placebo).

g) Détermination de la taille de la suspension niosomale optimale

Après avoir réalisé la préparation des suspensions niosomales selon les paramètres définis dans le plan d'expérience, nous avons pu évaluer la taille des niosomes à l'aide d'un microscope optique, nous avons obtenu une taille de 0,86 μm voir la (Figure 5) pour l'optimum.

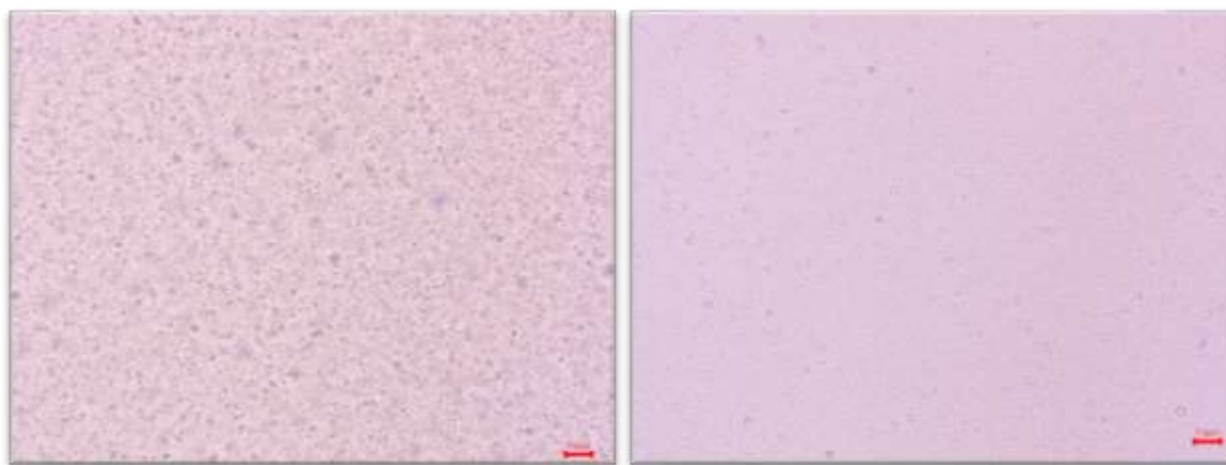


Figure 34 Taille des niosomes formés (optimum Camphre et placebo) évaluée à l'aide d'un microscope optique.

h) Détermination de taux d'encapsulation de la suspension niosomale optimale

Après avoir préparé la suspension niosomale avec les conditions proposées par le plan d'expérience, nous avons pu déterminer le taux d'encapsulation qui est de 20,14%.

Le taux d'encapsulation a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$EE = (\text{Quantité de PA piégée} \div \text{Quantité totale PA ajoutée}) \times 100\%$$

- Observation et interprétation

Les résultats expérimentaux indiquent que la taille des niosomes correspond aux valeurs visées, cependant le taux d'encapsulation est légèrement supérieur à ce qui a été prédit par les plans d'expérience. Le fait que la taille des niosomes corresponde aux prévisions indique que le protocole de formulation est robuste et reproductible. L'efficacité d'encapsulation légèrement supérieure suggère que le système niosomal est particulièrement adapté pour

encapsuler le camphre, ce qui pourrait améliorer sa biodisponibilité et son efficacité thérapeutique.

5.1.2 Le cineole

a) Courbe d'étalonnage

Le dosage par spectrophotométrie UV-visible a permis d'établir la courbe d'étalonnage du cineole, en représentant l'absorbance en fonction de leur concentration, comme illustré dans la **Figure 35**.

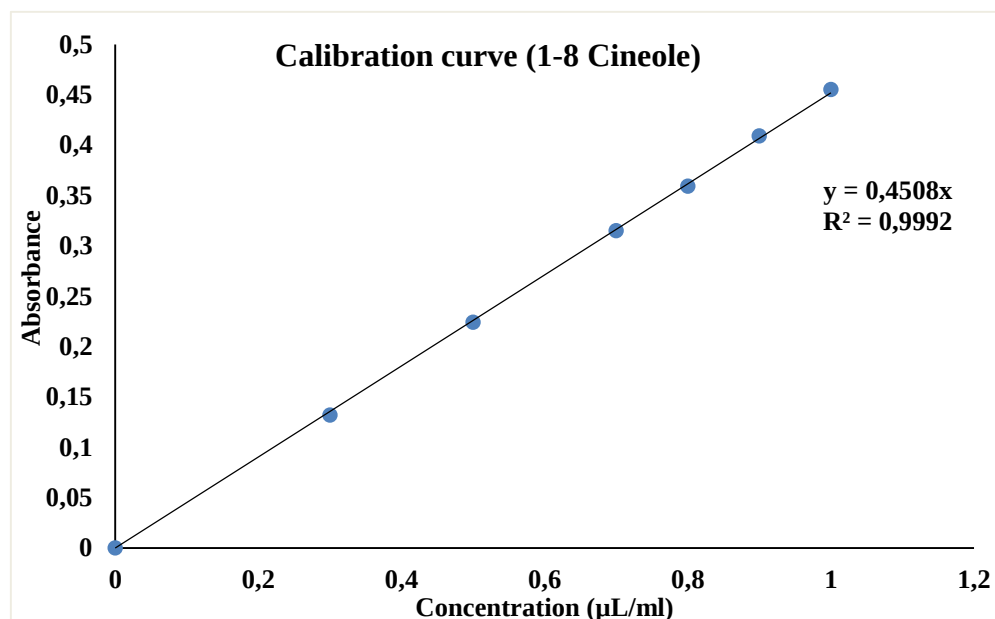


Figure 35 Courbe d'étalonnage du cineole.

- Interprétations

La courbe d'étalonnage obtenue pour le 1,8-cinéole (**Figure 6**) présente une linéarité remarquable sur la plage de concentration allant de 0 à 1 µl/ml, caractérisée par une équation de droite $y=0,4508x$ et un coefficient de détermination $R^2=0,9992$. Ces résultats confirment la conformité de la méthode à la loi de Beer-Lambert, indiquant une corrélation presque parfaite entre l'absorbance mesurée et la concentration en 1,8-cinéole. La pente élevée (0,4508) met en évidence la sensibilité de la méthode, soulignant sa capacité à détecter avec précision les variations de concentration dans l'échantillon.

b) Détermination des réponses du plan expérimental

Après avoir préparé les suspensions niosomales contenant du cineole en faisant varier les quantités du Span 60 et de cholestérol selon le plan d'expérience établi, nous avons pu déterminer à la fois le taux d'encapsulation ainsi que la taille des niosomes obtenues (voir le **Tableau 14**).

Tableau 14 Résultats expérimentaux de la matrice (cineole).

Exp No	C Cholestérol (mg/ml)	C Span 60 (mg/ml)	Cineole (µl/ml)	Taille des niosomes (µm)	Taux d'encapsulation (%)
1	2	20	5,5	1,21	4,95
2	10	20	5,5	1,82	13,72
3	2	60	5,5	2,95	5,96
4	10	60	5,5	1,64	20,84
5	2	40	1	1,32	5,05
6	10	40	1	1,78	19,01
7	2	40	10	1,38	9,6
8	10	40	10	0,67	16,57
9	6	20	1	1,08	9,65
10	6	60	1	1,48	15,04
11	6	20	10	0,57	8,48
12	6	60	10	1,43	12,26
13	6	40	5,5	1,7	13,61
14	6	40	5,5	1,94	15,7
15	6	40	5,5	2	14,9

- Interprétation

Ces résultats montrent que la taille des niosomes varie entre 0,57 µm et 2,95 µm, tandis que le taux d'encapsulation du cineole va de 4,95% à 20,84%. Le meilleur taux d'encapsulation (20,84%) est obtenu avec une forte concentration de cholestérol (10mg), de Span (60mg) et une quantité moyenne de cineole (5,5µl), ce qui suggère que l'association de quantités élevées de tensioactif et de cholestérol favorise l'encapsulation du cineole. Ces résultats appuient les conclusions de Salem et al. (2020) qui ont démontré qu'un ratio élevé cholestérol/tensioactif améliore l'incorporation de molécules hydrophobes dans la bicouche lipidique. Cette amélioration s'explique par la capacité du cholestérol à rigidifier la membrane tout en augmentant sa capacité de solubilisation des composés hydrophobes comme le cineole [78].

A l'inverse, les plus faibles taux sont observés avec de faibles concentrations de cholestérol et de Span (Expl ; essai 1), montrant l'importance de ces composants dans la stabilisation et l'incorporation du cineole.

Concernant la taille des niosomes, les plus petites tailles sont obtenues à des concentrations moyennes ou élevées en cholestérol, comme dans l'essai 11 (0,57 μm), ce qui peut indiquer un effet structurant du cholestérol sur la membrane niosomale.

Les résultats concernant la taille des niosomes (0,57-2,95 μm) sont comparables à ceux rapportés par El-Harairy et al. (2021) pour des niosomes chargés en thymol (0,2-3,1 μm), il a été rapporté que des concentrations intermédiaires de cholestérol (6 mg) et de Span 60 (40 mg) permettent d'obtenir des tailles optimales ($\sim 1,7$ μm , Exp. No 13-15), confirmant l'importance d'un équilibre entre ces deux composants pour la formation de niosomes stables [79].

c) Modèle mathématique

La modélisation par le plan d'expérience box-Behnken nous a permis d'obtenir le modèle suivant :

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3.$$

 a_0 : terme constant de l'équation.

 Les constantes : a_1, a_2, a_3 sont les coefficients linéaires polynomiales.

 a_{11}, a_{22}, a_{33} : effets quadratiques.

Réponse (cineole) = $a_0 + a_1\text{chol} + a_2\text{span} + a_3\text{cin} + a_{11}\text{chol}^2 + a_{22}\text{span}^2 + a_{33}\text{cin}^2 + a_{12}\text{chol*span} + a_{13}\text{chol*cin} + a_{23}\text{span*cin}$.

Taille des niosomes = $1,88 - 0,118\text{chol} + 0,352\text{span} - 0,201\text{cin} + 0,086\text{chol}^2 - 0,061\text{span}^2 - 0,678\text{cin}^2 - 0,48\text{chol*span} - 0,292\text{chol*cin} + 0,115\text{span*cin}$.

Taux d'encapsulation = $14,736 + 5,572\text{chol} + 2,162\text{span} - 0,23\text{cin} - 1,0845\text{chol}^2 - 2,284\text{span}^2 - 1,0945\text{cin}^2 + 1,527\text{chol*span} - 1,747\text{chol*cin} - 0,402\text{span*cin}$.

Ce modèle offre la possibilité de déterminer un optimum, qui sera examiné ultérieurement.

d) Analyse statistique

La (Figure 7) présente les paramètres R^2 , Q^2 , la validité du modèle et sa reproductibilité pour deux réponses : la taille des niosomes et le taux d'encapsulation. (Tableau 5) Pour la taille des niosomes, le coefficient de détermination (R^2) est très élevé, avoisinant 0,975, ce qui indique une excellente capacité du modèle à expliquer la variabilité des données. Le

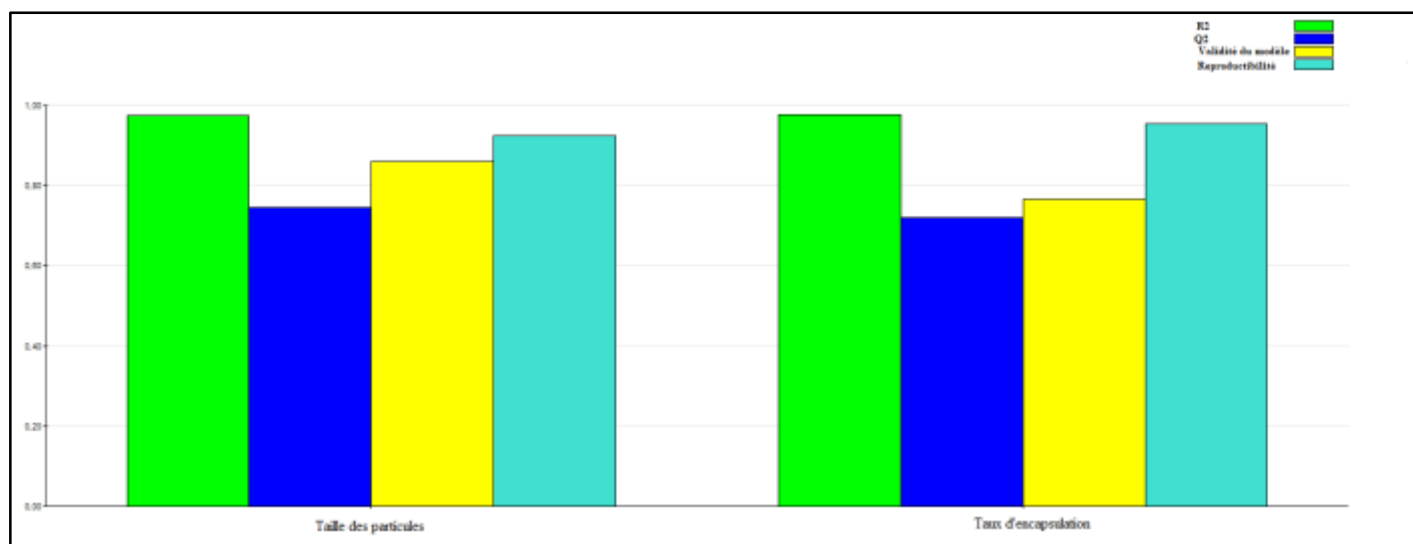


Figure 36 Facteurs statistiques du plan d'expérience pour le cineole.

Les valeurs numériques des facteurs statistiques les plus significatifs sont récapitulées dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 Présentation des valeurs de l'analyse statistiques.

(Cineole)	R2	R2 Adj	Q2	Reproductibilité
Taille des niosomes	0,975	0,929	0,746	0,924
Taux d'encapsulation	0,977	0,935	0,721	0,954

e) Etude des effets propres

▪ L'influence des facteurs sur la taille des niosomes

Les effets propres des facteurs sur les tailles des niosomes sont présentés dans la (**Figure 8**).

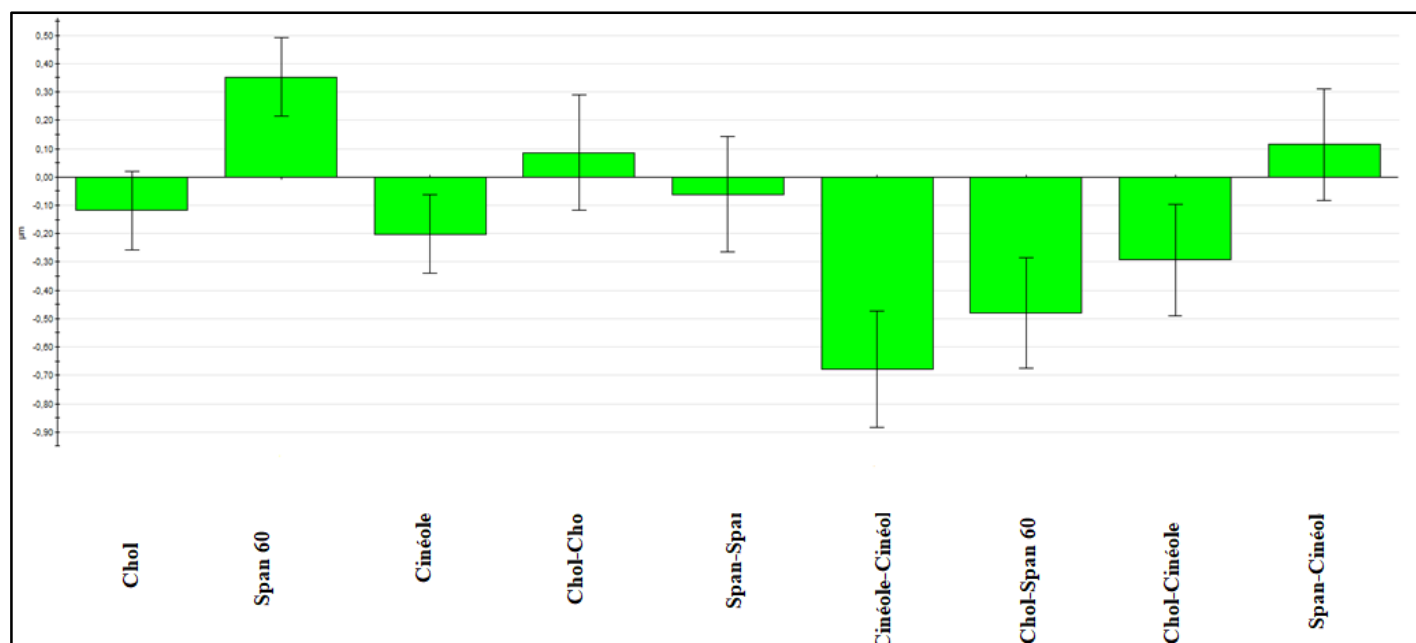


Figure 37 représente l'influence des facteurs sur la taille des niosomes.

À partir de l'histogramme, nous constatons que le Span 60, ainsi que les interactions Chol-Chol, Span-Span et Span-cineole ont un effet positif sur la taille des niosomes, comme l'indiquent les barres orientées vers le haut. Cela signifie que l'augmentation de ces facteurs contribue à une augmentation de la taille des niosomes. Cette observation est en accord avec les résultats de Mason et al. (2006), qui ont montré que le Span 60, un tensioactif non ionique, favorise la formation de structures vésiculaires multilamellaires et augmente la viscosité du système, conduisant à des niosomes de plus grande taille [80].

En revanche, nous observons que le Chol, et le cineole ainsi que les interactions Cin-Cin, Chol-Cin et Chol-Span 60 présentent un effet négatif, entraînant une diminution de la taille des niosomes, Mohammadi et al. (2024). En effet, le cholestérol est reconnu pour sa capacité à rigidifier la bicouche lipidique en s'insérant entre les chaînes acyles des lipides, ce qui limite la flexibilité des vésicules [81].

▪ Les effets propres des facteurs sur le taux d'encapsulation

Les effets propres des facteurs sur le taux d'encapsulation sont présentés dans la (Figure 9)

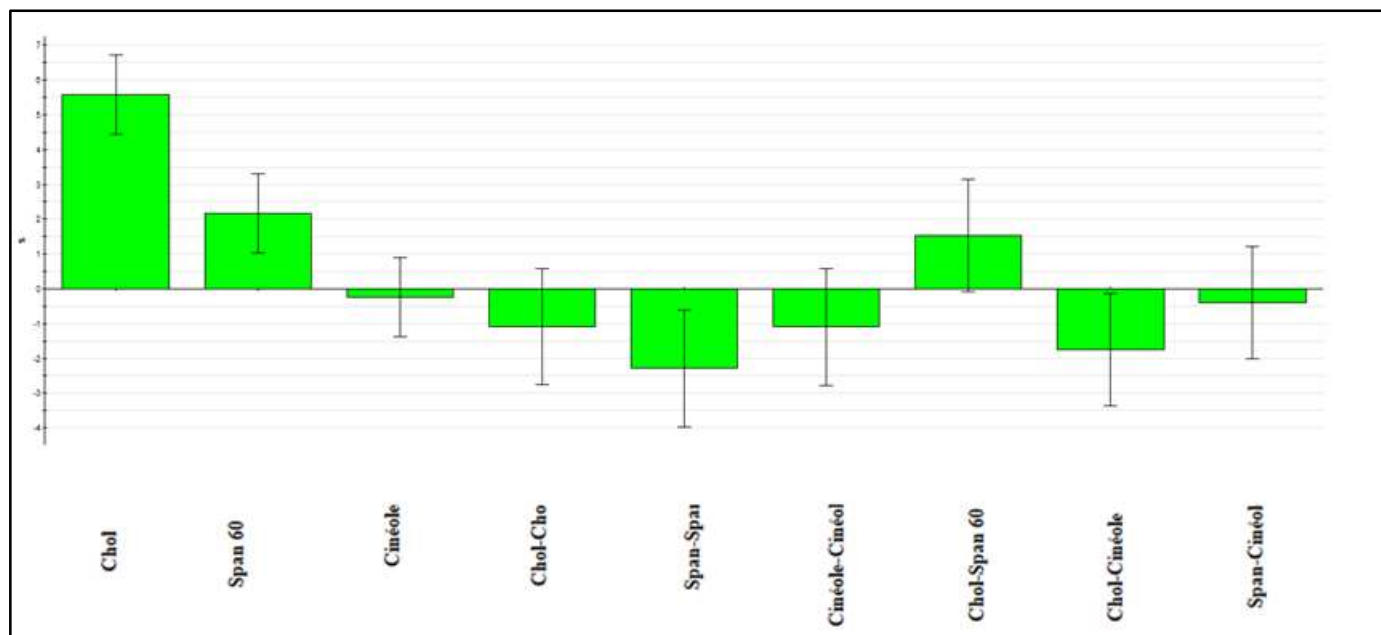


Figure 38 Histogramme représente l'influence des facteurs sur le taux d'encapsulation.

Le Chol, le Span 60 ainsi que leur interaction Chol-Span 60 exercent un effet positif sur le taux d'encapsulation. Ces observations confirment les résultats de Hadjizadeh, (2014). Qui soulignent l'effet stabilisant du cholestérol et du Span 60 sur l'efficacité d'encapsulation des niosomes [82].

En revanche, le cineole et les interactions Chol-Chol, Span-Span, Cin-Cin, Chol-Cin et le Span-Cin ont une influence négative sur le taux d'encapsulation. Ces résultats sont cohérents avec Bhardwaj et al. (2020). Sur les monoterpènes comme le thymol ou le D-limonène, qui ont montré que ces composés pouvaient diminuer l'EE% en augmentant la perméabilité de la bicouche [83].

f) Détermination des conditions optimales

Afin d'obtenir des niosomes les plus petits possible et à des taux d'encapsulation les plus élevés possible dans l'intervalle de travail, une optimisation a été réalisée à l'aide des modèles obtenus, les conditions optimales de formulation des niosomes sont présentées dans le **Tableau16**.

Tableau 16 Les conditions optimales des tailles des niosomes et le taux d'encapsulations.

C cineole	C Span	C Chol	Tailles des niosomes	Taux d'encapsulations
10 µl/ml	60 mg/ml	10 mg/ml	0,60 µm	17,16 %



Figure 39 Suspension niosomale

- Résultats

Pour atteindre l'optimum, les résultats suggèrent l'utilisation d'une concentration de 10 µl/ml de cineole et de 60 mg/ml de span et 10 mg/ml de cholestérol pour obtenir la taille et le taux désirés.

Afin de valider et vérifier la conformité des conditions obtenues, deux types de suspensions niosomales optimales ont été préparé: l'une contenant du cineole et l'autre sans (placebo).

g) Détermination de la taille de la suspension niosomale optimale

Après avoir réalisé la préparation des suspensions niosomales selon les paramètres définis dans le plan d'expérience, nous avons pu évaluer la taille des niosomes à l'aide d'un microscope optique, nous avons obtenu une taille de 1,06 µm voir la (**Figure10**) pour l'optimum.

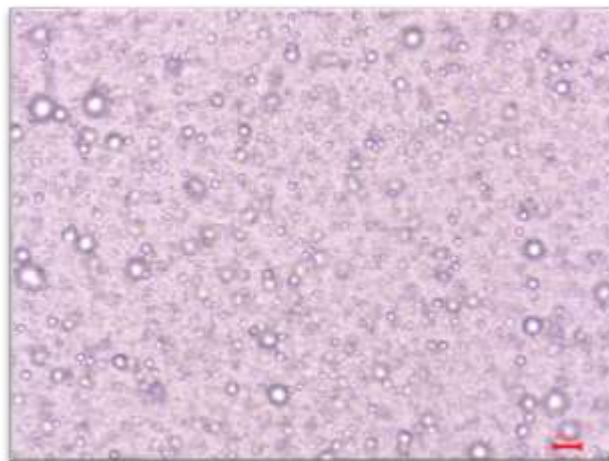


Figure 40 Taille des niosomes formés (optimum Cineole) évaluée à l'aide d'un microscope optique.

h) Détermination de taux d'encapsulation de la suspension niosomale optimale

Après avoir préparé la suspension niosomale avec les conditions proposées par le plan d'expérience, nous avons pu déterminer le taux d'encapsulation qui est de 29,18%.

Le taux d'encapsulation a été déterminé en utilisant la formule suivante :

$$EE = (\text{Quantité de médicament piégée} \div \text{Quantité totale de médicament ajoutée}) \times 100\%$$

- Observation et interprétation

Les résultats expérimentaux indiquent que la taille des niosomes est légèrement supérieure aux valeurs visées, cependant le taux d'encapsulation a augmenté par rapport à ce qui était prévu par le plan d'expérience. Cette légère augmentation de la taille des niosomes peut s'expliquer par plusieurs facteurs, notamment une interaction plus importante entre les composants de la formulation (cholestérol, tensioactifs et cineole), pouvant entraîner une rigidification de la bicouche et une formation de vésicules plus volumineuses. En revanche l'élévation du taux d'encapsulation, bien qu'inattendue selon les prédictions initiales du plan d'expérience, constitue un résultat favorable du point de vue de l'efficacité du système niosomal. Elle peut indiquer une meilleure affinité du composé monoterpénique pour la structure vésiculaire, ou encore une synergie entre les proportions de Span 60, de cholestérol et du cineole, favorisant son emprisonnement au sein des bicouches lipidiques.

5.2 Caractérisation de la formulation optimale (niosome-cineole)

5.2.1 Analyse thermogravimétrique (ATG)

- Résultats

Les résultats de l'analyse thermogravimétrique (ATG) sont présentés sous forme des courbes Suivantes :

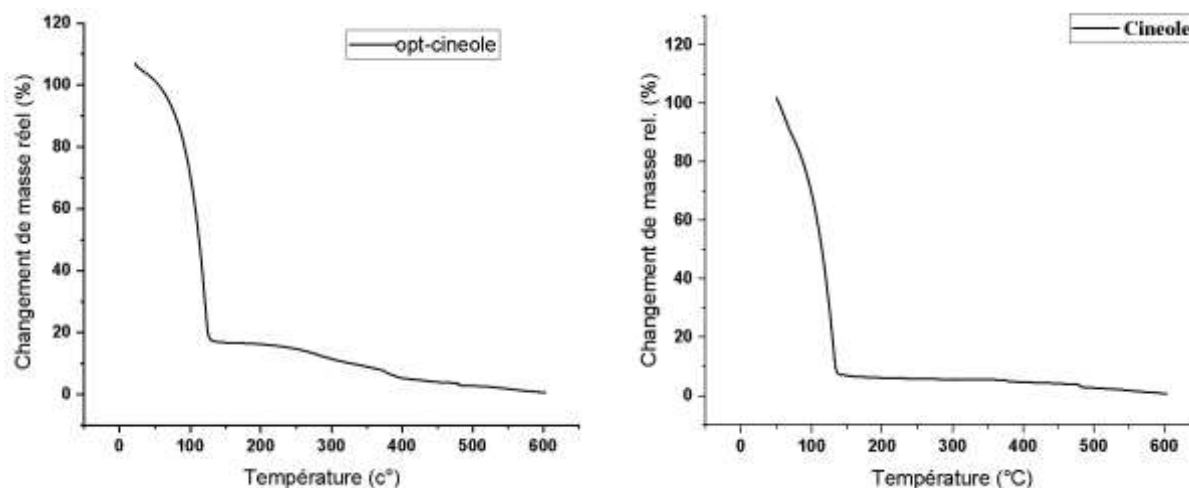


Figure 41 Analyse thermogravimétrique du cineole pur et de sa formulation niosomale.

- Interprétation

Pour le cineole pur, il présente une perte de masse entre 100-200°C, caractéristique de son évaporation rapide due à sa nature volatile. Ce comportement est en accord avec les données de la littérature notamment Hazra et al. (2004), qui ont observé, par ATG, une perte de masse quasi-totale du cineole dès les basses températures, sans trace de décomposition [84]. Ces observations confirment donc la volatilité du cineole.

A l'inverse, pour la formulation niosomale (optimum-cineole), on observe que la perte de masse significative ne débute qu'à partir de 100°C. Comparativement au cineole pur, cette courbe démontre l'absence d'évaporation soudaine du cineole, confirmant ainsi l'efficacité de son encapsulation dans la matrice niosomale. Au-delà de 200 °C, le profil thermique montre une dégradation des composés lipidiques de la suspension niosomale, suivie de leur décomposition progressive entre 200-400°C. Entre 300-500°C une perte supplémentaire reflète la pyrolyse des résidus lipidique, avec stabilisation au-delà de 500°C. Cette stabilisation thermique est cohérente avec les travaux de Hamed et al. (2023), qui n'ont montré que l'encapsulation des monoterpènes comme le thymol dans des niosomes retarde l'évaporation et prolonge la libération avec une meilleure résistance thermique [85].

5.2.2 Analyse calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

- Résultats

Les résultats de l'analyse calorimétrie différentielle à balayage (DSC) sont présentés dans la Figure 42.

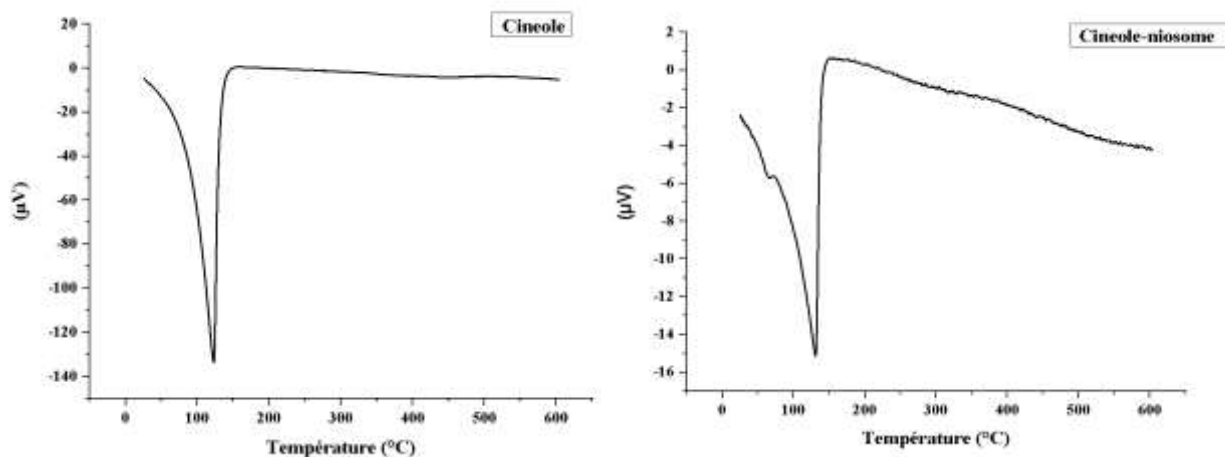


Figure 42 Analyse calorimétrie différentielle (DSC) comparé du cineole pur et de sa formulation niosomale.

- Interprétation

Pour le cineole pur, nous observons un pic endothermique marqué vers 170 $^{\circ}C$, caractéristique de sa transition de phase et de sa volatilité. En revanche, le système niosomal présente un profil thermique altéré : l'atténuation voire la disparition du pic du cineole démontre l'encapsulation du cineole dans les niosomes, tandis que l'apparition de nouvelles transitions entre 50-150 $^{\circ}C$ et 200-300 $^{\circ}C$ reflète les modifications structurales des lipides constitutifs des niosomes.

Ces observations sont cohérentes avec les travaux rapportés par Hajizadeh et al. (2019), qui ont étudié l'encapsulation du D-limonène dans des niosomes. Leurs analyses thermiques ont montré une disparition du pic de fusion caractéristique du D-limonène après encapsulation, indiquant une interaction forte entre le monoterpène et les composants niosomaux, ainsi qu'une conservation de sa structure cristalline en une forme amorphe [82].

5.3 Activité antioxydante par la méthode DPPH (niosome-camphre et niosome-cineole)

5.3.1 Le camphre

L'activité antioxydante du camphre pur et du camphre encapsulé ont montré des taux d'inhibition variables. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de diagramme suivant :

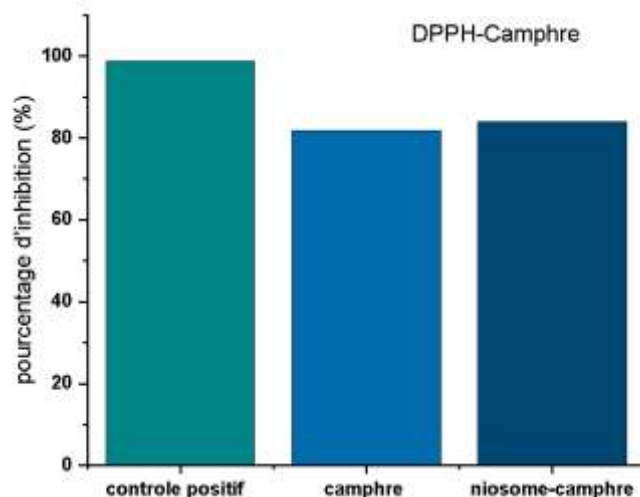


Figure 43 Diagramme de l'activité antioxydante du cineole.

- Interprétation

Les résultats montrent que le contrôle positif présente un pourcentage d'inhibition proche de 100%, indiquant une activité très élevée, confirmant son puissant pouvoir antioxydant. Le camphre pur présente un pourcentage d'inhibition proche à 80%, ce qui témoigne d'une capacité modérée à élever. Enfin, le camphre encapsulé dans des niosomes montre une légère augmentation du pourcentage d'inhibition, ce qui suggère que l'encapsulation dans des niosomes n'a pas augmenté significativement l'activité antioxydante du camphre.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Hajizadeh et al. (2019) ont encapsulé le D-limonène, un monoterpène, dans des niosomes et ont observé une amélioration de la cytotoxicité contre les cellules cancéreuses MCF-7, mais l'étude ne mentionne pas une augmentation significative de l'activité antioxydante mesurée par le test DPPH. Cela suggère que l'encapsulation peut améliorer certaines propriétés biologiques sans nécessairement augmenter l'activité antioxydante détectée par des tests in vitro comme DPPH. [82]

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'encapsulation pourrait limiter l'accessibilité du camphre aux radicaux libre du DPPH, ou encore par une libération incomplète du camphre encapsulé au cours du test.

5.3.2 Le cineole

L'activité antioxydante du cineole pur et du cineole encapsulé ont montré des taux d'inhibition variables. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de diagramme suivant :

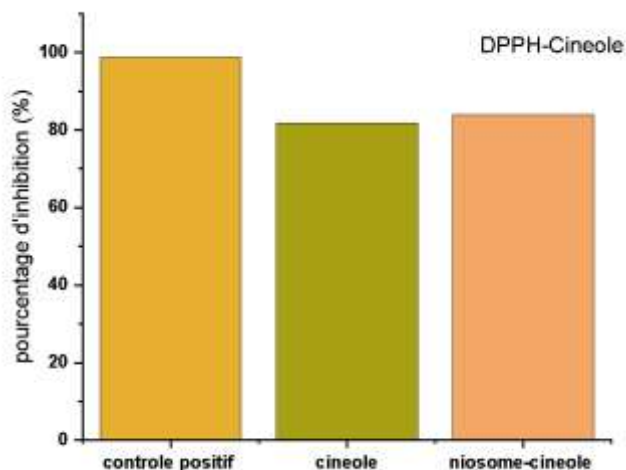


Figure 44 Diagramme de l'activité antioxydante du cineole.

- Interprétation

On observe que le contrôle positif présente un pourcentage d'inhibition de du DPPH proche de 100%, confirmant son puissant pouvoir antioxydant. En comparaison, le cineole pur montre une activité antioxydante modérée, avec un pourcentage d'inhibition d'environ 80%, indiquant qu'il possède des propriétés antioxydante mais moins marquées que l'acide ascorbique. Enfin, le cineole encapsulé dans des niosomes montre un pourcentage d'inhibition légèrement proche comparé au cineole pur, suggérant que l'encapsulation n'a pas significativement amélioré son activité antioxydante.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Hammoud et al. (2021), qui ont étudié l'encapsulation de l' α -pinène dans des liposomes. Leurs résultats ont montré que l'activité antioxydante mesurée par le test DPPH était maintenue après encapsulation sans amélioration significative par rapport au composé libre. [86]

Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'encapsulation pourrait limiter l'accessibilité du cineole aux radicaux libres du DPPH, ou encore par une libération incomplète du cineole encapsulé au cours du test.

5.4 Test de conservation spermatique (niosome-camphre et niosome-cineole)

Suite à l'analyse de nos différents échantillons (contrôle et traitements) à l'aide du système d'analyse assistée par ordinateur (CASA), nous avons obtenu des résultats permettant de tracer les histogrammes suivants :

5.4.1 Le camphre

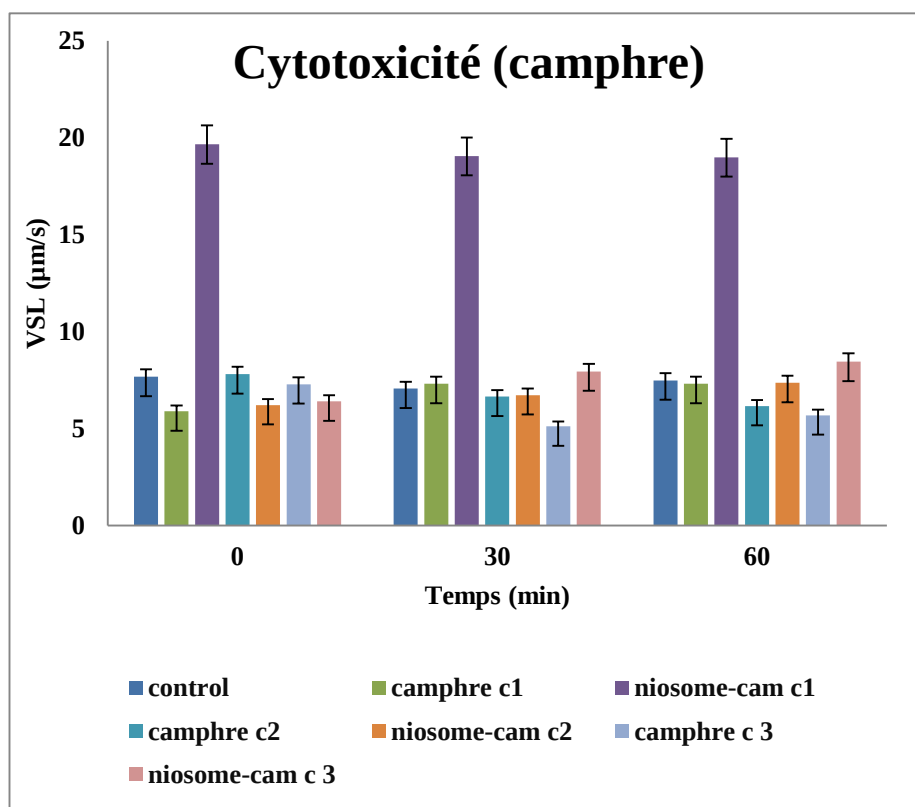


Figure 45 . Évaluation de la cytotoxicité du camphre et des niosomes chargés en camphre à différentes concentrations.

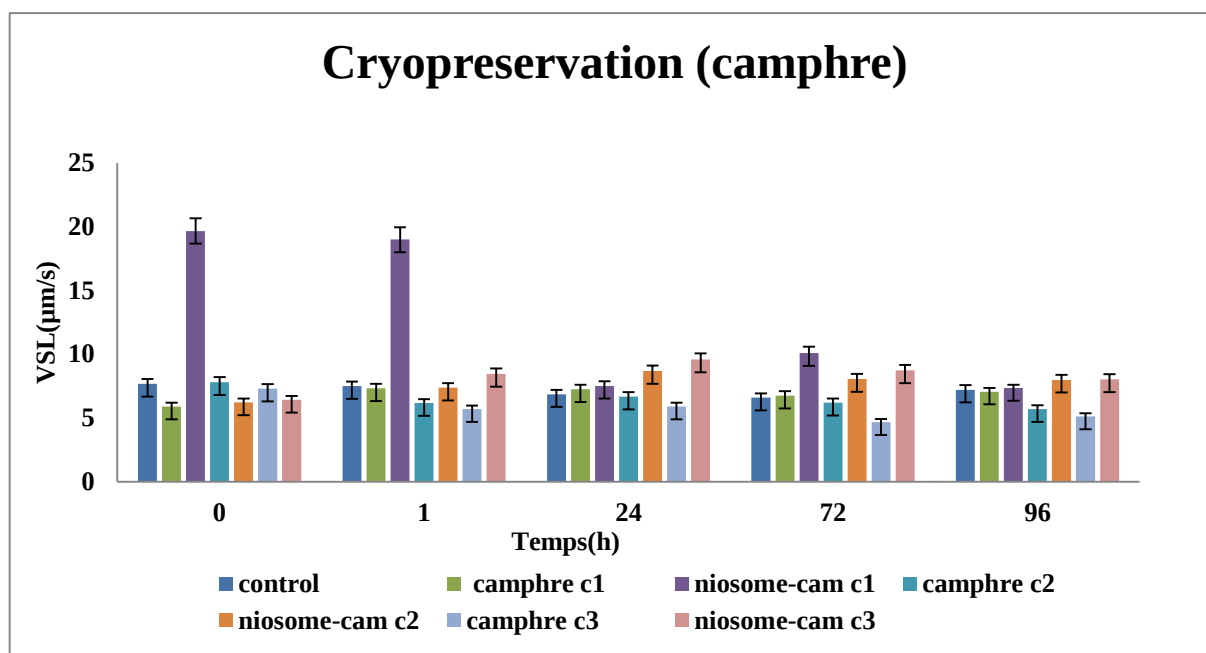


Figure 46 Impact de la cryopréservation du camphre et des niosomes chargés en camphre à différentes concentrations.

- Interprétation et discussion

Figure 45 : Avant la cryopréservation à T_0 : la formulation niosome-cam c1 présente un effet fortement positif sur la vitesse de progression en ligne droite (VSL), avec une valeur proche de 20 $\mu\text{m/s}$, bien supérieure à celle du contrôle. Cet effet peut être attribué à la structure des niosomes, riches en cholestérol, qui stabilisent les membranes cellulaires du sperme et réduisent les effets du stress oxydatif. Les autres formulations encapsulées (niosome-cam c2 et c3) montrent également un effet bénéfique, bien que légèrement inférieur. En revanche, les échantillons de camphre libre, notamment à la concentration c2, présentent une VSL plus faible que le témoin, suggérant un début d'effet cytotoxique, probablement dû à une libération rapide et directe du camphre vers les cellules sans protection membranaire.

À $T=30\text{min}$: la formulation niosome-cam c1 maintient une VSL élevée et constante, témoignant d'une libération progressive et maîtrisée du camphre. À ce stade, niosome-cam c3 montre une nette amélioration de la VSL, ce qui indique un début d'action retardée du camphre encapsulé. En revanche, le camphre libre c2 induit une chute notable de la VSL, ce qui confirme sa cytotoxicité rapide en absence d'encapsulation. Cette baisse peut être due à un stress oxydatif aigu ou à une altération de la membrane spermatozoïde. Le témoin reste stable, sans changement significatif.

À T=60min : la formulation niosome-cam c3 atteint une VSL supérieure à celle du contrôle, traduisant une bonne tolérance cellulaire et une efficacité progressive de la formulation. Cette dynamique d'amélioration est probablement due à la libération prolongée du camphre via la matrice niosomale, tout en préservant les cellules du stress. Le camphre libre, toutes concentrations confondues, continue d'induire une VSL faible, confirmant la toxicité du camphre non encapsulé à long terme. Enfin, la formulation niosome-cam c1 reste stable et toujours très active, démontrant une action rapide et soutenue dès T0 jusqu'à T60 min.

Figure 46 après la cryopréservation à **T=1h** : la motilité des spermatozoïdes (VSL) diminue nettement pour le contrôle. L'ajout de camphre à différentes concentrations (c1, c2, c3) limite cette perte de motilité, avec une efficacité accrue pour les concentrations plus élevées. L'utilisation de niosomes chargés en camphre permet une meilleure préservation de la motilité dès 1h, notamment pour les concentrations intermédiaires et élevées, confirmant leur rôle protecteur immédiat contre les dommages causés par la cryopréservation.

À T=24h : l'ajout de camphre (c1, c2, c3) permet de maintenir une motilité plus élevée par rapport au contrôle, avec une efficacité particulièrement marquée pour les concentrations c2 et c3. Les niosomes chargés en camphre confirment leur rôle protecteur, en préservant la motilité de manière plus significative, en particulier aux concentrations plus élevées. Cela suggère que l'encapsulation du camphre dans les niosomes améliore sa bio activité et sa capacité à contrer les effets délétères du processus de de réfrigération.

À T=72h : la motilité montre une nette baisse dans le groupe contrôle, tandis que les échantillons traités au camphre seul et aux niosomes-camphre conservent des valeurs supérieures, témoignant de l'effet protecteur persistant. L'efficacité des niosomes-camphre apparaît encore plus marquée que celle du camphre seul, notamment aux concentrations c2 et c3, ce qui démontre leur capacité à prolonger la viabilité et la motilité des spermatozoïdes au fil du temps.

À T=96h : la motilité des spermatozoïdes dans le groupe contrôle est fortement réduite, signe d'une perte de viabilité. En revanche, les échantillons traités avec du camphre seul et, surtout, ceux avec des niosomes-camphre conservent une motilité significativement plus élevée. Les concentrations intermédiaires (c2) et élevées (c3) restent les plus efficaces, indiquant que le camphre encapsulé dans des niosomes protège mieux la motilité spermatozoïdienne contre les effets de la cryoconservation prolongée.

Nos résultats démontrent que l'encapsulation du camphre dans des niosomes améliore la motilité spermatique (VSL) durant le processus de réfrigération. Ces observations sont en accord avec les travaux de Rezazadeh et al. (2024) sur les niosomes chargés en artémisinine pour caractériser les fonctions du sperme équin cryoconservé [87]. Comme dans notre étude, ces recherches soulignent le rôle protecteur des vésicules contre le stress oxydatif et leur capacité à moduler la libération des composés actifs.

5.4.2 Le cineole

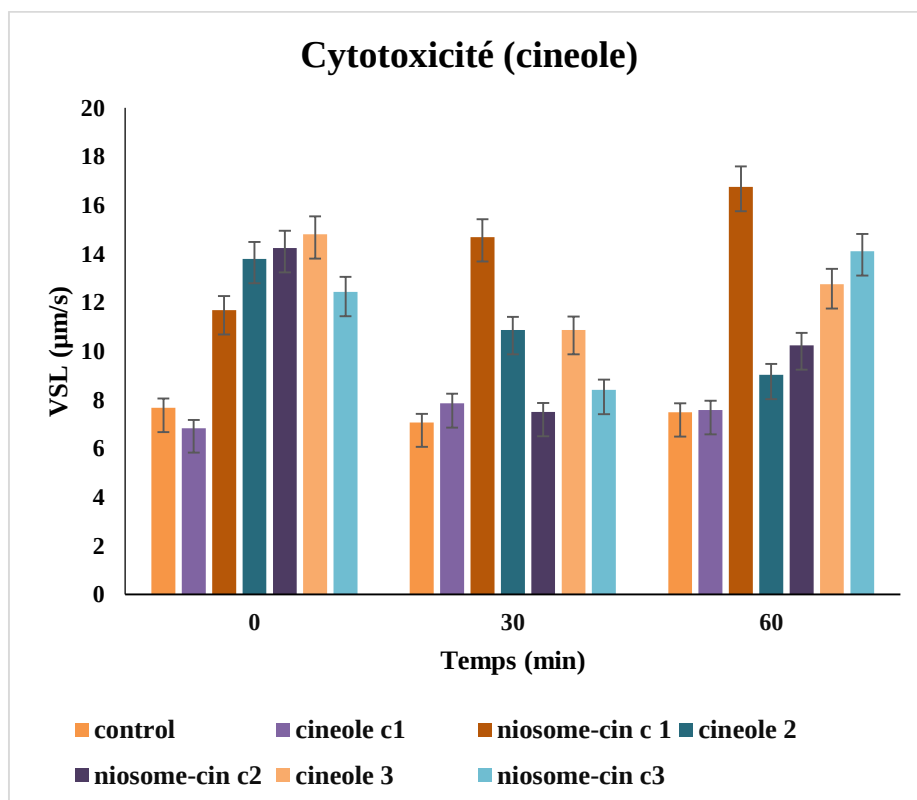


Figure 47 Évaluation de la cytotoxicité du cineole et des niosomes chargés en cineole à différentes concentrations.

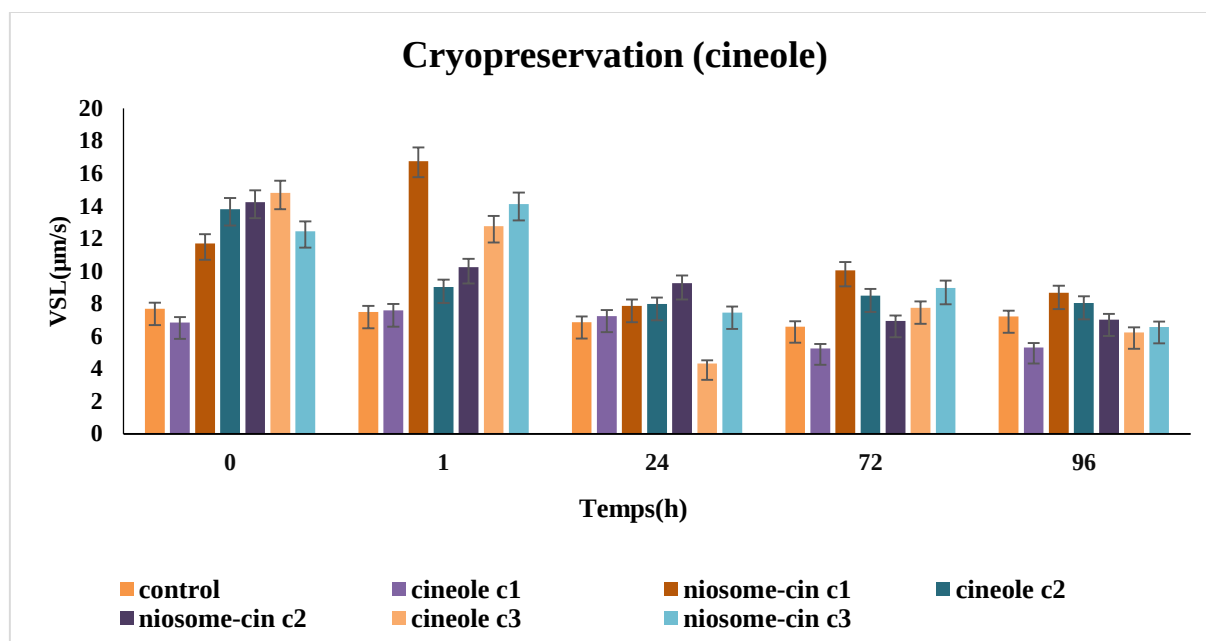


Figure 48 impact de la cryopréservation du cineole et des niosomes chargés en cineole à différentes concentrations.

- Interprétation

À T_0 : la formulation niosome-cin (c1) affiche une VSL élevée, bien supérieure à celle du contrôle, grâce à ses niosomes riches en cholestérol, qui stabilisent rapidement les membranes et réduisent le stress oxydatif. En revanche, le cinéole libre (c1) présente une activité positive mais moindre, en raison d'une libération moins maîtrisée. Pour (c2), la différence entre la formulation encapsulée et le cinéole libre est moins marquée, bien que ce dernier montre déjà les premiers signes de cytotoxicité liés à une libération rapide. À la concentration (c3), le cinéole libre induit un effet cytotoxique immédiat (avec une VSL souvent inférieure à celle du témoin), tandis que la formulation niosomale atténue cet impact initial grâce à une protection structurale.

À $T=30\text{min}$: la libération progressive dans la formulation niosome-cin (c1) permet de maintenir une VSL stable, témoignant d'une action protectrice continue. Pour (c2), l'effet bénéfique devient plus net, avec une amélioration significative de la VSL par rapport au cinéole libre, qui subit quant à lui, une chute marquée. En ce qui concerne (c3), la libération retardée entraîne un rebond de la motilité, confirmant qu'une diffusion contrôlée peut retarder l'apparition des effets cytotoxiques.

À T=60min : toutes les formulations encapsulées montrent des performances supérieures à celles du cinéole libre. C1 continue d'offrir une action soutenue, (c2) présente une VSL se rapprochant d'un niveau protecteur, tandis que (c3) atteint, voire dépasse, la VSL du témoin. Ces résultats soulignent que l'encapsulation dans les niosomes permet une libération prolongée, qui non seulement atténue les effets toxiques immédiats, mais préserve également la motilité cellulaire sur le long terme.

Figure 48 à T=1h, le graphe montre clairement que la cryopréservation induit une baisse de la motilité (VSL) dans le groupe témoin, tandis que l'ajout de camphre, notamment via les formulations niosome-cam, limite cette perte. Les niosomes, grâce à leur structure riche en cholestérol, confèrent une protection immédiate en stabilisant les membranes et en réduisant le stress oxydatif. Cela contraste avec le camphre libre, dont la libération rapide entraîne une chute marquée de la VSL.

À T=24h : l'effet protecteur des formulations encapsulées se confirme : les spermatozoïdes traités avec du camphre en niosomes, en particulier aux concentrations intermédiaires et élevées (c2 et c3), maintiennent une motilité supérieure par rapport au témoin et au camphre libre. Cela indique une action prolongée et une libération graduelle efficace.

À T=72h : la dynamique de libération continue de se distinguer, les formulations niosomales notamment (c2 et c3) affichant une amélioration progressive de la VSL, malgré les effets cumulatifs du stress cryogénique. Les spermatozoïdes semblent ici bénéficier de la libération retardée et contrôlée du camphre, qui compense les dommages initiaux, tandis que les traitements à base de camphre libre présentent une motilité constamment faible.

À T=96h : sur le long terme, l'approche encapsulée démontre une protection durable. Les spermatozoïdes exposés aux niosomes chargés en camphre, en particulier à des concentrations élevées, retrouvent, voire surpassent, la motilité initiale en comparaison avec les groupes témoin et les traitements au camphre libre. Cette persistance suggère que la libération contrôlée assurée par les niosomes permet non seulement de limiter la toxicité liée à la cryoconservation, mais également de garantir une stabilité fonctionnelle accrue des spermatozoïdes sur une période prolongée.

Nos résultats démontrent que l'encapsulation du cineole dans des niosomes améliore la motilité spermatique (VSL) durant le processus de réfrigération. Ces observations rejoignent les travaux de Rezazadeh et al. (2024) qui ont observé une amélioration de la qualité

spermatique grâce à des niosomes chargés en artémisinine lors de la cryopréservation du sperme équin, confirmant que l'encapsulation dans des niosomes permet non seulement de limiter la toxicité des composés libérés, mais aussi de préserver la motilité et la fonctionnalité des spermatozoïdes, comme dans notre étude [87].

Conclusion générale

Ce travail a permis de développer et d'optimiser des formulations niosomales à base de monoterpènes naturels, notamment le camphre et le 1-8 cineole, en vue d'application potentielles dans le domaine de la cryopréservation spermatique ou de la libération contrôlée de composés bioactifs. L'approche expérimentale fondée sur un plan de type box-Behnken, a permis d'évaluer l'effet des principaux composants de la formulation (span60, cholestérol et le principe actif) sur deux paramètres clés : la taille des niosomes et le taux d'encapsulation.

Les résultats ont montré que le span60 favorisait l'augmentation de la taille des niosomes. Le cholestérol, en tant qu'agent de rigidification membranaire, a joué un rôle déterminant dans la stabilisation de la structure niosomale et dans l'amélioration du taux d'encapsulation qui a atteint un maximum selon les conditions optimales. Les tailles des niosomes obtenues dans les conditions optimales étaient de **0,86 µm pour le camphre** et **1,06 µm pour le cineole**, indiquant des structures bien formées et homogènes. Le **taux d'encapsulation optimal** a été atteint avec le cineole, à **29,18 %**, traduisant une bonne capacité de rétention du composé lipophile au sein des vésicules.

L'analyse thermogravimétrique (ATG) a révélé une amélioration de la stabilité thermique des principes actifs une fois encapsulés. Par ailleurs, les tests antioxydants ont montré que les formulations niosomales permettaient de préserver, voire de renforcer l'activité radicalaire des composés encapsulés.

Les tests biologiques réalisés sur le sperme ovin conservé à 4°C ont montré que les niosomes ont amélioré la motilité et l'intégrité des spermatozoïdes. Ces résultats indiquent que l'encapsulation des monoterpènes dans des niosomes peut protéger efficacement le sperme lors de la cryopréservation.

Pour prolonger ces travaux, plusieurs perspectives scientifiques pertinentes peuvent être envisagées : la réalisation d'études cinétiques de libération des principes actifs, l'évaluation de la conservation longue durée par lyophilisation, la comparaison de l'efficacité entre niosomes et autres vecteurs comme les liposomes ou les nanoémulsions, ainsi que le développement de systèmes niosomaux fonctionnalisés pour un meilleur ciblage cellulaire. Enfin, une validation in vivo sur des modèles animaux pourrait représenter une étape cruciale pour le transfert de ces formulations vers des applications cliniques ou vétérinaires concrètes.

Références bibliographiques

- [1] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- [2] Kaur, P., Kaur, K., Joshi, G., Maan, M., & Bhandari, D. D. (2022). 1,8-cineole: A review. *International Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Sciences (IJBPAS)*, 11(11), 5306-5311.
- [3] Ware, R. A., Ghude, D. S., Akolkar, M. P., & Bhise, M. G. (2020). The therapeutic and medicinal use of camphor in ordinary life. *International Journal of Research in Engineering, Science and Management*, 3(5).
- [4] Fahmy, S. A., Sedky, N. K., Ramzy, A., Abdelhady, M. M., Alabrahim, O. A. A., Shamma, S. N., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Green extraction of essential oils from *Pistacia lentiscus* resins: Encapsulation into niosomes showed improved preferential cytotoxic and apoptotic effects against breast and ovarian cancer cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 87, 104820.
- [5] Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25.
- [6] Falcão, S., Bacém, I., Igrejas, G., Rodrigues, P. J., Vilas-Boas, M., & Amaral, J. S. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of hydrodistilled oil from juniper berries. *Industrial Crops and Products*, 124, 878-885.
- [7] Ariba, F. Z., Benchihab, H., & Deneche, S. (2020). Synthèse des propriétés physico-chimique et biologique d'Eucalyptus globulus Labill [Mémoire de master, Université des Frères Mentouri Constantine]. 96.
- [8] Hachemi, H., & Menacer, L. (2022). Étude de l'extraction de l'huile essentielle de lavande stoechas L de la région de Béni Maouche (Béjaïa) et caractérisations physico-chimiques (Mémoire de master, Université de Béjaïa).
- [9] Maouche, Z., & Kaddour, E. (2024). Encapsulation des huiles essentielles par les cyclodextrines : Application à l'huile essentielle de *Mentha spicata* L. (Mémoire de master, Université de Béjaïa).135.

- [10] Fan, M., Zhang, Y., Li, X., & Wang, J. (2023). Application of terpenoid compounds in food and pharmaceutical products. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 15(3), 119-135.
- [11] Zuzarte, M., Vale-Silva, L., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2024). Plant monoterpenes and essential oils as potential anti-ageing agents. *Phytochemistry Reviews*, 23(2), 365-382.
- [12] Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2022). Toxicity of selected monoterpenes and essential oils rich in these compounds. *Molecules*, 27(5), Article 1716.
- [13] Ferhane, W., & Bachioua, N. (2023). Élaboration et caractérisation d'un emballage alimentaire à base d'amidon et de l'huile essentielle d'eucalyptus. *Revue des Sciences des Aliments*, 42(4), 245-260.
- [14] Leghouini A ; Rehal, M ; Tebiche F. (2021/2022). Les huiles essentielles : composition, extraction et utilisation (mémoire de master. Université Mohamed Boudiaf, Msila).
- [15] Baffi, B., & Omari, A. (2020). Étude bibliographique des huiles essentielles des graines de fenouil (*Foeniculum vulgare*) (Mémoire de master, Université Akli Mohand Oulhadj de Bouira).
- [16] Macedo, L. M., Santos, É. M. dos, Militão, L., Tundisi, L. L., Ataíde, J. A., Souto, E. B., & Mazzola, P. G. (2020). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and its topical applications : A review. *Plants*, 9(5), Article 651.
- [17] Borges, R. S., Ortiz, B. L. S., Pereira, A. C. M., Keita, H., & Carvalho, J. C. T. (2019). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of Ethnopharmacology*, 229, 29-45.
- [18] Andrade, J. M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C. P., & Rijo, P. (2018). *Rosmarinus officinalis* L. : An update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science OA*, 4(4), Article FSO283.
- [19] Laguerre, V., Verlhac, P., Dangles, O., & Chennat, F. (2015). Huiles essentielles et 1,8-cinéole. *Sciences Pharmaceutiques*. HAL Open Science.

- [20] Cai, Z.-M., Peng, J.-Q., Chen, Y., Tao, L., Zhang, Y.-Y., Fu, L.-Y., Long, Q.-D., & Shen, X.-C. (2021). 1,8-Cinéole: A review of source, biological activities, and application. *Journal of Asian Natural Products Research*, 23(10), 938–954.
- [21] Amirouche, H., Benlamari, S., & Bouleghal, M. (2023). Effet antibactérien d'une plante médicinale *Rosmarinus officinalis* (Mémoire de master, Université du 8 Mai 1945). 49.
- [22] Tebbani, S., Tebaane, I., & Yahiaouche, I. (2023). Évaluation de l'activité antimicrobienne de quelques plantes médicinales: *L'Artemisia herba-alba*, *Thymus* (Mémoire de master, Université Frères Mentouri Constantine). 91.
- [23] Kheddoum, N. L. (2018). Étude du pouvoir antibactérien d'*Artemisia herba-alba* Chih (Mémoire de master, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem). 74.
- [24] Lakehal, S. (2016). Extraction et caractérisation des composés secondaires de deux plantes: Armoise blanche et romarin de la région de Djelfa - Effets thérapeutiques et biopesticides (Mémoire de magister, Université Blida 1). 190.
- [25] Vaghardoost, R., Kazemikhoo, N., Mokmeli, S., Momeni, M., Dahmardehei, M., Ansari, F., & Rahimi, M. (2018). The healing effect of sesame oil, camphor and honey on second degree burn wounds in rat. *World Journal of Plastic Surgery*, 7(1), 67-71.
- [26] Laude, E. A., Morice, A. H., & Grattan, T. J. (1994). The antitussive effects of menthol, camphor and cineole in conscious guinea-pigs. *Pulmonary Pharmacology*, 7(3), 179-184.
- [27] De Logu, A., Loy, G., Pellerano, M. L., Bonsignore, L., & Schivo, M. L. (2000). Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell-to-cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Research*, 48(3), 177-185.
- [28] Chen, W., Vermaak, I., & Viljoen, A. (2013). Camphor: A fumigant during the Black Death and a coveted fragrant wood in ancient Egypt and Babylon. A review. *Molecules*, 18(5), 5434–5454.
- [29] Santoyo, S., Lloria, R., Jaime, L., Ibañez, E., Señoráns, F. J., & Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68(4), 790–795.

- [30] Sökmen, A., Sokmen, M., Daferera, D., Polissiou, M., Candan, F., Unlü, M., & Akpulat, H. A. (2004). Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenisii* Hub.-Mor. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1), 57-60.
- [31] Chaib, S. (2021). Encapsulation d'une huile essentielle extraite de *Thymus vulgaris* (Thèse de doctorat, Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi).
- [32] Senouci, H. (2020). Étude des activités biologiques de l'huile essentielle de *Ammoides verticillata*, en combinaison avec les huiles essentielles de *Curcuma longa* et *Allium sativum* et micro-encapsulation de l'HE de *Ammoides verticillata* en vue d'une lutte biologique (Thèse de doctorat, Université Aboubakr Belkaid Tlemcen).
- [33] Hadj Safi, G. I. (2019). Encapsulation du Fluconazole dans les niosomes et les liposomes (Mémoire de master 2, Université Aboubakr Belkaid Tlemcen).
- [34] Bensaber, A. (2022). Microencapsulation d'un antihypertenseur (Hydrochlorothiazide) par des polymères biodégradables (PLA/PVPK30), caractérisation physico-chimique et pharmacocinétique (Mémoire de master 2, Université Yahia Fares de Médéa).
- [35] Boukhouane, S., & Sadelli, C. H. (2022). Formulation, optimisation et caractérisation de systèmes binaires : cyclodextrines-extrait de propolis et liposomes-extrait de propolis (Mémoire de master 2, Université Abderrahmane Mira de Béjaïa).
- [36] Zeghouani, N. N., & Bentazir, D. J. (2022). Encapsulation de molécules biologiquement actives dans des systèmes complexes à base de biopolymères (Mémoire de master 2, Université des Frères Mentouri Constantine).
- [37] Roudayna, D. (2009). Vectorisation des analogues de nucleosides pour le traitement des metastases (Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1).
- [38] Milad, F., et al. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems (Vol. 39). Academic Press.
- [39] Chen, L., et al. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems (Vol. 17). Academic Press.
- [40] Dupont, C. (2000). Encapsulation et applications industrielles (p. 24). Éditions Dunod.

- [41] Tangri, P., & Khurana, S. (2011). Niosomes : Formulation and evaluation. *International Journal of Biopharmaceutics*, 2(1), 47–53.
- [42] Ayoub, B. (2021). Formulation d'un système vésiculaire niosomal et application à l'encapsulation d'un principe actif lipophile : l'acide salicylique [Mémoire de master 2, Université Ben Youssef Ben Khedda Alger 1]. 13 p.
- [43] Umbarkar, M. G. (2021). Niosome as a novel pharmaceutical drug delivery: A brief review highlighting formulation, types, composition and application. *Indian Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 55(1).
- [44] Usman, M. R. M., Ghuge, P. R., & Jain, B. V. (2017). Niosomes : A novel trend of drug delivery. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(7), 436-442.
- [45] Akbarzadeh, I., Sedaghatnia, K., Bourbour, M., Daraee, H., & Fekri Aval, S. (2021). Niosomes : A novel targeted drug delivery system. *Preprints*, 2021120315.
- [46] Islam, J., Ganesh, N., Kumar, K. U., & Islam, R. (2021). Review on niosome as novel drug delivery system. *Drugs*, 4(5), 25-31.
- [47] Liga, S., Paul, C., Moacă, E.-A., & Péter, F. (2024). Niosomes : Composition, formulation technique, and recent progress as delivery systems in cancer therapy. *Pharmaceutics*, 16(2), 223.
- [48] Chavan, A. D., Shah, R. R., & Chougule, P. A. (2023). Niosomes : A review of their structure, types, method of preparation, characterization and application. *International Journal of Research and Analytical Reviews*, 10(4), 962-973.
- [49] Yeo, P. L., Lim, C. L., Chye, S. M., & Ling, K. L. (2017). Niosomes : A review of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications. *Asian Biomedicine*, 11(4), 301-314.
- [50] Chandu, V. P., Arunachalam, A., Jeganath, S., Yamini, K., & Tharangini, K. (2012). Niosomes : A novel drug delivery system. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 25-31.
- [51] Sharma, D., Ali, A. A. E., & Aate, J. R. (2018). Niosomes as novel drug delivery system. *PharmaTutor*, 6(3), 58-65.

- [52] Mujoriya, R. Z., Dhamande, K., & Bodla, R. B. (2011). Niosomal drug delivery system—a review. *International Journal of Applied Pharmacy*, 3(3), 7-10.
- [53] Chandu, V. P., Arunachalam, A., Jeganath, S., Yamini, K., & Tharangini, K. (2012). Niosomes : A novel drug delivery system. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 25-31.
- [54] Maurya, K., Singh, A., Pandey, S., Kumar, N., & Siddiqui, M. A. (2021). Niosomes : Classification, preparation and application. *International Journal of Indigenous Herbs and Drugs*, 29-32.
- [55] Patel, D. (2020). Niosome drug delivery system : Basics, advantage, disadvantage, applications. *SIPS*.
- [56] Asaithambi, K., Muthukumar, J., Chandrasekaran, R., Ekambaram, N., & Roopan, M. (2020). Synthesis and characterization of turmeric oil loaded non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and its enhanced larvicidal activity against mosquito vectors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101737.
- [57] Leelarungrayub, J., Manorsoi, J., & Manorsoi, A. (2017). Anti-inflammatory activity of niosomes entrapped with Plai oil (*Zingiber cassumunar* Roxb.) by therapeutic ultrasound in a rat model. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 2469–2476.
- [58] Raeiszadeh, M., Pardakhty, A., Sharififar, F., Farsinejad, A., Mehrabani, M., Hosseini-Nave, H., & Mehrabani, M. (2018). Development, physicochemical characterization, and antimicrobial evaluation of niosomal myrtle essential oil. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 250–261.
- [59] García-Díaz, M., Patiño, B., Vázquez, C., & Gil-Serna, J. (2019). A novel niosome-encapsulated essential oil formulation to prevent *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin contamination of maize grains during storage. *Toxins*, 11(11), 646.
- [60] Vilela, J. D. M., Moghassemi, S., Dadashzadeh, A., Dolmans, M. M., Azevedo, R. B., & Amorim, C. A. (2022). Safety of lavender oil-loaded niosomes for *in vitro* culture and biomedical applications. *Nanomaterials*, 12(12), 1999.

- [61]** Fahmy, S. A., Nasr, S., Ramzy, A., Badr, A., Sherif, N. Y., El-Sherbiny, I. M., & Eltaher, H. M. (2023). Cytotoxic and antioxidative effects of geranium oil and ascorbic acid coloaded in niosomes against MCF-7 breast cancer cells. *ACS Omega*, 8(25), 22774-22782.
- [62]** Sirati, R., Khajehrahimi, A. E., Kazempoor, R., Kakoolaki, S., & Ghorbanzadeh, A. (2024). Development, physicochemical characterization, and antimicrobial evaluation of niosome-loaded oregano essential oil against fish-borne pathogens. *Heliyon*, 10(5).
- [63]** Taouzinet, L., Fatmi, S., Khellouf, A., Lahiani-Skiba, M., Skiba, M., & Iguer-Ouada, M. (2022). Drug release, stability and efficiency of vitamin E loaded in liposomes for bovine sperm protection in cryopreservation medium. *CryoLetters*, 43(1), 50-57.
- [64]** Fatmi, S., Toutou, Z., Chibani, N., Lezrag, H. A., Skiba, M., & Iguer-Ouada, M. (2023). Optimization and formulation of mixed niosome/cyclodextrin encapsulation process for Béjaia propolis extract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 86, 104677.
- [65]** Risaliti, L., Kehagia, A., Daoultzi, E., Lazari, D., Bergonzi, M. C., Vergkizi-Nikolakaki, S., & Bilia, A. R. (2019). Liposomes loaded with *Salvia triloba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils : In vitro assessment of antioxidant, antiinflammatory and antibacterial activities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 493–498.
- [66]** Aziz, D. E., El-Tanani, M., & McCarron, P. A. (2020). The efficacy of cholesterol-based carriers in drug delivery. *Molecules*, 25(18), 4330.
- [67]** Chen, S., Hanning, S., Falconer, J., Locke, M., & Wen, J. (2019). Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 144, 18–39.
- [68]** Goyal, G., Garg, T., Rath, G., Goyal, A. K., & Kumar, S. (2015). Development and characterization of niosomal gel for topical delivery of benzoyl peroxide. *Drug Delivery*, 22(8), 1027–1042.
- [69]** Yasamineh, S., Javanbakht, S., Ghotbi, M., & Fatahi, Y. (2022). A state-of-the-art review on the recent advances of niosomes as a targeted drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 624, 121878.

- [70] Zolghadri, S., Asad, A. G., Farzi, F., Ghajarzadeh, F., Habibi, Z., Rahban, M., Zolghadri, S., & Stanek, A. (2023). Span 60/cholesterol niosomal formulation as a suitable vehicle for gallic acid delivery with potent in vitro antibacterial, antimelanoma, and anti-tyrosinase activity. *Pharmaceuticals*, 16(12), 1680.
- [71] Ruwizhi, N., & Aderibigbe, B. A. (2020). The efficacy of cholesterol-based carriers in drug delivery. *Molecules*, 25(18), 4330.
- [72] Liu, C., Shan, W., Zhang, Y., Yang, Y., & Tang, X. (2019). Cholesterol-modified liposomes for encapsulation of essential oils: Enhanced stability and controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, 91–98.
- [73] Pando, D., Beltrán, M., Calvo, L., & Mateos, C. (2017). Optimization of Span 80 and Tween 80 mixtures for the stable encapsulation of monoterpenes in lipid nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 504, 385–394.
- [74] Tavares, L., Marques, C., Silva, A. M., & Souto, E. B. (2021). Challenges in the encapsulation of volatile compounds (menthol, camphor) in lipid carriers: Stability and release behavior. *Journal of Molecular Liquids*, 334, 116040.
- [75] Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2016). Comparative study of the encapsulation efficiency of thymol and carvacrol in liposomes and their essential oils. *Food Chemistry*, 196, 1066–1072.
- [76] López-Pinto, J.M., et al. (2022). "Molecular interactions between cholesterol and monoterpenes in lipid bilayers: Implications for encapsulation efficiency." *Langmuir*, 38(12), 3721-3730.
- [77] Battaglia, L., et al. (2019). "The role of surfactant structure on the encapsulation efficiency of terpenes in solid lipid nanoparticles." *Pharmaceutical Research*, 36(4), 62.
- [78] Salem, M., El-Sisy, G., El-Kenawy, A. E., El-Nattat, W. S., El-Sheshtawy, R. I., & El-Sayed, M. M. (2021). Niosomes loaded with eucalyptol for enhanced sperm cryopreservation: Optimization and in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 198, Article 111450.
- [79] El-Hairiry, A. et al. (2022). Menthol-loaded niosomes for improved ram sperm viability: Role of cholesterol in vesicle stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 611, 121303.

- [80] Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635–R666.
- [81] Niroumand, U., Motazedian, M. H., Ahmadi, F., Asgari, Q., Bahreini, M. S., Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2024). Preparation and characterization of artemether-loaded niosomes in *Leishmania major*-induced cutaneous leishmaniasis. *Scientific Reports*, 14, Article 10073.
- [82] Hajizadeh, M. R., Maleki, H., Barani, M., Fahmidehkar, M. A., Mahmoodi, M., & Torkzadeh-Mahani, M. (2019). In vitro cytotoxicity assay of D-limonene niosomes: an efficient nano-carrier for enhancing solubility of plant-extracted agents. *Research in pharmaceutical sciences*, 14(5), 448-458.
- [83] Bhardwaj, P., Tripathi, P., Gupta, R., & Pandey, S. (2020). Niosomes: A review on niosomal research in the last decade. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56, 101581.
- [84] Hazra, D., Alexander, K. S., Dollimore, D., & Riga, A. T. (2004). Characterization of some essential oils and their key components: Thermoanalytical techniques. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 75(1), 317–330.
- [85] Hamed, R., El-Dakak, H., Akl, M. A., & El Sayed, M. E. (2023). Encapsulation of thymol in gelatin methacryloyl (GelMa)-based nanoniosome enables enhanced antibiofilm activity and wound healing. *Pharmaceutics*, 15(6), 1699.
- [86] Hammoud, Z., Kayouka, M., Trifan, A., Sieniawska, E., Jemâa, J. M. B., Elaissari, A., & Greige-Gerges, H. (2021). Encapsulation of α -pinene in delivery systems based on liposomes and cyclodextrins. *Molecules*, 26(22), 6840.
- [87] Rezazadeh, R., Karami, F., & Mohammadi, A. (2024). Niosomal nanocarriers loaded with artemisinin have potential to enhance the functional characteristics of cryo-preserved equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 272, 107653.

Résumé

Les huiles essentielles, bien que riches en composés bioactifs tels que le camphre et le 1,8-cinéole, souffrent de limitations majeures liées à leur faible solubilité, leur instabilité chimique et leur volatilité, réduisant ainsi leur efficacité thérapeutique. Pour surmonter ces contraintes, ce mémoire explore l'encapsulation de ces monoterpènes dans des niosomes, des vésicules formées à partir de tensioactifs non ioniques, reconnues pour leur stabilité, leur capacité de ciblage et leur libération prolongée du contenu encapsulé.

L'étude s'est concentrée sur deux plantes aromatiques : *Artemisia herba-alba* (armoise blanche) et *Rosmarinus officinalis* (romarin), dont les huiles essentielles sont respectivement riches en camphre et en cinéole. Après une revue approfondie des propriétés physico-chimiques et biologiques de ces composés, des formulations niosomales ont été élaborées et caractérisées.

Divers tests ont été réalisés, incluant l'analyse par spectroscopie UV-Visible, l'analyse thermogravimétrique (ATG), le test antioxydant DPPH, ainsi qu'un test de viabilité spermatique. Les résultats ont démontré une amélioration significative de la solubilité et de la stabilité des composés encapsulés, avec une réduction marquée de leur volatilité, tout en préservant ou en renforçant leurs activités biologiques.

Ces résultats confirment que les niosomes constituent une plateforme prometteuse pour la valorisation des huiles essentielles dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et alimentaire.

Mots clés : Encapsulation, Niosomes, Huiles essentielles, Camphre, Cinéole, Antioxydant, ATG, Test spermatique, Solubilité, Volatilité.

Abstract

Essential oils, although rich in bioactive compounds such as camphor and 1,8-cineole, suffer from major limitations related to their low solubility, chemical instability, and volatility, which reduce their therapeutic effectiveness. To overcome these drawbacks, this thesis investigates the encapsulation of these monoterpenes into niosomes — nanometric vesicles formed from non-ionic surfactants — known for their stability, targeting ability, and sustained release properties.

The study focused on two aromatic plants: *Artemisia herba-alba* (white wormwood) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary), whose essential oils are respectively rich in camphor and cineole. Following a detailed review of the physicochemical and biological properties of these compounds, niosomal formulations were developed and characterized.

Several tests were conducted, including UV-Visible spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA), the DPPH antioxidant assay, and a sperm viability test. The results showed a significant improvement in the solubility and stability of the encapsulated compounds, along with a marked reduction in their volatility, while maintaining or enhancing their biological activities.

These findings confirm that niosomes represent a promising platform for the valorization of essential oils in pharmaceutical, cosmetic, and food applications.

Keywords: Encapsulation, Niosomes, Essential oils, Camphor, Cineole, Antioxidant, TGA, Sperm test, Solubility, Volatility.