

République algérienne démocratique et populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
Université a. Mira de Bejaia



Faculté de Technologie  
Département de Génie des procédés  
Laboratoire de Génie pharmaceutique

## Mémoire EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE Master

Domaine : Science et Technologie Filière : Génie des Procédés  
Spécialité : Génie Pharmaceutique

Présenté par

**BOUKOUANE Sihem**

**SADELLI Chahinaz**

### *Thème*

Formulation, optimisation et caractérisation de systèmes binaires : cyclodextrines-extrait de propolis et liposomes-extrait de propolis

Soutenue le : 03/07/2022

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
AZZOUG Moufok	MCA	Université de Bejaia	Président
CHIBANI Nacera	MCA	Université de Bejaia	Examineur
FATMI Sofiane	MCA	Université de Bejaia	Encadrant
TOUTOU Zahra	Doctorante	Université de Bejaia	Co- Encadrant

Année Universitaire : 2021/2022

# Remerciements

*Nous remercions Dieu pour nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail. Nous remercions chaleureusement notre encadrant Monsieur **FATMI Sofiane**, pour tout l'aide qu'il nous a apporté, pour ses fructueux conseils, pour sa disponibilité, pour sa patience et pour ses encouragements continuels à finir ce travail.*

*Nous remercions aussi notre Co-encadreur M<sup>elle</sup> **TOUTOU Zahra** pour son aide, son soutien et sa patience avec nous.*

*Nous tenons à remercier tous les membres de jury pour le temps qu'ils ont consacré pour examiner et enrichir ce travail.*

*Nous tenons à exprimer notre reconnaissance et nos plus profonds remerciements envers Monsieur **ZITOUNE Hachemi** professeur à l'université de Bouira, et Monsieur **DJERMOUNE Atmane** membre du CRAPC-Bejaia et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Merci à tout le monde*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement A :*

### *Mes chers parents*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti*

*Pour mon instruction et mon bien être.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.*

*Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur, longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*Mon unique frère Samir et mes sœurs Fahima, Kahina, Lynda et Sabrina, leurs maris et enfants Ithri, Tina, Nélia, Léa et Jugurtha*

*Mon fiancé et future mari Farouk*

*Ma copine Tinhinane*

*Toute ma famille qui porte le nom BOUKOUANE*

*Toute personne que j'ai croisé un matin et qui a mis un grain de bonheur dans ma petite vie. Surtout ma chère amie et binôme Chahinez*

*Sihem*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement A :*

### *Mes chers parents*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour*

*Éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis.*

*Pour mon instruction et mon bien être.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.*

*Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur, longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

### *Mon frère Nabil*

*Vous m'avais soutenu durant toute ma vie vous m'avez donné un magnifique modèle de persévérance.*

### *Mes chères sœurs*

*Amel et Wissam qui m'ont accompagné durant tout mon parcours qui m'ont jamais laissé tomber.*

*Toute ma famille, qui porte le nom SADELLI*

*Tous mes amis que j'aime tant pour leur amitié et confiance.*

*Chahinaz*

## Liste des tableaux

<b>Tableau II.1.</b> Domaine industriels et applications.....	21
<b>Tableau III.1.</b> Caractéristiques physicochimiques des CDs.....	24
<b>Tableau III.2.</b> Exemples des propriétés améliorées par l'utilisation des CDs dans divers domaine d'applications.....	25
<b>Tableau V.1.</b> Matrice d'essais.....	43
<b>Tableau V.2.</b> Matrice d'essais.....	46
<b>Tableau VI.1.</b> Résultats expérimentaux de la matrice.....	58
<b>Tableau VI .2.</b> Présentation des valeurs de l'analyse statistiques .....	60
<b>Tableau VI.3.</b> Résultats expérimentaux de la matrice.....	62
<b>Tableau VI.4.</b> Analyse statistique.....	64

## Liste des figures

<b>Figure I.1.</b> La propolis brute.....	4
<b>Figure I.2.</b> La récolte de la propolis par l'abeille. ....	5
<b>Figure I.3.</b> Butineuses de propolis dans la ruche.....	6
<b>Figure I.4.</b> Récolte de la propolis par l'homme au niveau de la ruche.....	6
<b>Figure I .5.</b> Composition de la propolis.....	8
<b>Figure I.6.</b> Les abeilles réduisent le trou de vol avec de la propolis.....	11
<b>Figure II.1.</b> Représentation schématique d'un appareil à lit d'air fluidisé. ....	16
<b>Figure II.2.</b> Principe de l'encapsulation par coacervation.....	17
<b>Figure II.3.</b> Représentation des 03 types de capsules pouvant être obtenus par coacervation complexe.....	18
<b>Figure II.4.</b> Représentation schématique et un micrographe des liposomes en microscopie électronique à transmission.....	19
<b>Figure III.1.</b> Structure chimique des CD <sub>s</sub> .....	23
<b>Figure III.2.</b> Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion CD-xylène et de la dissociation (les petits cercles représentent les molécules d'eau).....	26
<b>Figure III.3.</b> Schéma des unités glucose formant le cycle des CDs.....	28
<b>Figure IV.1.</b> Structure d'un liposome.....	31
<b>Figure IV.2.</b> Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.....	35
<b>Figure IV.3.</b> Préparation des liposomes par injection de solvant organique.....	37
<b>Figure V.1.</b> Préparation du complexe propolis-cyclodextrine.....	45
<b>Figure V.2.</b> Présentation d'un rota vapeur.....	46
<b>Figure V.3.</b> Présentation d'un spectrophotomètre UV-visible.....	50

<b>Figure V.4.</b> Représentation d'un granulomètre laser .....	50
<b>Figure V.5.</b> L'optimum propolis -cyclodextrine .....	51
<b>Figure V.6.</b> Présentation d'une diffraction rayon x .....	52
<b>Figure V.7.</b> L'optimum propolis-liposome.....	51
<b>Figure V.8.</b> Présentation d'une chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	54
<b>Figure V.9.</b> Présentation d'une centrifugeuse.....	54
<b>Figure V.10.</b> Epididyme d'un bélier.....	57
<b>Figure VI.1.</b> Facteurs statistiques du plan d'expérience étudié.....	60
<b>Figure VI.2.</b> Histogramme représentant l'influence des facteurs sur des dosages des flavonoïdes.....	61
<b>Figure VI.3.</b> Facteurs statistique du plan d'expérience étudié.....	64
<b>Figure VI.4.</b> Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la taille des liposomes.....	65
<b>Figure VI.5.</b> Diffraction des rayons X de : propolis, propolis-PM- $\beta$ CD, et mélange physique...	67
<b>Figure VI.6.</b> Les spectres IR de : liposome blanc, PM- $\beta$ CD, propolis, propolis-liposome, propolis-PM $\beta$ CD, et mélange physique.....	68
<b>Figure VI.7.</b> Spectres UV-visible de: l'extrait de propolis, liposome-propolis, PM $\beta$ CD , liposome blanc, propolis-PM $\beta$ CD, et mélange physique .....	70
<b>Figure VI.8.</b> La VSL moyenne du sperme .....	71

## Liste des abréviations

PDS : Pesticide delivery systems.

CDs : Cyclodextrine (s).

Chol : Cholestérol.

$\beta$ -CD : Beta-cyclodextrine.

PM $\beta$ CD : Perméthyl beta-cyclodextrine.

$\alpha$ -CD : Alpha-cyclodextrine.

$\gamma$ -CD : Gamma-cyclodextrine.

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

EC : Electrophorèse capillaire.

CPL : Chromatographie en phase liquide.

CASA: Computer assisted sperm analyse.

VSL : Vitesse de la trajectoire en ligne droite.

DRX : Diffraction des rayons X.

UV : Ultra violet (spectrophotomètre).

HPLC : chromatographie en phase liquide à haut performance.

IR : Spectroscopie infrarouge.

PEG : Polyéthylène glycol.

SUV : Vésicules unilamellaire de petite taille.

MLV : Vésicule multilamellaires

LUV : Vésicule unilamellaires de grande taille.

REV : Vésicule d'évaporation en phase inverse.

CMC : Concentration micellaire critique.

Pho : Phospholipides.

Pro : Propolis.

T<sub>m</sub> : Température de transition de phase.

# Sommaire

## Liste des tableaux

## Liste des figures

## Liste des abréviations

## Introduction générale..... 13

## Chapitre I: La propolis

I.1. Introduction .....	3
I .2. Historique .....	3
I.3. Définition .....	3
I.4. Origines.....	4
I.4.1. Animale .....	4
I.4.2. Végétale .....	4
I.5. La récolte de la propolis .....	4
I.5.1. Par les abeilles .....	4
I .5.2. La récolte par l’apiculteur.....	6
I.6. La composition chimique de la propolis.....	7
I.6.1. La résine .....	7
I.6.2. La cire et les huiles essentielle .....	7
I.6.3. Le pollen .....	7
I.6.4. La matière minérale .....	8
I.6.5. Les vitamines .....	8
I.6.6. Autres substances .....	8
I.7. Activités biologiques de la propolis.....	8
I.7.1. Activité antimicrobienne de la propolis .....	9
I.7.2. Activité antioxydante .....	9
I.7.3. Activité antifongique.....	9
I.7.4. Activité anti- inflammatoire .....	9
I.7.5. Activité antivirale .....	9
I.7.6. Activité anti-tumorale .....	9

I.7.7. Activité anticancéreuse .....	10
I.7.8. Activité anti-protozoaire .....	10
I.7.9. Activité anesthésique.....	10
I.7.10. Activité immunmodulatrice.....	10
I.8. Utilisation de la propolis .....	<b>10</b>
I.8.1.Utilisation de la propolis par les abeilles : .....	10
I .8.2.1. Cosmétique .....	11
I .8.2.2. Médecine .....	11
I.8.2.3. Technologie alimentaire .....	12
I.8.2.4. Usage vétérinaire .....	12
I.9. L'extraction de la propolis .....	<b>12</b>
I.10. Conservation .....	<b>13</b>
I.11. Conclusion .....	<b>13</b>
<b>Chapitre II : L'encapsulation</b>	
II.1. Introduction .....	<b>14</b>
II.2. Définition de l'encapsulation .....	<b>14</b>
II.3. Objectifs de l'encapsulation.....	<b>14</b>
II.4. Différents types d'encapsulation.....	<b>15</b>
II.4.1. La micro-encapsulation .....	15
II.4.2. La nano-encapsulation.....	15
II.5. Les différents procédés d'encapsulation.....	<b>15</b>
II.5.1. Procédés mécaniques.....	15
II.5.2. Procédés chimiques .....	16
II.5.3. Procédés physico-chimiques .....	17
II.6. Les différents agents d'encapsulation .....	<b>19</b>
II.6.1. Les vecteurs particuliers .....	19
II.6.2. Agents de support à base de polysaccharides.....	19
II .6.3. Agents à base de protéines .....	20
II.7. Les applications de l'encapsulation .....	<b>20</b>
II.8. Conclusion.....	<b>21</b>
<b>Chapitre III : Les cyclodextrines</b>	
III.1. Introduction .....	<b>22</b>

III.2. Historique.....	22
III.3. Définition .....	22
III.4. Structure chimique .....	22
III.5. Caractéristiques et propriétés des cyclodextrines.....	23
III.5.1. Caractéristiques physicochimiques .....	23
III.5.2. Autres Propriétés .....	24
III.5.3. Propriétés de complexation des CDs .....	25
III.5.4. Propriété de reconnaissance chirale des CDs.....	27
III.6. Les cyclodextrines modifiées .....	28
III.6.1. Les sites de modifications .....	28
III.6.2. Difficultés des modifications .....	28
III.6.3. Exemples de CDs modifiées .....	29
III.7. Dérivés des cyclodextrines .....	29
III.8. Conclusion.....	29

## **Chapitre IV: Les liposomes**

IV.1. Introduction .....	30
IV.2. Historique .....	30
IV.3. Définition.....	30
IV.4. Structure .....	31
IV.5. Composition des liposomes .....	31
IV.5.1. Les phospholipides .....	31
IV.5.2. Le cholestérol.....	32
IV.5.3. Autres constituants.....	33
IV.6. Classification des liposomes .....	33
IV.7. Méthodes de préparation des liposomes .....	33
IV.7.1. Méthodes mécaniques de dispersion de phospholipides .....	34
IV.7.2. Méthodes basées sur l'élimination du détergent.....	36
IV.7.3. Méthodes utilisant des liposomes préformés .....	36
IV.7.4. Méthodes basées sur l'élimination du solvant organique .....	36
IV.8. Production des liposomes à grande échelle .....	37
IV.9. Stabilité des liposomes .....	38
IV.9.1. Agrégation des liposomes .....	38

IV.9.2. Dégradation chimique des liposomes .....	38
IV.9.3. Lyophilisation des liposomes .....	38
IV.10. Conclusion.....	<b>39</b>

**Tavaux antérieurs.....41**

**Chapitre V: Matériels et méthodes**

V.1. Optimisation d'un procédé d'encapsulation de la propolis par les cyclodextrines (PM- $\beta$ CD) et les liposomes .....	<b>43</b>
V.1.1. Introduction .....	43
V.1.2. Préparation de complexe propolis-PM- $\beta$ CD avec les conditions optimales.....	43
V.1.3. Préparation des suspensions propolis-liposome.....	46
V.2. Détermination des réponses du plan d'expérience .....	<b>48</b>
V.2.1. Dosage des flavonoïdes des complexes d'inclusions (propolis-PM- $\beta$ CD) par l'UV-visible .....	48
V.2.2. Détermination de la taille des solutions liposomales .....	50
V.3. Préparation de l'optimum de complexe propolis-PM- $\beta$ CD .....	<b>51</b>
V.3.1. Diffraction des rayons X (DRX) .....	51
V.4. Préparation de l'optimum.....	<b>52</b>
V.4.1. .Détermination du taux d'encapsulation .....	52
V.5. Analyse par spectroscopie UV-visible .....	<b>55</b>
V.6. Test de motilité des spermatozoïdes (déterminations de VSL) après réfrigération....	<b>56</b>
V.6.1. Réfrigération du sperme .....	56

**Chapitre IV: Résultats et discussions**

VI.1. Détermination des réponses du plan expérimental.....	<b>58</b>
VI.2. Analyse par la diffraction des rayons X (DRX) .....	<b>66</b>
VI.3. Analyse par spectroscopie infrarouge IR .....	<b>68</b>
VI.4. Analyse par spectrophotométrie d'absorption UV-visible.....	<b>70</b>
VI.5. Motilité des spermatozoïdes .....	<b>71</b>
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>73</b>

**Références bibliographiques**

**Annexes**

# **Introduction générale**

La santé fait partie des préoccupations de l'homme, il continue toujours à chercher le meilleur moyen de s'entretenir. Ses recherches ont connu un changement considérable ces dernières années. Plusieurs industriels tels que le pharmaceutique et cosmétique ont suivi une nouvelle révolution : le retour d'utilisation des produits naturels. Ainsi, la médecine propose des traitements plus doux, moins agressifs et surtout plus acceptés par le malade.

Des recherches plus avancées ont permis de découvrir les traces d'utilisation des produits apicoles, parmi les quels on trouve : la propolis. Cette substance résineuse d'origine végétale recueillie par les abeilles sur les bourgeons, et les feuilles de diverses plantes [1] est utilisée à des fins médicales pour ses propriétés thérapeutiques grâce à sa composition chimique. Après une étude bibliographique effectuée, il apparaît très clairement que le plus grand obstacle issu de l'utilisation de cette substance est sa faible hydrosolubilité dans les milieux physiologiques. Pour remédier à ce problème, l'encapsulation par les cyclodextrines, et les liposomes semble une solution adéquate.

Les cyclodextrines (CD) sont un groupe d'oligosaccharides cycliques produit à partir de l'amidon ou de ses dérivés, elles constituent des systèmes d'encapsulation car elles permettent de former des complexes d'inclusions avec des principes actifs peu hydrosolubles, ce qui permet d'améliorer leur solubilité, leur biodisponibilité et leur stabilité [2].

Les liposomes sont des vésicules lipidiques, sphériques composées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides entourant des compartiments aqueux. Ils sont couramment utilisés pour assurer une libération contrôlée des principes actifs, améliorer leur pharmacocinétique et diminuer leur toxicité [3].

En résumé, ce travail a été effectué dans le cadre d'optimiser un procédé d'encapsulation avec la PM $\beta$ -CD et le liposome en fixant le dosage des flavonoïdes et la taille de liposome comme réponses, cette démarche a été réalisée à l'aide d'un plan d'expérience (modèle 06), et à la fin un test de conservation spermatique sera étudié.

Ce manuscrit est composé de plusieurs parties :

Le premier chapitre se propose de faire un point bibliographique sur la propolis : son historique, ses origines, sa récolte, sa composition chimique et ses différentes propriétés biologiques.

Ensuite le second comporte un rappel sur la définition, les types et les différentes méthodes d'encapsulation.

Le troisième chapitre concerne un récapitulatif sur les cyclodextrines, et les complexes d'inclusions.

Dans le quatrième chapitre une description générale des liposomes, de leur application, des méthodes de caractérisations et de leur formation seront présentés.

Enfin l'étude expérimentale, est subdivisée en :

Matériels et méthodes utilisés pour effectuer cette étude, dont on peut citer les plans d'expériences, et les différentes techniques de caractérisation : Diffraction de rayon X, Infrarouge, HPLC, et spectrophotométrie d'absorption UV-visible.

A la fin les résultats les plus pertinents et leurs discussions seront exposés.

# **CHAPITRE I**

## **La propolis**

## I.1. Introduction

La propolis fait partie des matières qu'il faut préserver en raison de ses bienfaits, notamment dans le domaine de la médecine ; cette substance résineuse assure la protection des bourgeons de l'arbre puis la protection de la ruche, et enfin la protection de l'homme.

D'abord elle est fabriquée par les abeilles à partir de certaines parties des végétaux, essentiellement les bourgeons et les écorce des arbres et des arbustes, ensuite elles les modifient avec leurs sécrétions salivaires.

La propolis possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. L'ensemble des recherches effectuées à ce jour permet de montrer plusieurs propriétés biologiques de ce produit. Ces propriétés sont en rapport avec la composition chimique [4].

## I.2. Historique

La propolis est un remède traditionnel qui est utilisé depuis l'antiquité. En effet les égyptiens connaissaient les propriétés anti-purifiantes de la propolis et l'utilisaient pour la momification des cadavres. Les propriétés médicinales de la propolis étaient reconnues par les médecins grecs puisque Aristote la considérait comme un remède aux infections de la peau et des plaies. Les Romains l'ont donné à tous les soldats pour soigner leurs blessures pendant les différentes invasions.

Les médecins arabes l'utilisaient comme antiseptique et cicatrisant dans le traitement des plaies, et par les Incas qui l'employaient en tant qu'agent antipyrétique. Parmi les usages non médicaux, nous citons son emploi comme vernis pour le traitement et la protection des violons, ce qui leur donne un meilleur son [5].

## I.3. Définition

L'origine du mot propolis est grec qui signifie pro « en avant », et polis « la cité », elle est très utilisée pour la défense de la ruche (Figure I.1).

La propolis est une substance résineuse principalement d'une consistance dure et collante, elle est recueillie par les abeilles dans certaines parties des végétaux essentiellement le peuplier, Le bouleau, le chêne, l'orme, l'aulne, le pin, le sapin et le marronnier, ce sont les principaux arbres qui produisent de la résine transformée par les abeilles en propolis, sa couleur et son odeur changent en fonction de la plante dont elle est issue [6].



**Figure I.1.** La propolis brute

## **I.4. Origines**

Les composants de la propolis peuvent provenir de trois sources distinctes [7] :

### **I.4.1. Animale**

Les substances sécrétées par les abeilles (la cire, et la salive), et les matières accessoires introduites lors de la production de la propolis (le pollen, nectar ou le miel).

### **I.4.2. Végétale**

Les abeilles récoltent ses précieuses substances sur les bourgeons de peupliers, bouleau, les frênes, les saules, seulement en Europe et dans les régions tempérées par contre dans les autres régions il existe d'autre plante telle que Macaranga Tanarius.

## **I.5. La récolte de la propolis**

### **I.5.1. Par les abeilles**

La récolte de la propolis est faite par un nombre restreint d'abeilles ouvrières butineuses (qui sont dans la dernière partie de leurs existences). Ces ouvrières sont très spécialisées dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie (la récolte du nectar par exemple), leur travail se limite au colmatage de l'intérieur de la ruche (Figure I.2).

La récolte qui ne répond pas à des règles bien définies et constantes, dépend de nombreux facteurs [8]:

- **Facteurs saisonniers** : selon les cas, elle est récoltée soit au début de la saison (au printemps), soit le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche de l'automne (au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage).

- **Facteurs géographiques** : il a été constaté que les ruches situées dans les régions boisées propulsent plus que les ruches de plaines.

- **Facteurs climatiques (la température)** : les abeilles récolteuses de propolis déploient leur activité au cours des journées chaudes (température supérieure à 20°C) et en particulier pendant les heures les mieux exposées à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en moyenne). Ceci est dû au fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires.

- **Facteurs liés à la race d'abeille** : il est reconnu que les caucasiennes et certaines autres races d'Asie mineure (celle d'Anatolie centrale en particulier) propulsent en général d'avantage que les autres. Dans de nombreux autres cas, les données concernant ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises.

Cette récolte s'effectue schématiquement de la façon suivante :

- La butineuse fait d'abord usage de ses antennes pour situer la partie la plus intéressante de la source qu'elle attaque alors avec ses mandibules (Figure I.3);
- Ensuite, tête redressée, elle se recule afin d'étirer le morceau de résine saisi jusqu'à ce qu'il soit transformé en un fil et que celui-ci se rompe;
- Elle travaille cette résine avec les mandibules et la prélève avec les pattes antérieures et elle la transfère de ses pattes antérieures aux pattes centrales
- Enfin elle la transfère dans la corbeille située du même côté. Cette séquence se répète jusqu'à ce que la corbeille soit chargée;
- Après, l'abeille peut voler pendant quelques secondes au-dessus de la source de résine, puis atterrir à nouveau pour compléter chaque corbeille.



**Figure I.2.** La récolte de la propolis par l'abeille



**Figure I.3.** Butineuses de propolis dans la ruche

### **I .5.2. La récolte par l'apiculteur**

La propolis peut être récoltée selon deux différentes techniques :

- Raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence à température assez basse. La propolis dure et friable se détache mieux (Figure I.4) [8].
- Utilisation de différents dispositifs: grille moulée en matière plastique ou en métal. Cette grille est posée comme couvre cadres. Les abeilles s'empressent d'obturer ces trous de propolis. Le moment idéal se situe après la récolte d'été, les abeilles se consacrent plus facilement à cette tâche, à l'approche d'hiver. Cette dernière technique est la meilleure.

La quantité récoltée est très variable. Elle est sous la dépendance de facteurs qui conditionnent la propre récolte par les abeilles. Elle se situe en moyenne entre 100 et 300 g par ruche et par an. Cette propolis brute doit être purifiée avant toute utilisation [8].



**Figure I.4.** Récolte de la propolis par l'homme au niveau de la ruche

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

La composition chimique de la propolis est très complexe avec presque 150 constituants différents. Toute fois, elle varie d'un type à un autre. Elle dépend de l'origine botanique et géographique des plantes visitées par les abeilles [9].

### **I.6.1. La résine**

La résine est un constituant majeur de la propolis représentant 55% de l'ensemble de ces composants (Figure I.5). Elle est constituée de flavonoïdes (flavones, flavonols, flavonones et flavononols), et d'acide phénolique (acides caféique, cinnamique, férulique, isoférulique et p-caumarique) et d'esters [10].

#### **I.6.1.1. Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des composés qui possèdent de fortes propriétés antioxydantes. Ils sont responsables de la couleur des aliments. Les flavonoïdes améliorent la fonction de la vitamine C et protègent contre l'oxydation. On les trouve dans une grande variété de fruits et de légumes et ils ont des effets bénéfiques pour le cœur, les artères, le foie, le système immunitaire, le tissu musculaire et le système nerveux [11].

#### **1.6.1.2. Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques sont des composés formés d'un ou de plusieurs noyaux benzéniques présentant une ou plusieurs fonctions carboxyliques [12].

### **I.6.2. La cire et les huiles essentielle**

Après les résines, les constituants principaux de la propolis sont la cire (le produit de la ruche qui à le moins d'application thérapeutique) et les huiles essentielles. Les lipides qui constituent la propolis sont principalement des terpénoïdes (farsénol par exemple) et les lipides issus de la cire [13].

### **I.6.3. Le pollen**

Le pollen représente 5% de sa composition totale. Il est constitué de protéine et d'acides aminés. Ces derniers représentent 1% dont l'arginine et la proline occupent 45.8% d'acides aminés totaux [10].

#### I.6.4. La matière minérale

La propolis est constituée de 5% de matières minérales. Elle est représentée principalement par le fer et le zinc. Les autres éléments minéraux présents dans la propolis sont l'aluminium, l'argent, le calcium, le cuivre, le magnésium, le potassium et le sodium [14].

#### I.6.5. Les vitamines

Les vitamines identifiées dans la propolis sont les vitamines A, C, E, et les vitamines du groupe B en particulier B3 [15].

#### I.6.6. Autres substances

La propolis est extrêmement riche en acides aromatiques, aliphatiques et en esters. Les acides et surtout leurs esters jouent un rôle primordial dans l'effet thérapeutique de la propolis

La propolis contient également de l'acide acétyl salicylique, des acides organiques (acides benzoïque et gallique), des aldéhydes aromatique (vanilline et l'isovanilline), des coumarines (escultéol et le scopoléto), des glucides (glucose, fructose et mélizitose),... [13].

##### I.6.6.1. Les coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques non volatiles, insolubles dans l'eau, ils sont très répandus chez les végétaux, notamment dans les racines et les écorces, d'odeurs agréables. Certaines servent en parfumerie [16].

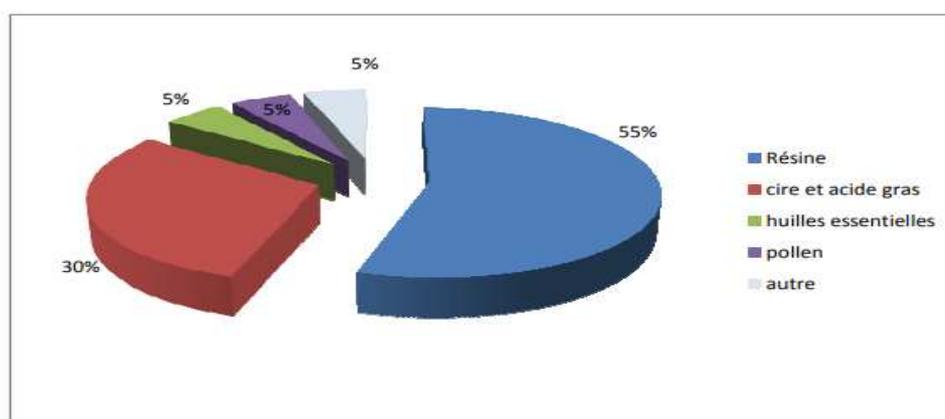


Figure I.5. Composition de la propolis

#### I.7. Activités biologiques de la propolis

La propolis possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. L'ensemble des recherches effectuées à ce jour ont démontré plusieurs propriétés biologiques de ce produit. Ces propriétés sont en rapport avec la composition chimique.

On distingue :

- **I.7.1. Activité antimicrobienne de la propolis**

L'activité antibactérienne est due aux composés actifs de la propolis tels que les composés aromatiques (l'acide caféique) et les flavonoïdes [17].

- **I.7.2. Activité antioxydante**

La propolis joue un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres grâce à ces propriétés antioxydantes et sa richesse en polyphénols tels que : les acides phénoliques et les Flavonoïdes, ce qui la rend le produit le plus actif des produits de la ruche en ce qui concerne cette propriété [18].

- **I.7.3. Activité antifongique**

La propolis exerce une activité fongicide contre les germes appartenant au genre Candida, mais aussi contre les champignons de type Aspergillus et Mirosporum ainsi contre les levures [19].

- **I.7.4. Activité anti- inflammatoire**

L'effet anti-inflammatoire de la propolis proche à celui de l'aspirine, avec des doses dépendantes. Les extraits aqueux donnent de meilleurs résultats. Les flavonoïdes sont responsables, en inhibant la synthèse de NO et de PG, inducteurs d'inflammation, et en supprimant la production de cytokines inflammatoires par les monocytes/ et les macrophages [20].

- **I.7.5. Activité antivirale**

La propolis comprend une complexité de composés qui lui confèrent des propriétés antivirales. Les flavonoïdes et les dérivés d'acides aromatiques sont responsables de l'activité antivirale des extraits de propolis, en empêchant l'entrée du virus dans les cellules ou en perturbant la réplication virale [15].

- **I.7.6. Activité anti-tumorale**

Les composants de la propolis possèdent des propriétés anti-tumorales. Ces composés sont impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'inhibition de transfert de maladies d'une partie du

corps à une autre. La propolis est capable d'arrêter la synthèse de l'ADN dans les cellules tumorales, et de provoquer le vieillissement de ces dernières. L'effet anti tumoral de la propolis est dû à la fonction combinée de ses constituants poly phénoliques [21].

- **I.7.7. Activité anticancéreuse**

La propolis et ses composés phénoliques exercent un effet anticancéreux et des propriétés chimio-préventives par mécanisme d'action multiple affectant les voies apoptotiques dans les cellules cancéreuses. L'extrait de la propolis et les poly phénols isolés sont capables de sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose [22].

- **I.7.8. Activité anti-protozoaire**

Une autre propriété biologique importante déjà attribuée à la propolis est l'activité anti protozoaire. Plusieurs publications ont rapporté l'effet de la propolis sur les protozoaires qui provoquent des maladies chez l'homme et les animaux tels que : la giardiase, Chagas, et la leishmaniose [23].

- **I.7.9. Activité anesthésique**

La propolis possède une action anesthésiante, ceci grâce à l'activité des huiles volatiles de celle-ci. Cette action n'est pas issue d'un mécanisme central comme la morphine et n'a pas d'effets indésirables comme la cocaïne (collapsus, malaises...) [24].

- **I.7.10. Activité immunmodulatrice**

La propolis possède une action immun-modulatrice grâce au dérivé de l'acide caféique (phényle ester de l'acide caféique ou CAPE) et une action bénéfique a été observée dans le traitement de l'asthme ainsi que dans les cas de cancers du sein et de certains types de leucémie [24].

## **I.8. Utilisation de la propolis**

### **I.8.1. Utilisation de la propolis par les abeilles :**

A l'intérieur de la ruche, la propolis sert de mastic de ciment ou de baume. Les abeilles l'emploient pour [4] :

- Assurer une meilleure isolation thermique;
- Obturer les fissures;

- Réduire l'ouverture de trou de vol dans les régions à climat froid (Figure I.6);
- Recouvrir les corps étrangers (souris, cétoines, frelons.....etc.) qu'elles ne peuvent pas évacuer;
- Réparer les rayons et renforcer les minces parois des alvéoles en l'incorporant à la cire que l'abeille secrète;
- Stériliser les alvéoles avant la ponte.



**Figure I.6.** Les abeilles réduisent le trou de vol avec de la propolis

## **I.8.2. Utilisation de la propolis par l'homme**

La propolis est largement utilisée dans plusieurs domaines tels que :

### **I .8.2.1. Cosmétique**

La propolis et ses extraits ont été largement utilisés dans la dermatologie et la cosmétique. Ses effets sur la régénération et la rénovation des tissus ont été bien étudiés. Grâce à ses caractéristiques bactéricides et fongicides, elle offre de nombreux bénéfices dans diverses applications [25].

### **I .8.2.2. Médecine**

Elle est utilisée dans le traitement de plusieurs maladies telles que [26]:

- Les problèmes cardiovasculaires
- Appareil respiratoire (pour diverses infections)

- Soins dentaire
- Les ulcères
- Les infections des muqueuses et les lésions
- Le cancer
- Renforcement du système immunitaire.

### **I.8.2.3. Technologie alimentaire**

Les activités antioxydantes, antifongiques et antibactériennes de la propolis lui offre une place de choix dans ce domaine. Les résidus des propolis semblent avoir un effet généralement bénéfique pour la santé humaine. Cependant, seulement très peu d'études ont été faites sur les effets secondaires possibles sur la plus grande consommation des propolis. D'après la littérature, certains composants identifiés dans les propolis peuvent être très préjudiciables à la santé humaine. La propolis peut être utilisée comme outil de conservation dans la fabrication des emballages intelligents [27].

### **I.8.2.4. Usage vétérinaire**

En URSS sous l'égide de l'institut de recherche vétérinaire et médicale KAZAN, les laboratoires effectuent des recherches sur l'emploi de la propolis dans le but de renforcer l'immunité des animaux aux épidémies et parasites. Les résultats en 1965 ont démontré que la propolis accroît le mécanisme de défense, provoque la formation d'anticorps, accroît la phagocytose, contribue à l'augmentation des protéines du sang en favorisant leur régénération [27].

## **I.9. L'extraction de la propolis**

Pour une production à usage personnel, on peut utiliser l'une des méthodes de purification suivantes :

La méthode la plus rapide consiste à faire chauffer la propolis dans de l'eau aux environs de 65°C, la cire va commencer à fondre étant d'une densité plus faible que l'eau, elle va monter en surface accompagnée de pas mal d'impuretés. Il est alors facile de faire la séparation. L'inconvénient du chauffage est une altération de certaines propriétés chimiques de la propolis.

L'autre méthode consiste à faire macérer la propolis pilée dans l'éthanol (alcool éthylique) titré à 70°C ou 80°C. La méthode consiste à macérer un volume de propolis dans 3 volumes d'alcool pendant deux semaines à l'abri de la lumière en remuant très régulièrement. Le problème de cette méthode, en dehors de sa lenteur, une partie de la cire peut être dissous dans l'alcool. De plus la teinture mère obtenue le goût et l'odeur peuvent être contaminés avec de l'alcool, ce qui n'est pas adapté à tous les usages [28].

### **I.10. Conservation**

La propolis se conserve assez facilement dans de bonnes conditions sans précautions. Mais il paraît préférable de la garder dans des récipients opaques, bien fermés à l'abri de la lumière et de la chaleur (à 10 ou 12°C de préférence).

De nombreuses expériences ont montré que le stockage de longue durée de la propolis ne diminue pas sa composants chimiques, ni ses activités biologiques. Cependant, pour obtenir de meilleurs effets, il vaut toujours mieux l'utiliser la plus fraîche possible [29].

### **I.11. Conclusion**

La propolis est l'une des substances naturelles les plus utilisé en médecine pour sa richesse en composition chimique, et qui est connu par ses diverses activités biologiques.

# **CHAPITRE II**

## **L'encapsulation**

## II.1. Introduction

En générale l'encapsulation est utilisée dans tous les domaines industriels comme l'agrochimie, l'agroalimentaire, le pharmaceutique et dans la cosmétique [30].

Une très grande variété de matières actives ont été formulées en utilisant différents procédés d'encapsulation; surtout les produits pharmaceutiques qui représentent la plus large gamme, elle comprend : les antibiotiques, les anti-inflammatoires, les stéroïdes, les contraceptifs, les peptides, les protéines, les vitamines, les sels organiques et minéraux.

Dans le domaine agricole, les pesticides (les herbicides, les insecticides et les fongicides...) sont aussi encapsulés par différentes techniques pour former des PDS « Pesticide Delivery Systems ».

Ainsi que dans l'industrie alimentaire, les substances actives les plus encapsulées sont les additifs comme les conservateurs, les colorants, les édulcorants, les enzymes, les antioxydants, les arômes, et les acides [31].

## II.2. Définition de l'encapsulation

L'encapsulation signifie enfermer un composé ou un système au sein d'une matrice ou d'un matériau dispersé dans le but de l'immobiliser, et le protéger des conditions environnementales. Les capsules peuvent contenir un principe actif (cas de l'administration de médicaments) ou des cellules (cas de la thérapie cellulaire) [30]. Le fait d'encapsuler une substance peut permettre d'augmenter sa densité, ou encore la diminuer en incluant de l'air dans la capsule [32].

## II.3. Objectifs de l'encapsulation

Parmi les principaux objectifs d'encapsulation, on peut citer [33] :

- Masquage du goût et dissolution / libération dans le suc gastrique ou intestinal;
- Libération contrôlée ou retardée en fonction du pH ou de la température;
- Une manipulation plus facile dans le cas des formes poudres;
- La protection du contenu vis-à-vis d'une autre molécule (problème d'incompatibilité) et de l'environnement extérieur (lumière, pH, chaleur, humidité ...).

## II.4. Différents types d'encapsulation

On distingue deux (02) types d'encapsulation : la micro-encapsulation et la nano encapsulation [34].

### II.4.1. La micro-encapsulation

La micro encapsulation regroupe l'ensemble des technologies qui permettent la préparation de microparticules individualisées, constituées d'un matériau enrobant contenant une matière active. La terminologie « microcapsules » sous entend des entités dont le diamètre est compris entre 1 et 1000  $\mu\text{m}$ .

### II.4.2. La nano-encapsulation

La nano-encapsulation se définit comme une technologie permettant d'encapsuler des substances à l'échelle nanométrique ; à un potentiel plus élevé que la micro-encapsulation d'augmenter la biodisponibilité, d'améliorer la libération contrôlée et de permettre un ciblage précis des composés bioactifs. Les nanoparticules sont des particules de taille colloïdale ayant des diamètres allant de 10 à 1000 nm.

## II.5. Les différents procédés d'encapsulation

L'encapsulation peut être obtenue de plusieurs façons, suivant la taille désirée et les propriétés physico-chimiques du principe actif à encapsuler. Il existe trois grandes familles [35].

### II.5.1. Procédés mécaniques

Le procédé mécanique de l'encapsulation se base sur l'enrobage des microparticules en lit fluidisé, ou extrusion du mélange de la matière active de l'agent enrobant [35].

#### II.5.1.1. Encapsulation à l'aide de fluide supercritique

Les propriétés des fluides supercritiques sont souvent décrites comme intermédiaire entre celle d'un liquide et d'un gaz. Ces propriétés peuvent être facilement modifiées par des variations de pression et de température

Le dioxyde de carbone est le fluide supercritique le plus utilisé en raison de sa température critique qui est relativement basse et très approprié pour le traitement des matériaux sensibles à la chaleur. En outre, le  $\text{CO}_2$  supercritique est non toxique, ininflammable, peu coûteux et a le statut GRAS [36].

### II.5.1.2. Lit d'air fluidisé (Spray-coating)

Cette technique s'applique exclusivement à des matières actives sous forme solide (granulé cristaux). Les particules à encapsuler sont fluidisées à l'aide d'un flux d'air, après le matériau enrobant est pulvérisé sur cette suspension fluide de particule (Figure II.1).

Cette fluidisation permet d'assurer un mélange constant et homogène des particules avec un transfert de chaleur optimal entre l'air et la surface de particule [37].

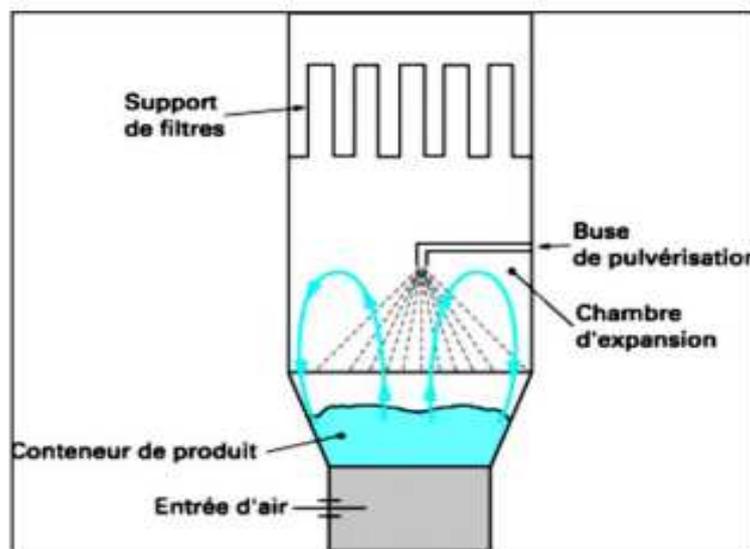


Figure II.1. Représentation schématique d'un appareil à lit d'air fluidisé

### II.5.1.3. Extrusion-sphéronisation

La technique d'extrusion-sphéronisation peut être utilisée pour l'encapsulation des matières de principes actifs dans des polymères thermoplastiques, dont la viscosité à l'état fluide permet de préparer des micro-cylindres homogènes et réguliers [37].

## II.5.2. Procédés chimiques

Les procédés d'encapsulation chimiques reposent sur la formation in situ du matériau enrobant. On distingue la polymérisation inter-faciale et la polymérisation in situ [31].

### II.5.2.1. Polymérisation inter-faciale

Polymérisation inter-faciale est un processus très utilisé. Il peut permettre, non seulement, l'encapsulation d'espèces hydrophobes mais aussi d'espèces hydrophiles. Elle met en jeu

deux (02) monomères ayant des groupes fonctionnels complémentaires (A et B) chacun est soluble dans une des phases d'un système diphasique [31].

### II.5.2.2. Polymérisation in situ

Polymérisation in situ combine une émulsion eau dans huile (E/H) ou huile dans l'eau (H/E). C'est une réaction chimique entre deux réactifs à l'interface de la phase dispersée. La phase dispersée contient un solvant, un principe actif et un monomère, elle peut être soit aqueuse, soit organique [38].

### II.5.3. Procédés physico-chimiques

Le procédé d'encapsulation physico-chimique est basé sur la maîtrise de certains paramètres tels que la solubilité et la précipitation des polymères en fonction de l'ajout d'un non-solvant, ajustement du pH ou de la température mais aussi sur la maîtrise des changements d'état (fusion, solidification...) des polymères [39].

#### II.5.3.1. Coacervation

Coacervation est largement utilisée pour la préparation des microcapsules de gélatine, des dérivés cellulosiques ou des polymères synthétiques (Figure II.2).

On distingue la coacervation simple et la coacervation complexe.

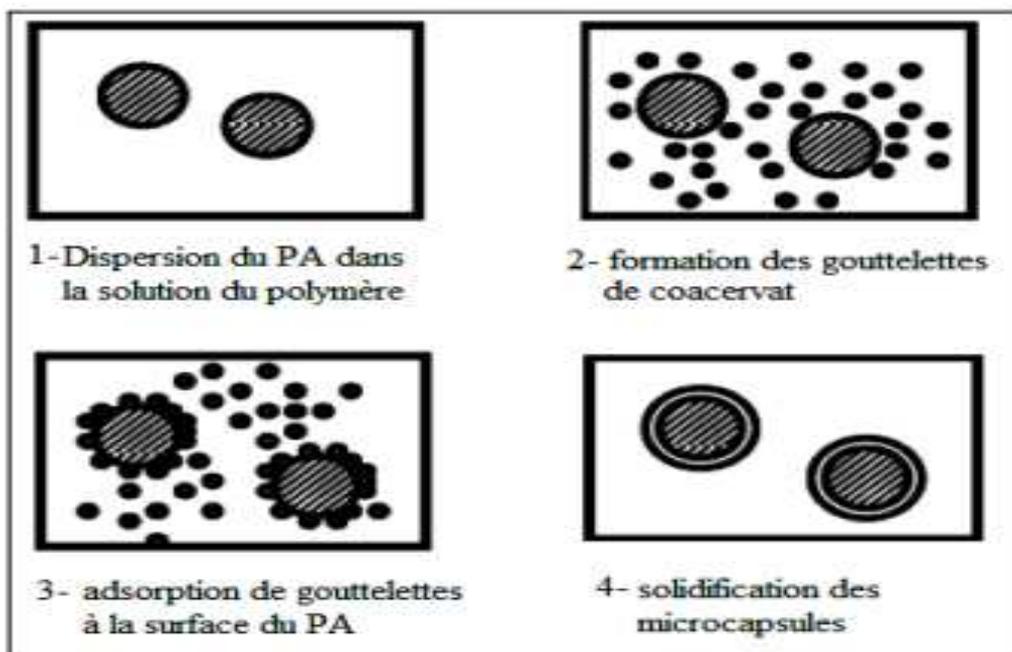


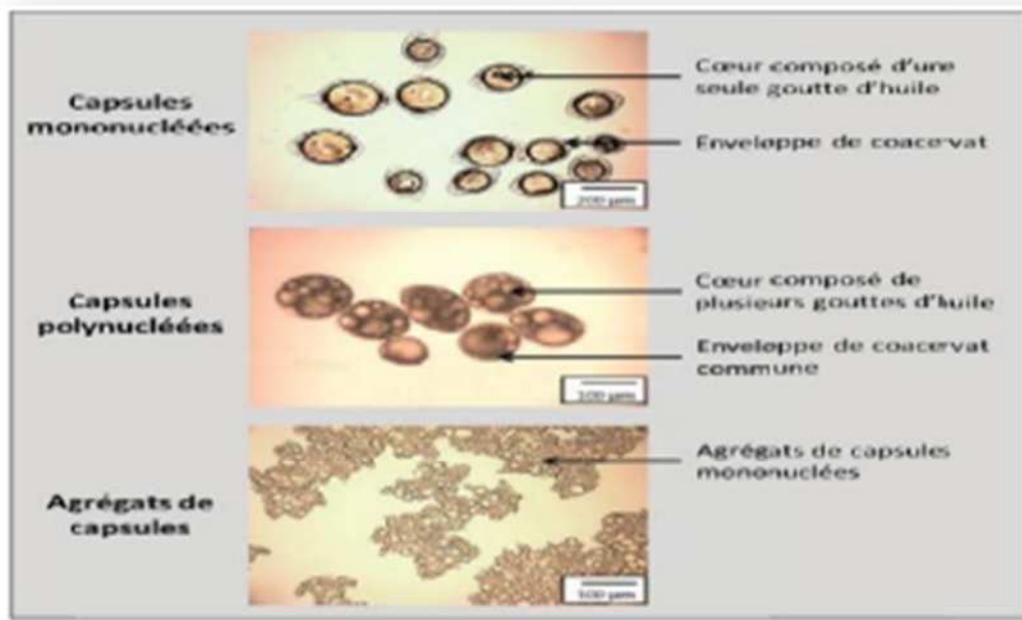
Figure II.2. Principe de l'encapsulation par coacervation

### II.5.3.1.1. Coacervation simple

La coacervation simple implique généralement l'utilisation d'un seul polymère tel que la gélatine ou l'éthylcellulose. Elle peut être réalisée par addition d'un composé (électrolyte ou alcool), ayant une affinité plus élevée pour l'eau, à une solution contenant un polymère.

### II.5.3.1.2. Coacervation complexe

La coacervation complexe consiste à utiliser deux polymères hydrosolubles ayant des charges opposées (Figure II.3). La séparation de phase est induite par des interactions polymère conduisant à la formation d'un coacervat de faible solubilité, qui va précipiter et induire la séparation de phase.



**Figure II.3.** Représentation des trois types de capsules pouvant être obtenus par coacervation complexe

### II.5.3.2. Evaporation de solvant

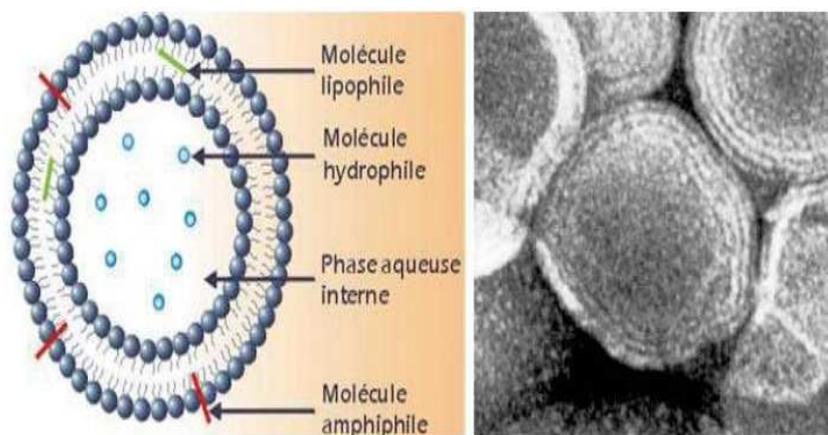
Elle se base sur l'évaporation de la phase interne d'une émulsion sous agitation donnant lieu à la précipitation du polymère d'enrobage préalablement dissous dans cette phase sous forme de microsphères [40].

## II.6. Les différents agents d'encapsulation

### II.6.1. Les vecteurs particuliers

Les vecteurs particuliers sont des systèmes d'encapsulation représentés par des particules sphériques à base de phospholipides (les liposomes) (Figure II.4) ou formées à partir de polymères biodégradables (les microparticules et les nanoparticules). Selon leur architecture interne, ils peuvent être classés en systèmes réservoirs (les capsules et les liposomes) ou matriciels (les sphères).

En général, le choix du vecteur s'effectue en fonction de la voie d'administration envisagée, mais aussi en fonction du profil de libération recherché [41].



**Figure II.4.** Représentation schématique et un micrographe des liposomes en microscopie électronique à transmission.

### II.6.2. Agents de support à base de polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères glucidiques naturels constitués de plusieurs monosaccharides avec des liaisons glycosidique et se trouvent en abondance dans diverses sources, y compris 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 [42].

### **II .6.3. Agents à base de protéines**

Les protéines sont généralement considérées comme des matériaux gras avec une grande importance nutritionnelle. Elles sont insolubles dans des conditions acides, et facilement dissoutes à un Ph alcalin [43].

Les protéines animales les plus connues dans l'encapsulation sont les protéines de lactosérum, la caséine, la gélatine et le collagène, tandis que les protéines d'origines végétales sont des protéines de soja, la zéine et la gliadine.

Les protéines végétales présentent un excellent caractère hydrophobe par rapport aux protéines animales. Elles sont également considérées moins allergènes et moins couteuses que les protéines animales.

### **II.7. Les applications de l'encapsulation**

La première application industrielle de la micro-encapsulation était à la fin des années cinquante, en fabriquant des capsules qui renferment des colorants pour la préparation des papiers permettant la duplication sous faible pression (voir le tableau II.1).

Au cours du temps, les recherches dans le domaine de l'encapsulation se sont intensifiées, afin de développer de nouvelles technologies d'encapsulation de nouveaux composés, et pour proposer de nouveaux matériaux enveloppants [34].

**Tableau II.1.** Domaines et applications [44]

<b>Domaines</b>	<b>Exemple de composées encapsulées</b>
Pharmacie et Médical	Antibiotiques, enzymes, vaccins, bactéries, vitamines, minéraux, anticorps
Cosmétique	Parfums, anti transpirant, agents bronzants, colorants capillaires.....
Alimentaire	Huiles essentielles, graisses, épices, enzymes, minéraux....
Agriculture	Herbicides, insecticides, engrais, hormones végétales ....
Biotechnologie	Enzymes immobilisées, microorganismes, cellules artificielles....
Chimie	Catalyseurs, enzyme, additifs pour plastiques, et inhibiteurs de corrosion.

## II.8. Conclusion

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

# **Chapitre III**

## **Les cyclodextrines**

### III.1. Introduction

Depuis la découverte des CDs en 1891 par Villiers, elles suscitent actuellement un grand intérêt de la communauté scientifique. Obtenue par dégradation enzymatique de l'amidon, les CDs sont des oligosaccharides cycliques qui possèdent au sein de leur structure une cavité hydrophobe. Celle-ci leur permet de former des complexes d'inclusions avec un grand nombre de molécules dont les propriétés physicochimiques sont modifiées : la solubilité dans l'eau, la réactivité, la stabilité... [45].

### III.2. Historique

L'histoire de la cyclodextrine (CD) commence il y a un peu plus de 100 ans. En 1891, Villiers isole une substance cristalline du doigté bactériologique de l'amidon, ensuite il a déterminé la composition de cette substance et la nomme "cellulosine". Vingt ans plus tard, Schardinger isole la souche microbienne "Bacillus macerance" impliquée dans la formation de ces dextrines cristallisées. En 1938, Freudenberg et son équipe ont révélé que les cyclodextrines sont construites à partir d'unités D-glucose liées par des liaisons  $\alpha$  (1,4) -glucosidiques, et ils ont découvert que les cyclodextrines peuvent former des inclusions complexes et des structures de  $\gamma$ -cyclodextrine. Soixante-dix ans plus tard, après plusieurs recherches et études qui ont prouvé qu'elles n'avaient aucune toxicité inhérente interférant avec l'utilisation de ces dernières [46].

### III.3. Définition

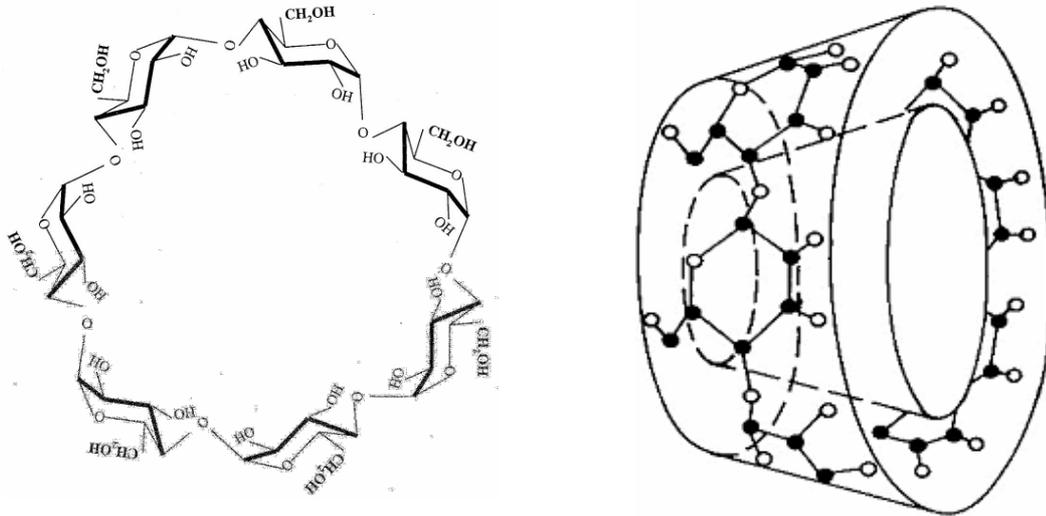
Les cyclodextrines sont des molécules cycliques naturelles constituées des sous-unités de glucopyranose liées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1,4).

Ces CDs peuvent contenir jusqu'à douze unités de glucoses qui ont été isolées, la  $\alpha$  cyclomaltohexaose, la  $\beta$  cyclomaltoheptaose et la  $\gamma$  cyclomaltooctaose avec six, sept, et huit unités de glucose [47].

### III.4. Structure chimique

Les CDs sont composés seulement d'atome de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. Chaque unité glucopyranose se trouve dans une conformation chaise rigide, elles sont reliées par des liaisons glycosidique  $\alpha$ -(1,4). Cet arrangement est à l'origine de la forme des CDs, celle d'une cône tronqué a une cavité centrale dont les ouvertures sont bordées de groupements hydroxyles (Figure III.1).

En résumé, les cyclodextrines ont une structure macrocyclique, hydrophile à l'extérieur, et hydrophobe à l'intérieur. Ces caractéristiques structurales sont à l'origine des propriétés très particulières des CDs [48].



**Figure III.1.** Structure chimique des CDs.

### III.5. Caractéristiques et propriétés des cyclodextrines

#### III.5.1. Caractéristiques physicochimiques

Les trois principales CDs natives sont des composés cristallins, homogènes et non hygroscopiques. Leurs principales caractéristiques physicochimiques sont rassemblées dans le tableau III.1 [49] :

**Tableau III.1.** Caractéristiques physicochimiques des CDs

Caractéristiques	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Nombre d'unités glucopyranose	6	7	8
Formule brute	C <sub>30</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub>	C <sub>42</sub> H <sub>72</sub> O <sub>35</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub>
Masse molaire (g/mol)	972	1135	1297
Diamètre externe (nm)	1.46±0.04	1.54±0.04	1.75±0.04
Hauteur (nm)	0.79±0.01	0.79±0.01	0.79±0.01
Diamètre de la cavité (nm)	0.47-0.53	0.60-0.65	0.75-0.83
Volume de la cavité (nm <sup>3</sup> )	0.174	0.262	0.472
Solubilité dans l'eau (g/l à 25°C)	145	18.5	232
pKa à 25°C	12.3	12.2	12.1

### III.5.2. Autres Propriétés

#### III.5.2.1. Amphiphilicité

La structure des CDs est liée à l'orientation particulière adoptée par les diverses fonctions hydroxyles des unités glucopyranoses, cela permet de lui donner un caractère amphiphile dû à un extérieur relativement hydrophile et un cœur relativement hydrophobe [50].

#### III.5.2.2. Basicité

Les électrons pairs non liés forment des ponts glucosidiques de l'oxygène qui sont orientés vers l'intérieur de la cavité. Les CDs ont des propriétés basiques (selon Lewis) grâce à la densité électrique élevée qui a été produite par les électrons non liés [49].

#### III.5.2.3. Enantiosélectivité

La chiralité des cyclodextrines est due à leurs unités D glucopyranose. Chaque unité de glucose contient cinq centres chiraux. L'enantiosélectivité est formée par la combinaison entre le pouvoir complexant de CDs et ses centres chiraux [51].

**III.5.2.4. Solubilité**

D'une cyclodextrine à une autre, le comportement de la solubilité diffère [49].

**III.5.2.5. Stabilité**

En milieu alcalin les CDs sont stable mais peuvent subir une hydrolyse partielle à un PH inférieur à 3.5 et une température supérieur à 60°C avec une production de glucose et une série de maltosaccharides acycliques qui peut détruire leurs structure [52].

**Tableau III.2.** Exemples des propriétés améliorées par l'utilisation des CDs dans divers domaines d'applications.

Applications	Exemple de propriétés	Produits ou substances concernés
Application pharmaceutique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amélioration de la solubilité.</li> <li>• Augmentation de la biodisponibilité.</li> <li>• Diminution des effets secondaires.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prostaglandines, vitamines A, D, E</li> <li>• Indométacine</li> <li>• Phényle butazone</li> </ul>
Application alimentaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stabilité des produits volatils Confiserie.</li> <li>• Extraction des composants indésirables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menthol, moutarde, cholestérol (lait, œufs, beurre).</li> </ul>
Application cosmétologique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Masquage d'odeurs désagréables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mercaptans Stabil</li> <li>• Essence de citron</li> </ul>
Application agrochimique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminution de la toxicité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herbicides, fongicides.</li> </ul>

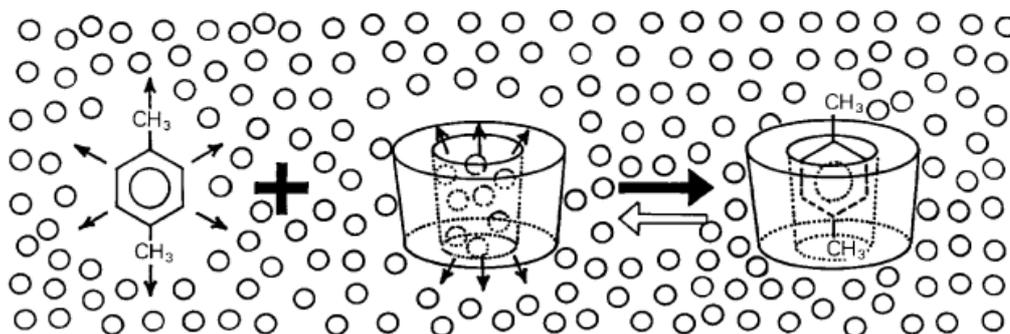
Les CDs sont employés en tant qu'agents de séparation dans différentes techniques principalement séparatives dans le domaine de la chimie analytique [53].

**III.5.3. Propriétés de complexation des CDs**

Les CD peuvent former des complexes d'inclusion avec une variété de molécules (neutres, chargées, polaires ou non polaires). Cette propriété a été soulignée et largement étudiée depuis les années 1950, ce qui augmente leur utilisation dans la plupart des industries [54].

### III.5.3.1. Généralités sur la complexation

Un complexe d'encapsulation est une liaison d'au moins deux molécules (Figure III.2), dont l'une est un substrat (ou "invité"), qui est en tout ou une partie piégé par un autre récepteur (ou "hôte"). Il n'y a pas de liaisons covalentes qui permettent une dissociation facile et douce du complexe formé. En plus des CDs, d'autres types de molécules telles que les éthers couronnes et le calixarène servent également de molécules hôtes [53].



**Figure III.2.** Représentation schématique de la formation d'un complexe d'inclusion CD-xylène et de la dissociation (les petits cercles représentent les molécules d'eau).

### III.5.3.2. Forces conductrices de la complexation

Le phénomène de formation de complexes est le résultat de nombreuses interactions entre les molécules hôtes, les molécules invitées et les solvants, conduisant vers un état thermodynamique plus stable. La nature et l'importance relative des différents phénomènes impliqués dans la formation des complexes CDs, solutés ne sont pas encore entièrement compris et restent controversées. Les interactions qui peuvent se former lors d'une complexation sont [55] :

- Interactions électrostatiques (ion-ion, ion-dipôle, dipôle-dipôle);
- Interactions de van der-Waals (dipôle-dipôle induit, dipôle induit-dipôle induit);
- Interactions hydrophobes;
- Liaisons hydrogènes (électrostatiques);
- Libération des contraintes (distorsion) de la conformation CDs;
- Exclusion des molécules d'eau qui existaient à l'origine dans la cavité;
- Interactions de transfert de charge (l'un des types d'interaction de van der-Waals).

### III.5.3.3. Conséquences de la complexation

L'inclusion des molécules invitées dans la cavité des CD<sub>s</sub> constitue une encapsulation des molécules, ce qui altère leurs propriétés physico-chimiques. Les modifications qui peuvent être entraîné sont [56] :

- Amélioration de la solubilité et la biodisponibilité des solutés (pour les substances actives);
- Modifications de ses caractéristiques spectrales (décalage chimique RMN, longueur d'onde maximale d'absorption UV, intensité de fluorescence...);
- Modifications de sa réactivité (généralement diminuée). Par conséquent, le soluté bénéficie d'une décomposition thermique ou photochimique, d'une protection contre l'hydrolyse et d'une stabilité améliorée;
- Réduit la diffusion, la volatilité et la sublimation.

### III.5.4. Propriété de reconnaissance chirale des CDs

Les cyclodextrines ont généralement la capacité de distinguer des composés structurellement apparentés tels que des énantiomères, des homologues et des isomères. Cette propriété est utilisée dans le domaine de la chimie analytique, notamment dans les procédés de séparations [57].

#### III.5.4.1. Origine de la propriété de reconnaissance chirale

Tout dextrose contient cinq carbones asymétriques totaux étranges les uns des autres. La  $\beta$ -CD contient de ce fait trente-cinq centres chiraux différents [57].

#### III.5.4.2. Applications de ces CDs en chimie analytique

La capacité à reconnaître les CDs de manière chirale est utilisée dans les techniques de séparation multiples, en particulier dans l'électrophorèse chromatographique et capillaire en raison des avantages suivants [57] :

- Mesurer plus de 99 % d'excès d'énantiomères sur une large plage de linéarité avec des échantillons à faible concentration et des matrices complexes;
- Capacité à mesurer plusieurs composés en une seule analyse;
- Possibilité d'identification de structure de liaison telle que la spectrométrie de masse;
- Analyse rapide et automatisée.

Les techniques les plus utilisées pour l'analyse des molécules chirales, en particulier des médicaments sont : l'électrophorèse capillaire (EC) et la chromatographie en phase liquide (CPL), dans l'analyse EC, plus de deux tiers des séparations chirales ont été réalisées à l'aide des CDs [57].

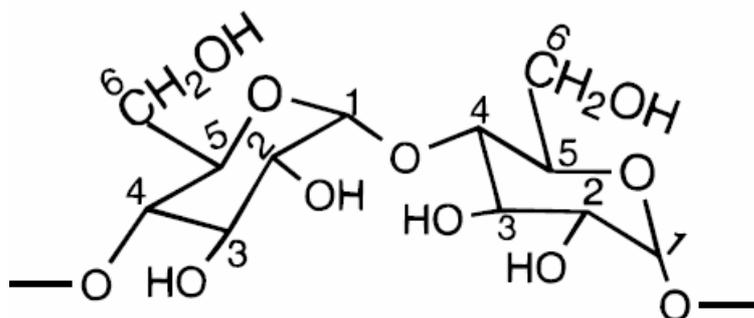
### III.6. Les cyclodextrines modifiées

#### III.6.1. Les sites de modifications

Les CDs peuvent être modifiés en remplaçant l'ensemble de l'atome d'hydrogène ou du groupe hydroxyle par une variété de groupes neutres ou ioniques tels que : les alkyles, les hydroxyalkyles, les sulfobutyles, les glucosyles et les acétyles. En effet, chaque unité de glucose forme un cycle de CD qui peut avoir trois groupements fonctionnels d'hydroxyles [58].

#### III.6.2. Difficultés des modifications

Le canal de modifications des CDs est ordonné au réel luxuriant origines hydroxyle. En effet, les origines hydroxyle présents dans les positions 2, 3 et 6 de toute concordance glucose entrent en réussite vis-à-vis du réactant et rendent les modifications sélectives difficiles (Figure III.3). De plus, les autres peuvent interagir en complexant avec le réactant et orienter leur boyau vers un sens inattendu [59].



**Figure III.3.** Schéma des unités glucose formant le cycle des CDs.

Parce que la modification de la cible est difficile et coûteuse à réaliser, les CDs commerciales sont généralement des mélanges de dérivés qui diffèrent non seulement du nombre de substituant mais aussi de leurs positions sur le cycle, ayant ainsi des teints chiralement différents et d'autres qui présentent des traits cognitifs, ce qui peut rendre leur utilisation plus sensible et moins fertile [59].

### III.6.3. Exemples de CDs modifiées

Plus de 1500 dérivés de CD ont été décrits dans la littérature, mais la plupart d'entre eux ignorent leur utilisation à grande échelle en raison de la difficulté de leur synthèse et du coût élevé qui en résulte. Plus de 100 dérivés disponibles dans le commerce, qui sont principalement utilisés dans la chimie analytique ou intermédiaire de synthèse. En terme de quantité produite ou d'utilisation, les CDs les plus importantes sont les dérivés ayant une grande solubilité dans l'eau, en particulier [58]:

- Les  $\beta$ -CDs méthylées,
- Les  $\beta$ -et  $\gamma$ -CDs hydroxypropylées,
- Les  $\beta$ -CDs sulfobutylées,
- Les CDs branchées (glucosylées, maltosylées),
- Les CDs sulfatées.

### III.7. Dérivés des cyclodextrines

De nombreuses dérivés de CDs ont été synthétisés et modifiés pour différents objectifs [60] :

- Augmentation de leur solubilité aqueuse;
- Augmentation de leur affinité pour une molécule donnée;
- Amélioration de la capacité de complexation des CDs;
- Introduction des groupements spécifiques facilitant la complexation;
- Synthétiser des polymères;
- Minimiser les dégâts provoqués au niveau des membranes.

### III.8. Conclusion

Ce chapitre montre l'importance des différentes CDs, de leurs dérivés, et leurs applications dans plusieurs les domaines.

Toute fois, la synthèse des CDs modifiées conduit le plus souvent à des mélanges de plusieurs dérivés aux propriétés différentes, il est nécessaire de mettre au point des méthodes permettant d'analyser ces mélanges le plus finement possible.

# **CHAPITRE IV**

## **Les liposomes**

### IV.1. Introduction

Les liposomes ont été découverts par Alec Bangham et ses collègues depuis quelques années, et ont été d'abord principalement utilisés comme modèle membranaire. Le terme « liposome » dérive de deux mots d'origine grecque, « lipos » qui signifie gras et « soma » qui signifie corps. Les liposomes sont des vésicules sphériques composés d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques entourant des compartiments aqueux. Leur taille varie d'une vingtaine de nanomètres à quelques micromètres [61].

### IV.2. Historique

Au début des années 1960 Bangham a effectué des travaux de microscopie électrique pour apparaitre le concept de liposome, il était le premier à montrer à l'aide de lécithine d'œuf que des phospholipides purifiés se réorganisent spontanément en présence d'eau, pour former des sphérulites [62].

Les liposomes ont été d'abord un outil d'étude précieux pour les physiciens et les physico-chimistes pour comprendre le comportement des composés amphiphiles en solution.

Ensuite, ils ont été utilisés par les biologistes comme modèles pour l'étude de la perméabilité cellulaire avant d'être proposés, plus tard, comme vecteurs intracellulaires de substances médicamenteuse.

Actuellement, les liposomes sont utilisés dans différents secteurs comme l'agro-alimentaire, la cosmétique et la pharmacie.

Ils sont également utilisés pour le développement de plusieurs traitements, on peut citer : les antibiotiques, anti-tumoraux, antiasthmatique, enzymatique, la thérapie génique ou en vaccination [62].

### IV.3. Définition

Les liposomes sont des véhicules phospholipidiques artificiels et bilamellaires, ils ont une capacité de piéger l'eau et les solutés. L'intérieur de la bicouche lipidique est principalement utilisé pour les études de la perméabilité membranaire et pour le transport de molécules à visée thérapeutique. Il existe plusieurs techniques pour préparer des liposomes à partir des composés amphiphiles comme les phospholipides [62].

#### IV.4. Structure

Les liposomes sont composés de molécule amphiphiles bicaténaires, qui veut dire, deux chaînes hydrocarbonées et une tête polaire (FigureIV.1). Selon une certaine conformation dans l'espace, les molécules lipidiques s'organisent [62].

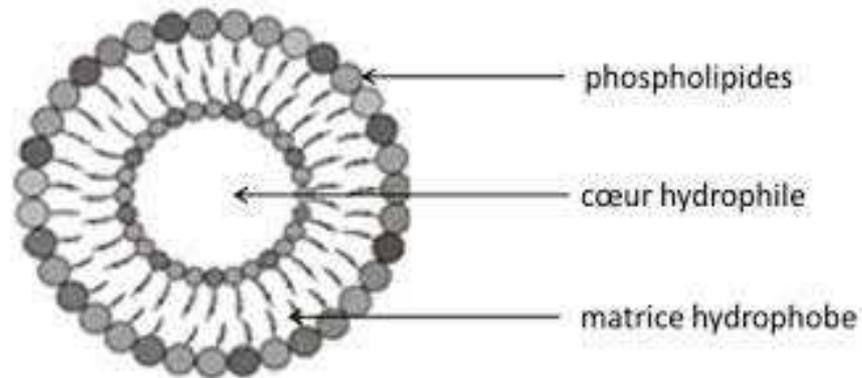


Figure IV.1. Structure d'un liposome

#### IV.5. Composition des liposomes

Les liposomes sont constitués d'un ou plusieurs types de phospholipides biocompatibles, biodégradables, non-immunogènes et non-toxiques. Le cholestérol entre souvent dans la composition des liposomes [62].

##### IV.5.1. Les phospholipides

Les phospholipides les plus employés sont des glycérophospholipides, qui sont les constituants majeurs de la membrane biologique, ce sont des molécules amphiphile. La partie hydrophobe est formée à partir du glycérol dont deux fonctions alcool ont été estérifiées par des acides gras, tandis que la troisième fonction alcool porte un groupement phosphate polaire, qui est estérifié par différents groupement (glycérol, choline, éthanolamine, sérine et inositol), formant la tête polaire du phospholipide [63].

Les phospholipides peuvent former des bicouches de deux chaînes hydrocarbonées généralement entre 14 à 18 atomes de carbone. Ils peuvent être d'origine naturelle ou synthétique [63].

Ces bicouches ont tendance à s'auto-organiser en solution, de manière à ce que les groupements polaires soient en contact avec des groupements polaires qui se trouvent dans le milieu environnant.

L'incorporation dans la bicouche lipidique de phospholipides chargés négativement (comme : le phosphatidylglycérol, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol, et l'acide phosphatidique) ou chargés positivement (les téarylamine) permet de diminuer les phénomènes d'agrégation des vésicules entre elles [63].

#### IV.5.1.1. Température de transition de phase des phospholipides

Les phospholipides sont caractérisés par une température de transition de phase ( $T_m$ , melting temperature) qui correspond au passage d'un état gel ordonné ( $L_\beta$ , configuration trans) vers un état fluide désordonné ( $L_\alpha$ , configuration *gauche*) passant par un état intermédiaire  $P_\beta$ .

La température de transition de phase varie en fonction de la longueur et du degré de saturation des chaînes d'acides gras des phospholipides. Ainsi, la  $T_m$  augmente proportionnellement avec la longueur des chaînes car les interactions de Vander Waals augmentent. Par contre, la  $T_m$  diminue avec le nombre d'insaturation qui défavorise les interactions entre les chaînes. Cette température doit être prise en considération lors de la préparation des liposomes. Ces derniers ne se forment qu'à une température supérieure à celle de leur transition de phase [3].

#### IV.5.1.2. Dynamique des lipides au sein des membranes

Les molécules de lipides peuvent disperser librement dans la bicouche lipidique. Dans la monocouche, les lipides peuvent tourner autour de leur axe perpendiculairement au plan de la membrane ou disperser latéralement dans le feuillet dont ils font partie, par contre au sein de la bicouche, la dispersion transversale appelée «flip-flop » est associée au passage d'un lipide d'une monocouche à une autre. Ce mouvement est lent comme il nécessite le passage de la tête polaire d'une molécule lipidique à l'intérieur de la zone hydrophobe constituée par les queues des phospholipides [3].

#### IV.5.2. Le cholestérol

Le cholestérol s'intercale au sein de la bicouche phospholipidique. Il rentre dans la membrane avec son groupement hydroxyle polaire dirigée vers les têtes polaires des

phospholipides et sa partie apolaire (noyau tétracyclique et chaîne hydrocarbonée) dirigée parallèlement aux chaînes d'acides gras des phospholipides.

A l'état gel (au-dessous de  $T_m$ ), le cholestérol à de faibles concentrations, il tend à augmenter le désordre des phospholipides, particulièrement au niveau des chaînes hydrocarbonées et par conséquent possède un effet fluidifiant. Par contre à l'état fluide (au-dessus de  $T_m$ ), le cholestérol exerce un effet condensant ; il rassemble fermement les phospholipides, la membrane devient moins fluide et moins perméable pour les molécules hydrophile. Il est alors considéré comme un modulateur de la fluidité de la bicouche lipidique et permet la formation des liposomes [64].

#### **IV.5.3. Autres constituants**

D'autres constituants peuvent également entrer dans la composition des liposomes par exemple : les chaînes de polyéthylène glycol (PEG) sont souvent greffées sur les phospholipides ou le cholestérol. Le PEG permet une stabilisation stérique des liposomes. Dans un autre cas, l'addition d'un « edge activator » comme : le déoxycholate de sodium, les polysorbates et les esters de sorbitane déstabilise les bicouches lipidiques formant des liposomes dits déformables [65].

#### **IV.6. Classification des liposomes**

Les liposomes produisent plusieurs types de vésicules différentes en fonction de leurs tailles, leurs capacités d'encapsulation et leurs structures, il est possible d'obtenir [65] :

- Des liposomes unilamellaires S.U.V;
- Des liposomes unilamellaires L.U.V;
- Des liposomes multilamellaires M.L.V;
- Des liposomes obtenue par évaporation en phase inversée R.E.V.

#### **IV.7. Méthodes de préparation des liposomes**

Le choix de la méthode de préparation des liposomes dépend de plusieurs paramètres [62] :

- La concentration de la substance encapsulée et sa toxicité potentielle;

- La taille optimale, la durée de vie des vésicules et la polydispersité pour l'application prévue;
- La nature du milieu dans lequel les vésicules lipidique seront dispersées;
- Les propriétés physico-chimiques de la molécule à encapsulée et celle des composants liposomiques;
- La reproductibilité de la méthode et la possibilité de leur production à grande échelle.

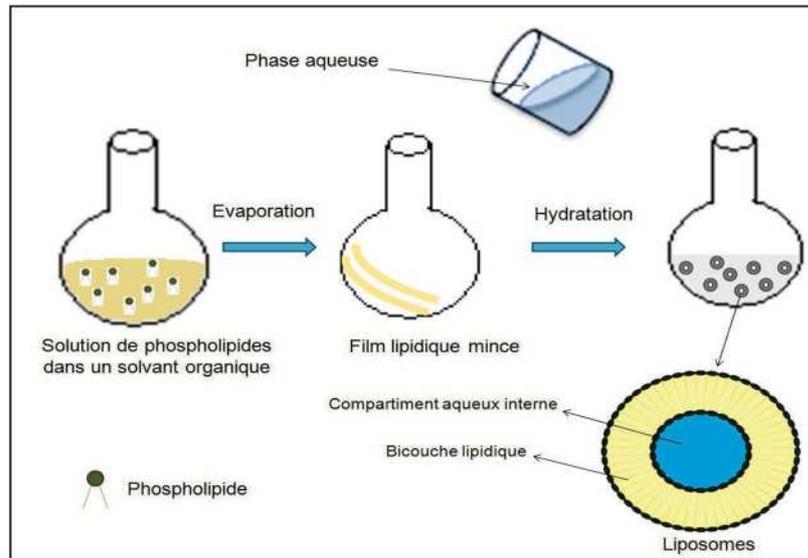
Il existe quatre méthodes principales pour la préparation des liposomes [62] :

- Les méthodes mécaniques de dispersion de phospholipides;
- Les méthodes basées sur l'élimination du détergent;
- Les méthodes basées sur la transformation de liposome préformé;
- Les méthodes basées sur l'élimination organique.

#### **IV.7.1. Méthodes mécaniques de dispersion de phospholipides**

##### **IV.7.1.1. Hydratation du film lipidique**

Cette méthode est la plus couramment utilisée dans la fabrication des MLV (Figure IV.2). C'est une technique simple et rapide. Les lipides sont d'abord dissous dans un solvant organique ou un mélange de solvants organiques, puis le solvant s'évapore, formant un film mince lipidique sur les parois interne. Le film lipidique est hydraté par ajout d'une phase aqueuse. L'étape d'hydratation est réalisée à des températures supérieures à la  $T_m$  des phospholipides, ou à une  $T_m$  plus élevée lorsqu'il s'agit d'un mélange de phospholipides [66].



**Figure IV.2.** Préparation des liposomes par la méthode d'hydratation du film lipidique.

#### IV.7.1.2. Sonication

Les MLV sont soniqués dans un bain à ultrasons à des températures supérieures à la  $T_m$  des phospholipides ou soniqués avec une sonde à ultrasons immergée dans une dispersion de liposomes. Les ultrasons fournissent une énergie sonore induite par la pression qui décompose les MLV en petites vésicules monocouches de type SUV [66].

#### IV.7.1.3. Extrusion

Les liposomes sont extrudés avec une membrane en polycarbonate ou une presse française [66].

##### IV.7.1.3.1. Membrane de polycarbonate

Cette technique consiste à faire passer la suspension de liposomes à travers un filtre en polycarbonate avec une taille de pores bien définie pour obtenir des liposomes avec un diamètre proche de la taille des pores de la membrane utilisée. Les extrusions sont réalisées sous pression modérée (100-250 psi) dans une atmosphère d'azote à des températures supérieures à la  $T_m$  des phospholipides [67].

#### **IV.7.1.3.2. Presse de French**

L'extrusion MLV peut également être réalisée avec une presse française (cellule de presse française). Par conséquent, une pression supérieure à celle utilisée pour les membranes en polycarbonate est requise. Il y a plusieurs avantages par rapport aux systèmes de haut-parleurs. En effet, des passages répétés dans la presse française ne modifient pas les liposomes. Aucune dégradation des phospholipides n'a été détectée après 10 passages consécutifs en absence d'atmosphère d'azote. Cependant, cette méthode est limitée principalement parce qu'il est difficile d'atteindre des températures élevées et d'obtenir des quantités relativement importantes [68].

#### **IV.7.2. Méthodes basées sur l'élimination du détergent**

Les tensioactifs sont utilisés à la concentration micellaire critique (CMC) pour solubiliser les phospholipides dans les milieux aqueux. Après cela, une micelle mixte se forme. Lorsque le détergent est retiré, les micelles deviennent de plus en plus riches en phospholipides et finissent par fusionner pour former des liposomes monocouches. La taille des liposomes dépend de la concentration en phospholipides, des produits chimiques et détergents utilisés [69].

#### **IV.7.3. Méthodes utilisant des liposomes préformés**

Partant d'une suspension de liposomes de type SUV ou MLV, ce procédé consiste à des cycles de congélation dans l'azote liquide suivi d'une décongélation dans l'eau chaude. Les LUV sont générés en fusionnant les SUV de départ ou en divisant les MLV.

La taille des liposomes obtenus est inférieure à 200 nm, L'augmentation du nombre de cycles réduit la taille et la stratification des MLV et améliore la teneur en eau et l'efficacité d'encapsulation des molécules hydrophiles [69].

#### **IV.7.4. Méthodes basées sur l'élimination du solvant organique**

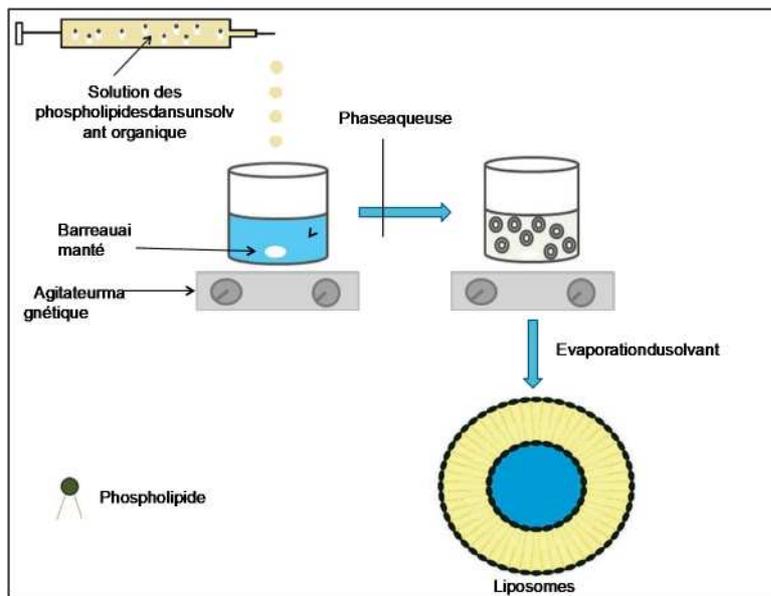
##### **IV.7.4.1. Evaporation en phase inverse**

Cette procédure produit des liposomes monocouches avec de grandes LUV à cavité aqueuse, également connus sous le nom de REV de "vésicules d'évaporation en phase

inverse". Elle consiste à dissoudre des phospholipides dans un solvant organique ou un mélange de solvant auquel une phase aqueuse contenant des molécules hydrophiles à encapsuler est ajoutée [70].

#### IV.7.4.2. Injection de solvant organique

Dans la méthode d'injection de solvant organique, les phospholipides sont dissous dans le solvant (Figure IV.3). La phase organique résultante est ensuite injectée dans la solution aqueuse à l'aide d'une seringue ensuite elle est agitée magnétiquement à une température supérieure à la  $T_m$  du phospholipide. Dès que la phase organique entre en contact avec la phase aqueuse, les molécules lipidiques précipitent et forment des fragments de la double couche plane. Un "fragment planaire à double couche" qui forme lui-même des liposomes. A la fin une partie du solvant et de l'eau est éliminée sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif [71].



**Figure IV.3.** Préparation des liposomes par injection de solvant organique.

### IV.8. Production des liposomes à grande échelle

Le contrôle de la taille, de la polydispersité et de la variabilité des couches des liposomes est un défi pour la plupart des procédés de préparation des liposomes. Ce problème est exacerbé lors du passage à l'échelle industrielle. Pour l'administration de médicaments et les applications cosmétiques, la taille de liposome souhaitée doit être

de 50 à 200 nm .Par conséquent, la réduction de la taille et de la lamellarité nécessite une homogénéisation, un traitement mécanique (sonication, extrusion) ou des cycles de congélation-décongélation. Par conséquent, ces étapes supplémentaires rendent la production à grande échelle plus difficile. Les liposomes produits à des fins commerciales doivent être économiques et reproductibles. De plus, ils doivent avoir une distribution de taille uniforme [72].

### **IV.9. Stabilité des liposomes**

La stabilité physique est associée au maintien de la taille des liposomes, et la stabilité chimique est associée au maintien de la structure des composants et de la composition moléculaire [66].

#### **IV.9.1. Agrégation des liposomes**

Des phénomènes de fusion ou de coalescence se produisent dans les suspensions de liposomes et peuvent provoquer des agrégats. Par conséquent, l'incorporation de lipides chargés négativement ou positivement dans la bicouche lipidique réduit le phénomène d'agrégation dû à l'augmentation de la force électrostatique répulsive entre les liposomes. De plus, l'inclusion de cholestérol dans les liposomes améliore la stabilité des liposomes. Le greffage d'un polymère tel que le polyéthylène glycol (PEG) sur la surface du liposome stabilise le liposome [73].

#### **IV.9.2. Dégradation chimique des liposomes**

Les phospholipides peuvent subir deux types de dégradation chimique, l'hydrolyse de la fonction ester et la peroxydation des chaînes d'acides gras insaturés. Cela altère l'intégrité de la bicouche phospholipidique et peut conduire à la libération du médicament encapsulé [74].

#### **IV.9.3. Lyophilisation des liposomes**

La lyophilisation des liposomes a été proposée pour résoudre les problèmes d'instabilité chimique et physique rencontrés dans les milieux aqueux et pour les conserver pendant de longues périodes. Trois étapes majeures sont réalisées lors de la lyophilisation [75] :

- Congélation : convertit l'eau libre en cristaux de glace. Cette étape permet de séparer la crème glacée, souvent très pure, de la phase résiduelle, dite matrice. Cette matrice contient du matériel lyophilisé, ce qui lui confère une structure rigide.
- Séchage primaire : Elimine l'eau par sublimation progressive de la glace. Le produit est exposé à un vide poussé, où la glace se sublime et passe directement d'un état solide à un état gazeux.
- Séchage secondaire ou « désorption » : Il élimine l'eau non gelée retenue dans le produit par adsorption.

#### **IV.10. Conclusion**

Les liposomes font l'objet de très nombreuses études. Ils sont passés de simple membrane de phospholipides à des liposomes pilotables ou autopilotés conçus pour libérer spécifiquement leurs contenus dans une cible, qui est représentée par un organe ou un tissu particulier.

**TRAVAUX**

**Antérieurs**

Année	Nom de l'article	Auteurs	résultats trouvés
1999	Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle ( Tucuman, Argentina) propolis.	Nieva M I et al, 1999.	Les analyses bioautographiques des profils TLC ont montré que plusieurs composés séparés de la propolis d'Amaicha del Valle ont une activité antibactérienne. La différence de composition entre la propolis Amaicha del Valle et Cerrillos coïncide avec une formation phytogéographique différente.
2000	Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity	Sforcin J M et al, 2000	Il a été vérifié que la croissance des bactéries Gram-positives est inhibée par de faibles concentrations de propolis (0,4%) alors que les bactéries Gram-négatives étaient moins sensibles à cette substance, la concentration minimale inhibitrice allant de 4,5 à 8,0%.
2002	Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria.	Santos F A et al, 2002	L'extrait aqueux-éthanolique de propolis et les fractions obtenues ont été testés pour l'activité inhibitrice contre les bactéries responsables de la parodontite. Toutes les espèces bactériennes testées étaient sensibles à l'extrait de propolis.
2008	Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats	Monika Bhadauria et al, 2008	Le traitement à la propolis a également inversé les altérations sévères induites par le CCl4 dans l'histoarchitecture du foie et des reins d'une manière dose dépendante. L'activité hépatoprotectrice de la propolis à des doses de 200 et 400 mg/kg a été statistiquement comparée à la silymarine et a trouvé que la propolis a montré une meilleure efficacité que la silymarine dans certains paramètres, concluant son potentiel hépatoprotecteur.
2009	Reversal of acetaminophen induced subchronic hepatorenal injury by propolis extract in rats	Monika Bhadauria et Satendra Kumar Nirala, 2009	L'extrait de propolis a montré des effets curatifs en inversant les altérations induites par l'APAP dans les variables biochimiques du sang, les enzymes CYP et les marqueurs du stress oxydatif. L'analyse histopathologique du foie et des reins était cohérente avec les findings biochimiques et nous a conduit à conclure au potentiel curatif de la propolis contre les lésions hépatorénales induites par l'APAP.
2009	Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats	Mokhtar I. Yousef et Afrah F. Salama, 2009	La propolis seule a diminué les spermatozoïdes morts et anormaux et les TBARS, et a augmenté la testostérone, le GSH, la 17-cétostéroïde réductase, le CAT et le GST. Les résultats ont montré que la propolis a antagonisé les effets nocifs de l'AlCl3. Ceci a été prouvé histopathologiquement par la grande amélioration des testicules. En conclusion, la propolis pourrait être efficace dans la protection contre la toxicité reproductive d'AlCl3.

2010	Protective role of propolis against reproductive toxicity of triphenyltin in male rabbits	Mokhtar I. Yousef et al, 2010	La propolis seule a augmenté de manière significative les niveaux de testostérone, le BW, le RTW, le REW, les caractéristiques du sperme et les enzymes du plasma séminal, et a diminué les niveaux de radicaux libres et de lactate déshydrogénase. De plus, la présence de propolis avec le TPTCl atténue ses effets toxiques. De la présente étude, il peut être conclu que la propolis peut être efficace dans la protection de la toxicité reproductive induite par le TPTCl.
2012	Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress.	Cristina Capucho et al, 2012	Etant donné que l'épididyme est connu pour jouer un rôle important en fournissant le microenvironnement pour la maturation et le stockage des spermatozoïdes, cette étude a été entreprise pour évaluer les altérations morphométrique, stérollogiques et fonctionnelles de l'épididyme après un traitement chronique avec de faibles doses de propolis verte brésilienne, qui est connue pour ses propriétés antioxydantes.
2013	Effect of vitamine E or propolis supplementation on semen quality, oxidative status and hemato-biochemical changes of rabbit bucks during hot season	N.M. Hashem et al, 2013	l'inclusion de vitamine E ou de propolis dans le régime alimentaire des lapins mâles pendant la saison chaude pourrait être utilisée efficacement pour atténuer les impacts négatifs de la température élevée sur la qualité du sperme, le statut oxydatif et les caractéristiques hémato-biochimiques.
2015	Aspidosperma subincanun II. Usefulness of uleine and ribonucleic fragments in the treatment of AIDS patients	Dominique Maes et Roland Maes, 2015	Tous les aliments, administrés seuls ou en combinaison, se sont avérés utiles pour tous les patients atteints du SIDA qui ont reçu les suppléments, qu'ils soient sous tri-thérapie (Triomine : stavudine, lamivudine, névirapine) ou laissés sans surveillance.
2016	Bio- monitoring of cadmium, lead, arsenic of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leave	Golnar Matin et al, 2016	Les résultats ont montré les niveaux élevés de contamination par les métaux lourds, en particulier dans les échantillons de propolis. Le mercure n'a pas été détecté dans tous les échantillons analysés.
2017	Brazilian green propolis extracts obtained by conventional processes and by processes at high pressure with supercritical carbon	Yaneth M. Monroya et al, 2017	Les extraits de propolis verte ont été obtenus par un procédé conventionnel à pression atmosphérique et à haute pression. en utilisant le dioxyde de carbone supercritique (scCO <sub>2</sub> ) comme solvant et l'éthanol et l'eau et ses mélanges comme solvants ou comme co-solvants du CO <sub>2</sub> .

	dioxide, ethanol and water		
2018	Composition and functional properties of propolis ( bee glue) : A review.	Syed Ishtiaq Anjum et al, 2018	Plus de 300 composés ont été identifiés dans la propolis tels que les composés phénoliques, les acides aromatiques, huiles essentielles, cires et acides aminés.
2019	Hydroalcoholic extract of Brazilian green propolis modulates inflammatory process in mice submitted to a low protein diet	Marina Barcelos de Miranda et al, 2019	Nos principaux résultats montrent que les animaux nourris avec un régime protéiné standard et traités avec de la propolis avaient de faibles niveaux de protéines. traités avec de la propolis avaient de faibles niveaux de globules rouges, d'hémoglobine et d'hématocrite, avec le rétablissement ultérieur de ces niveaux.
2021	Brazilian Red Propolis shows antifungal and immunomodulatory activities against <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Lauana Aparecida Santos et al, 2021	Les expériences in vitro ont montré une remarquable activité antifongique directe de la BRP, principalement avec la plus forte concentration employée (500 mg/mL). concentration employée (500 mg/mL), réduisant le nombre de cellules viables à 10 % de l'inoculum original après 72 heures d'incubation.

**CHAPITRE V**  
**MATERIELS ET**  
**METHODES**

## V.1. Optimisation d'un procédé d'encapsulation de la propolis par les cyclodextrines (PM- $\beta$ CD) et les liposomes

### V.1.1. Introduction

Dans ce chapitre nous allons résumer toutes les étapes suivies pour optimiser les conditions de préparation du complexe PM- $\beta$ CD-propolis, liposome-propolis, qui seront par la suite caractérisés et utilisés comme agents de conservation.

### V.1.2. Préparation de complexe propolis-PM- $\beta$ CD avec les conditions optimales

#### V.1.2.1. Plans d'expériences

Dans toutes les expériences réalisées, nous avons utilisé l'extrait de propolis obtenue par agitation et récolté dans la région de Melbou.

Afin d'obtenir un procédé d'encapsulation avec les conditions optimales d'une manière scientifique, nous avons choisis l'utilisation d'un plan d'expérience D-optimal (logiciel MODDE 6.0) qui permet de modéliser et optimiser. Il est à noter que lors de la fabrication des complexes propolis- PM- $\beta$ CD, nous avons opté à varier les facteurs suivants : le ratio (PM- $\beta$ CD /propolis) [1:5-5:1 m/m], le volume du solvant [40-100 ml], et la température [40-60 °C], de la même manière nous avons choisit comme réponse à étudier la quantité des flavonoïdes totaux par dosage colorimétrique. Nous avons obtenu la matrice d'expérience suivante (tableau V.1) :

**Tableau V.1.** La matrice d'essais

	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	cd:propolis	température	solvant	dosage flavonoides
1	1	N1	13	Incl	5	40	70	
2	2	N2	2	Incl	0,2	40	70	
3	3	N3	10	Incl	5	60	70	
4	4	N4	3	Incl	0,2	60	70	
5	5	N5	1	Incl	5	50	40	
6	6	N6	12	Incl	0,2	50	40	
7	7	N7	8	Incl	5	50	100	
8	8	N8	4	Incl	0,2	50	100	
9	9	N9	5	Incl	2,6	40	40	
10	10	N10	7	Incl	2,6	60	40	
11	11	N11	9	Incl	2,6	40	100	
12	12	N12	6	Incl	2,6	60	100	
13	13	N13	15	Incl	2,6	50	70	
14	14	N14	14	Incl	2,6	50	70	
15	15	N15	11	Incl	2,6	50	70	

Ainsi, la matrice d'expérience nous propose 15 essais à préparer et à tester.

**V.1.2.2. Matériels**

- Ballon fond rond de 100 ml;
- Spatule;
- Béchers;
- Eprouvette de 100 ml;
- Boîte stérile (plastique);
- Barreaux magnétiques.

**V.1.2.3. Appareillages**

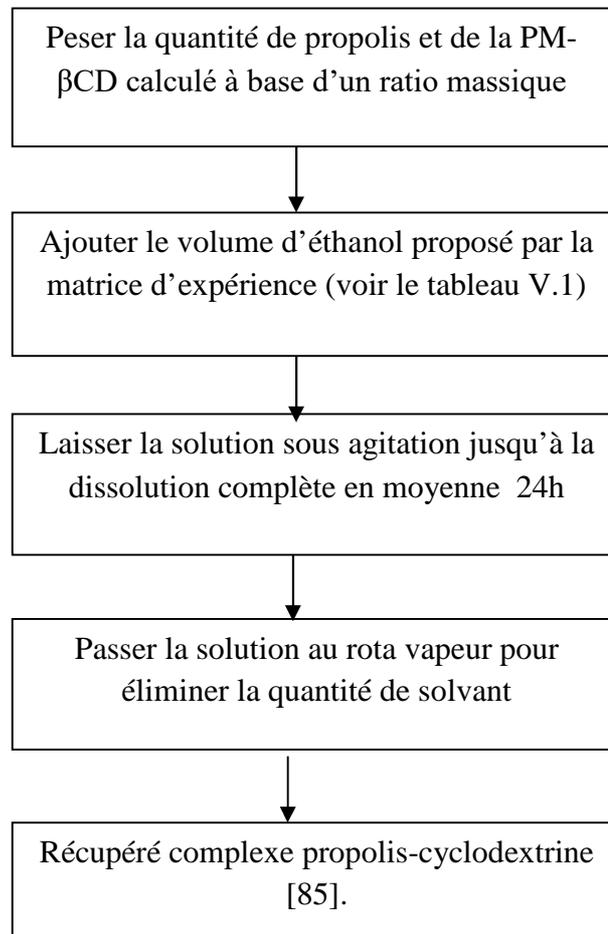
- Balance analytique (Denver);
- Rota vapeur (Buchi);
- Plaque agitatrice (Velp Scientifica).

**V.1.2.4. Produits chimiques**

- Extrait sec de propolis;
- La PM- $\beta$ CD (fournie généreusement par le laboratoire pharmacie galénique de l'université de Rouen);
- L'éthanol (Biochem Chemopharma).

### V.1.2.5. Méthode

Les complexes d'inclusions propolis PM- $\beta$ CD ont été préparés par la méthode d'évaporation du solvant, les étapes sont résumées ci-dessous :



**Figure V.1.** Préparation de complexe propolis PM- $\beta$ CD



**Figure V.2.** Présentation d'un rota vapeur

### V.1.3. Préparation des suspensions propolis-liposome

Pour la réalisation du plan d'expérience nous avons utilisé le logiciel MODDE 6.0, afin de construire une matrice d'expérience. Il est à noter que lors de la fabrication des suspensions propolis-liposome nous avons varié comme facteur les quantités des phospholipides [10-20 mg/ml], le cholestérol [1.5-5 mg/ml] et de la propolis [50-200 mg/ml], et nous fixé la taille comme réponse du modèle, ainsi que la matrice obtenue est représenté dans le tableau V.2. Le protocole est déjà optimisé par FATMI et al [76].

**Tableau V.2.** Matrice d'expérience

	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	propolis	phospholipides	cholesterol	taille
1	1	N1	14	Incl	50	10	3,25	
2	2	N2	5	Incl	200	10	3,25	
3	3	N3	3	Incl	50	20	3,25	
4	4	N4	7	Incl	200	20	3,25	
5	5	N5	4	Incl	50	15	1,5	
6	6	N6	6	Incl	200	15	1,5	
7	7	N7	10	Incl	50	15	5	
8	8	N8	8	Incl	200	15	5	
9	9	N9	12	Incl	125	10	1,5	
10	10	N10	15	Incl	125	20	1,5	
11	11	N11	13	Incl	125	10	5	
12	12	N12	1	Incl	125	20	5	
13	13	N13	9	Incl	125	15	3,25	
14	14	N14	2	Incl	125	15	3,25	
15	15	N15	11	Incl	125	15	3,25	

Ainsi, la matrice d'expérience nous propose 15 essais à préparer.

#### V.1.3.1. Matériels

- Bêchers;
- Entonnoir;
- Ballon de 100 ml;
- Spatule;
- Eprouvette (25ml, 50ml);
- Seringue;
- Barreaux magnétiques;
- Thermomètre;
- Flacon de 50 ml (plastique).

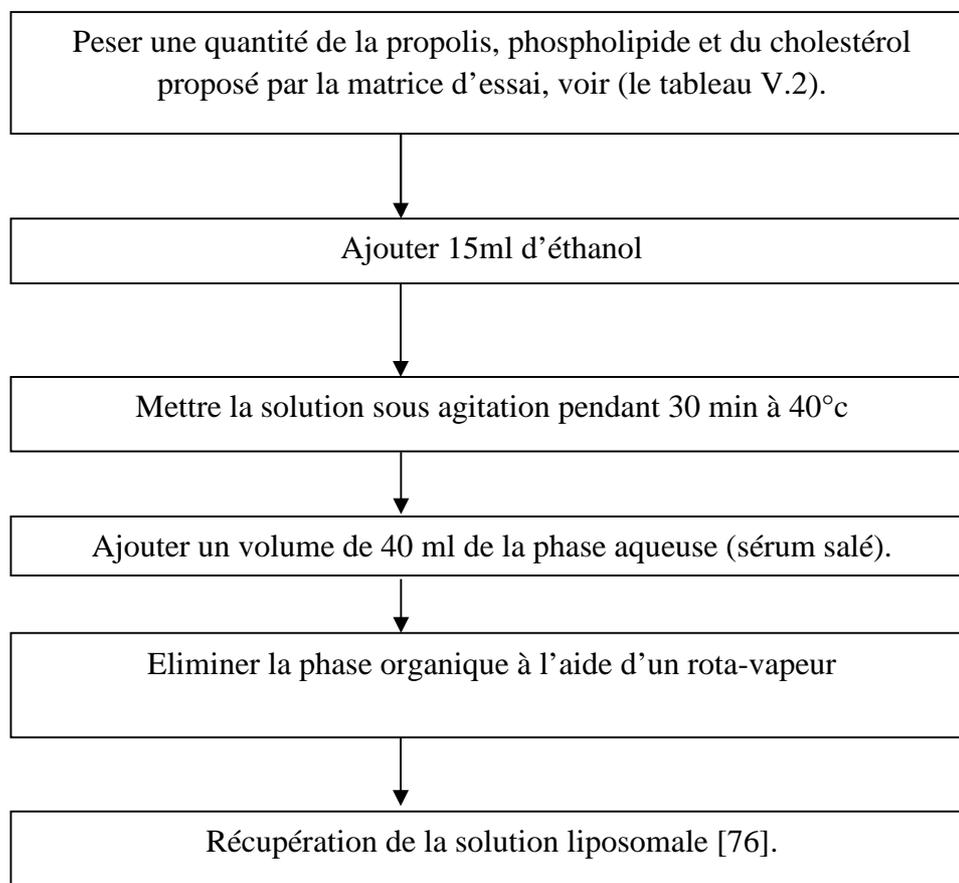
#### V.1.3.2. Appareillages

- Balance analytique (Denver);
- Plaque chauffante (Velp Scientifica);
- Plaque agitatrice (Velp Scientifica);
- Rota vapeur (Buchi).

#### V.1.3.3. Produits chimiques

- Extrait sec de propolis;
- Phospholipide (RHONE POULENC (Phospholipon 90H lot: 90060));
- Cholestérol (Roquette Frères);
- Ethanol (Biochem Chemopharma);
- Sérum salé.

#### V.1.3.4. Méthode



## V.2. Détermination des réponses du plan d'expérience

### V.2.1. Dosage des flavonoïdes des complexes d'inclusions (propolis-PM-βCD) par l'UV-visible

#### V.2.1.1. Principe spectrophotomètre UV-visible

Le spectrophotométrie UV-visible est une technique analytique qui permet de mesurer l'absorbance d'une solution à de différentes longueurs d'ondes afin de déterminer la quantité de principe actif existant [77].

### V.2.1.2. Matériels

- Spatule;
- Tubes à essais;
- Pipette de 1 ml, 2 ml, 5ml et 10 ml;
- Barreaux magnétiques;
- Becher;
- Fiole de 25 ml;
- Eprouvette;
- Poire;
- Porte tube.

### V.2.1.3. Appareillages

- Spectrophotomètre UV-visible (Evolution 201);
- Balance analytique de précision (Denver);
- Plaque agitatrice (Velp Scientifica).

### V.2.1.4. Produits chimiques

- Quercétine (Sigma-Aldrich);
- Méthanol (Biochem Chemopharma);
- Nitrite de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Biochem Chemopharma);
- Hydroxyde de sodium (NaOH) (Biochem Chemopharma);
- Chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) (Sigma-Aldrich).

### V.2.1.5. Méthode

Cette méthode est basée sur l'utilisation d' $\text{AlCl}_3$  qui va former un complexe avec les falavonols et flavones qui sont de couleur jaune.

Mélanger 400  $\mu\text{l}$  d'extrait avec 120  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaNO}_2$  après 5 min 120  $\mu\text{l}$  d'une solution de  $\text{AlCl}_3$  ont été ajouté, puis agité, laissé 6 min, et un volume de 800  $\mu\text{l}$  de NaOH ont été ajouté, l'absorbance est lu à 510 nm, le témoin a été préparé dans les mêmes conditions, une courbe d'étalonnage de quercétine a été préparé à différentes concentrations 1 mg/ml [78].



**Figure V.3.** Présentation d'un spectrophotomètre UV-visible

### **V.2.2. Détermination de la taille des solutions liposomales**

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

#### **V.2.2.1. Appareillage**

- Granulomètre laser (Fritsch).

#### **V.2.2.2. Produits chimiques**

- Les solutions liposomales de la matrice d'essai;
- Eau distillé.



**Figure V.4.** Représentation d'un granulomètre laser

### V.3. Préparation de l'optimum de complexe propolis-PM- $\beta$ CD

Après avoir réalisé les 15 expériences de la matrice, le MODE 6.0 nous donne l'optimum.



**Figure V.5.** L'optimum du complexe d'inclusion

Après avoir préparé les deux optimums, nous sommes passé à leur caractérisation par des différentes techniques :

#### V.3.1. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une technique d'analyse qui permet d'étudier les différentes phases de matières et matériaux cristallins. Cette méthode prouve l'inclusion mais aussi d'obtenir des informations sur la structure formé, nécessitant des faibles quantités de composé [79].



**Figure V.6.** Présentation d'un diffractomètre de Rayon X

Les diagrammes de diffraction des rayons X des échantillons (extrait de propolis, complexe propolis-PM- $\beta$ -CD, et le mélange physique) ont été obtenus à l'aide d'un diffractomètre EMPYREAN, avec un angle de  $0^\circ$  à  $100^\circ$  et un pas de  $2\theta$ .

#### V.4. Préparation de l'optimum

Après avoir réalisé les 15 expériences de la matrice, le MODE 6.0 nous donne l'optimum.



Figure V.7. L'optimum propolis-liposome

#### V.4.1. Détermination du taux d'encapsulation

##### V.4.1.1. Principe chromatographie en phase liquide (HPLC)

La chromatographie en phase liquide permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et leur quantification [80].

##### V.4.1.2. La centrifugation de la solution liposomale optimale

##### V.4.1.3. Matériels

- Eppendorfs;
- Vials;
- Filtre seringues de  $0.45\mu\text{m}$ ;
- Seringue.

#### V.4.1.4. Appareillages

- Chromatographie en phase liquide (HPLC) (Ultimate 3000);
- Centrifugeuse (Hettich);

#### V.4.1.5. Produits chimiques

- Solution optimale liposomale;
- Méthanol (Biochem Chemopharma).

#### V.4.1.6. Méthodes

Le procédé de la centrifugeuse de la solution optimale a été lancé, tout en fixant les paramètres suivants :

- Une agitation de 1500 tout /min.
- Une température de 4°C.
- Un temps de 60 min.

Après l'ultracentrifugation on a obtenu une phase aqueuse transparente et un culot, Le surnageant a été séparé et on la remplacé par le méthanol, ensuite la filtration a été effectuée avec des filtres seringues de 0,45 µm, et enfin analysé par HPLC afin d'effectue le dosage selon les conditions suivantes [81]:

**Colonne :** C-18 (150 x 4.6 mm, 5 µm);

**Phase mobile:** 0.5% v/v acetic acid in water (solvent A), and acetonitrile (solvent B);

**Débit :** 1 ml/min;

**Longueur d'onde :** 290 nm;

**Volume d'injection :** 20 µl;

**Mode:** Gradient;

**Température:** 40°C.



**Figure V.8.** Présentation de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)



**Figure V.9.** Présentation de la centrifugeuse

### V.4.1.2. Analyse par spectroscopie infrarouge IR

#### V.4.1.2.1. Principe

Spectroscopie infrarouge est une méthode d'analyse qui permet de déterminer la présence de groupements fonctionnels dans les molécules organique, et les structures dans certaines molécules simple [82].

#### V.4.1.2.2. Appareillages

- Spectroscopie infrarouge IR (Schimadzu, IRAffinity-1).

#### V.4.1.2.3. Produits chimiques

- L'extrait de propolis;
- Liposome blanc (sans propolis);
- Optimum propolis-liposome;
- Complexe propolis-PM- $\beta$ CD;
- PM $\beta$ CD;
- Mélange physique;
- KBr (bromure de potassium).

#### V.4.1.2.4. Méthode

Nos échantillons solides sont broyés avec KBr (80% KBr), pressé sous forme de pastille, et placé entre deux fenêtres de KBr, tandis que les liquides sont mesurés directement, un balayage a été effectué de 4000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### V.5. Analyse par spectroscopie UV-visible

Tous les échantillons (l'extrait de propolis, liposome blanc (sans propolis), optimum propolis-liposome, complexe propolis-PM- $\beta$ CD, PM- $\beta$ CD, et le Mélange physique) sont dilués dans l'éthanol et l'eau distillée, puis analysés par un spectrophotomètre UV-visible (Evolution 201), les échantillons ont subit un balayage de 200 nm jusqu'à 700 nm.

## **V.6. Test de motilité des spermatozoïdes (déterminations de VSL) après réfrigération**

### **V.6.1. Réfrigération du sperme**

#### **Matériels**

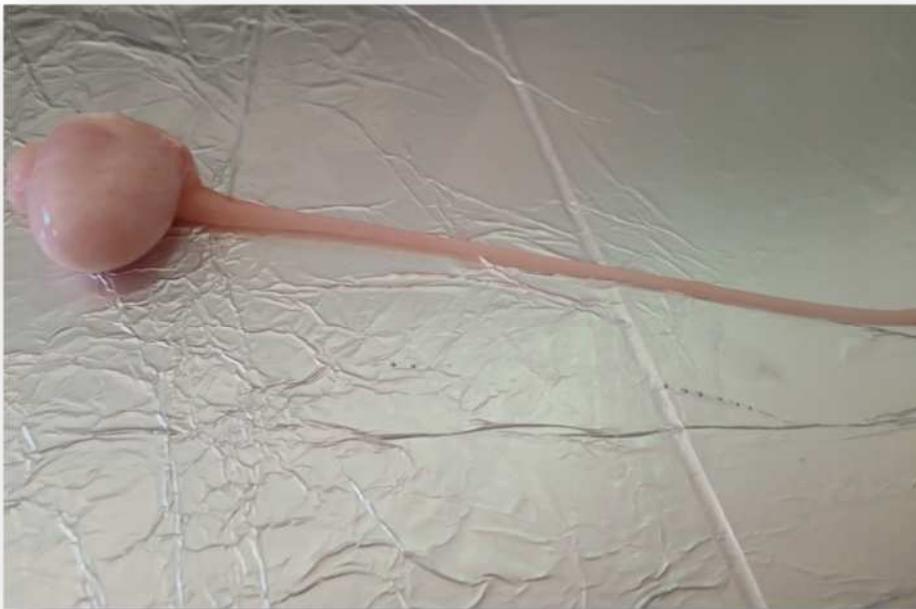
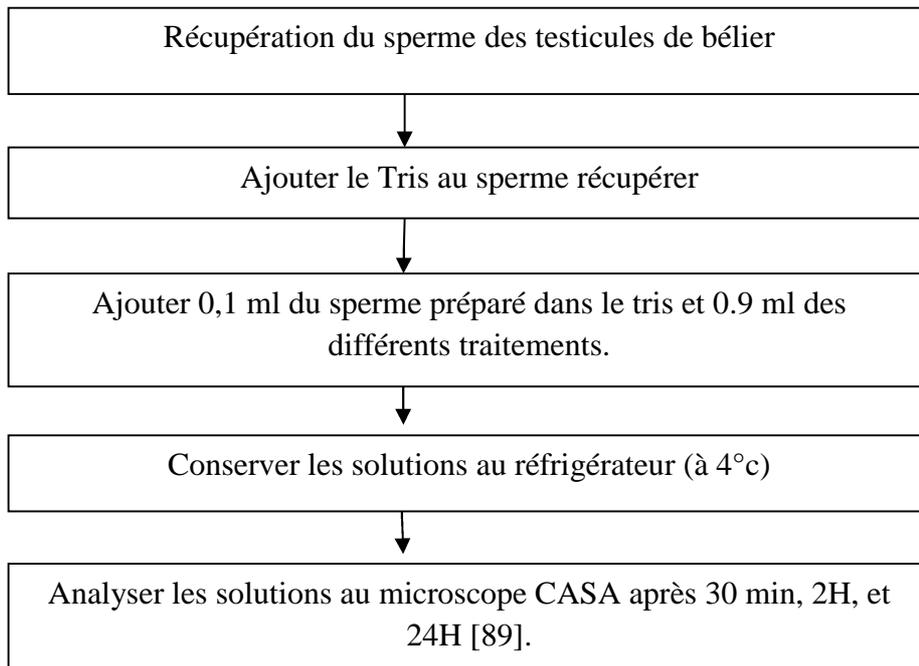
- Micro pipette;
- Embouts (jaunes et bleus);
- Seringue;
- Eppendorfs;
- Béchers.

#### **Appareillages**

- Réfrigérateurs biologiques;
- Microscope CASA (MiK oneclipse E200).

#### **Produits chimiques**

- Sperme;
- Testicules (bélier).
- Tris;
- L'extrait de propolis;
- Liposome blanc;
- Solution liposomale optimale;
- Complexe propolis-PM- $\beta$ CD;
- Contrôle (Tris /sperme).

**Méthode**

**Figure V.10.** Epididyme d'un bélier

**CHAPITRE VI**  
**RESULTATS ET**  
**DISCUSSIONS**

## VI.1. Détermination des réponses du plan expérimental

### VI.1.1. Dosage des flavonoïdes totaux des complexes propolis-PM- $\beta$ CD

Après avoir préparé les complexes propolis-PM- $\beta$ CD à différents ratios proposé par le plan d'expérience, on a pu déterminer le dosage de flavonoïdes totaux comme réponse (voir le tableau VI.1).

**Tableau VI.1.** Résultats expérimentaux de la matrice

	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	cd:propolis	température	solvant	dosage flavonoïdes
1	1	N1	13	Incl	5	40	70	0,058
2	2	N2	2	Incl	0,2	40	70	0,029
3	3	N3	10	Incl	5	60	70	0,05
4	4	N4	3	Incl	0,2	60	70	0,032
5	5	N5	1	Incl	5	50	40	0,052
6	6	N6	12	Incl	0,2	50	40	0,026
7	7	N7	8	Incl	5	50	100	0,046
8	8	N8	4	Incl	0,2	50	100	0,025
9	9	N9	5	Incl	2,6	40	40	0,035
10	10	N10	7	Incl	2,6	60	40	0,0299
11	11	N11	9	Incl	2,6	40	100	0,031
12	12	N12	6	Incl	2,6	60	100	0,0256
13	13	N13	15	Incl	2,6	50	70	0,012
14	14	N14	14	Incl	2,6	50	70	0,01
15	15	N15	11	Incl	2,6	50	70	0,015

#### VI.1.1.1. Résultats

D'après les résultats obtenues, on remarque que le dosage des flavonoïdes varie avec la quantité des ratios, la température et la quantité de solvant, la quantité des flavonoïdes totaux augmente avec l'augmentation des ratios [propolis/PM- $\beta$ CD], la valeur maximale est de 0.058 mg/ml, et elle diminue avec l'augmentation de la quantité du solvant et de la température.

#### VI.1.1.2. Observation et interprétation

Comme le montre la matrice de plan d'expérience, la valeur maximale de la quantité des flavonoïdes totaux est obtenue en utilisant une quantité maximale de la PM- $\beta$ CD, avec une petite quantité du solvant et de la température, cela peut être expliqué par la grande solubilité de PM- $\beta$ CD, c'est la plus accrue.

### VI.1.1.3. Modèle mathématique

La modélisation par le plan d'expérience D-optimal, 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 linéaire polynomiaux;
- $a_{11}, a_{22}, a_{33}$  : effets quadratiques;
- $a_{12}, a_{13}, a_{23}$  : effets d'interactions.

$$\begin{aligned} \text{Réponse} = & \text{cst} + a_1\text{CD:pro} + a_2\text{tem} + a_3\text{sol} + a_{11}\text{CD:pro}^2 + a_{22}\text{tem}^2 + a_{33}\text{sol}^2 + a_{12}\text{CD :pro*tem} \\ & + a_{13}\text{CD :pro*sol} + a_{23}\text{tem*sol}. \end{aligned}$$

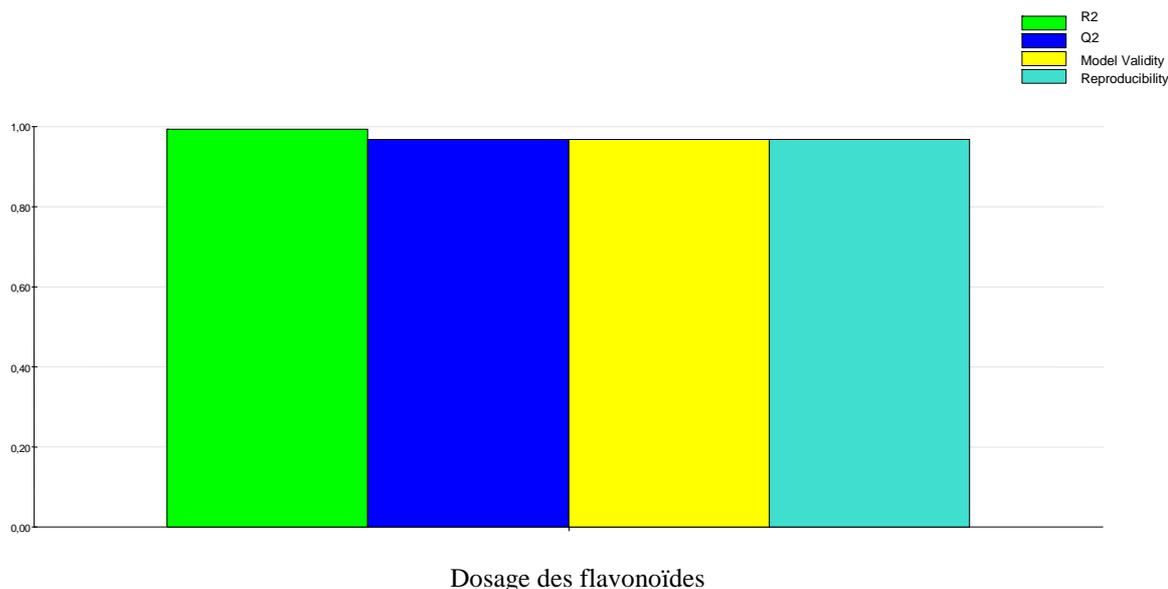
$$\begin{aligned} \text{Le dosage des flavonoïdes} = & 0.0123333 + 0.01175\text{CD: pro} - 0.0019375\text{tem} - \\ & 0.0019125\text{sol} + 0.0183958\text{CD:pro}^2 + 0.0115208\text{tem}^2 + 0.00652084\text{sol}^2 - 0.00275\text{CD:pro*tem} - \\ & 0.00125\text{CD: pro*sol} - 7.50012 \times 10^{-5}\text{tem*sol}. \end{aligned}$$

Ce modèle permet l'obtention d'un optimum qui sera étudié ultérieurement.

### VI.1.1.4. Analyse statistique

Les paramètres statistiques représentés dans la figure (VI.1) sont  $R^2$  et  $Q^2$  qui traduisent respectivement, l'explication et la prédiction du modèle associé aux résultats obtenus.

Lorsque ces paramètres tendent vers 1, le modèle associé explique la variation et prédit la réponse, donc on peut dire que le modèle est validé. Par contre lorsqu'ils tendent vers 0, le modèle ne peut pas être utilisé ni pour expliquer la variation ni la prédiction des réponses, et par conséquent le modèle n'est pas valide.



**Figure VI.1.** Facteurs statistiques du plan d’expérience étudié

Les valeurs numériques des facteurs statistiques les plus pertinents sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau VI.2.** Présentation des valeurs de l’analyse statistiques

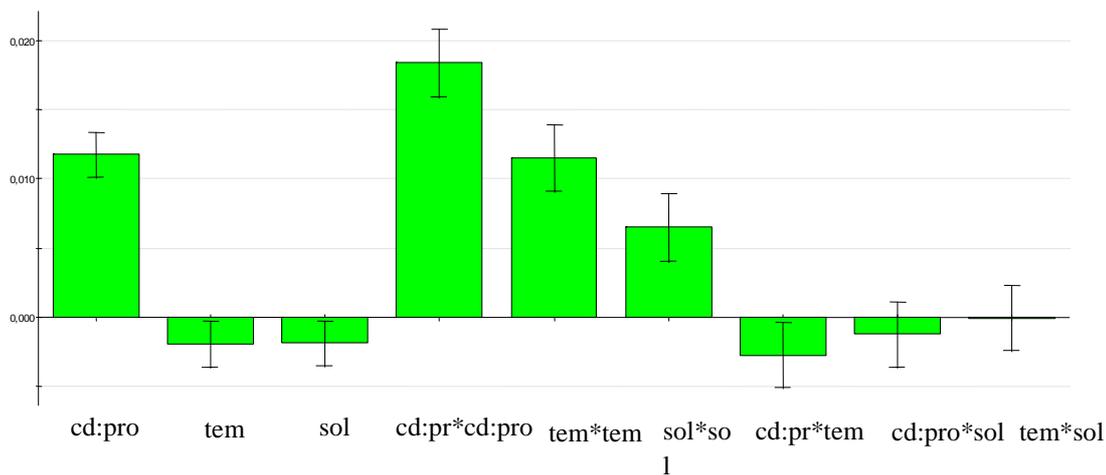
	R2	R2 Adj	Q2	DF	RSD	P	Model validité	Reproductibilité
Taille de part	0.994	0.984	0.968	5	0.0018	<0.005	0.968	0.968

**VI.1.1.4.1. Explication des données du plan d’expérience**

A partir des résultats expérimentaux (tableau VI.2), la valeur de R2 tend vers 1, donc on peut dire que notre modèle explique les effets des facteurs sur le dosage des flavonoïdes, la valeur de Q2 indique que le modèle obtenue prédit à 96% le dosage des flavonoïdes.

### VI.1.1.5. Etude des effets propres

Les effets propres des facteurs sur le dosage des flavonoïdes sont présentés dans la figure (VI.2).



**Figure VI.2.** Histogramme représente l'influence des facteurs sur des dosages des flavonoïdes

On remarque que les ratios CD-propolis influent positivement sur le dosage des flavonoïdes (barre dirigée vers le haut). Par contre les facteurs (solvant et la température) influence négativement (barre dirigée vers le bas).

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de ratio influence positivement en augmentant le dosage des flavonoïdes, cela est dû à la présence de la PM- $\beta$ CD, qui interagit avec les composés actifs de propolis plus exactement avec la quercétine, qui permet de solubiliser le maximum.

D'autre part, l'augmentation des paramètres (solvant et température) influencent négativement en diminuant le dosage des flavonoïdes, par contre quand l'effet de la température et du solvant est doublé, la quantité des flavonoïdes augmente, cela est peut être expliqué qu'il faut une grande quantité du solvant, qui veut dire une augmentation de la surface de contact entre la PM- $\beta$ CD et les flavonoïdes pour solubiliser la maximum.

### VI.1.1.6. Détermination de l'optimum

L'objectif de notre étude est d'obtenir la quantité des flavonoïdes maximale pour améliorer la solubilité de la propolis.

Nous avons pu déterminer par le logiciel modde 6.0 les conditions optimales suivantes :

PM- $\beta$ CD : propolis	température	Solvant	Dosage des flavonoïdes
5 [5 : 1 g]	40°C	40 ml	0.0683 mg/ml

Les résultats obtenus montrent que pour avoir l'optimum, il est susceptible d'utiliser un ratio de 5 avec un volume de 40 ml d'éthanol et une température de 40°C, qui représente une meilleure solubilité pour la propolis (en termes de quantité des flavonoïdes), après avoir reparamétrer l'optimum le dosage des flavonoïdes totaux est de 0.066 mg/ml, cette valeur est proche de celle théorique.

### VI.1.2. Détermination de la taille des suspensions liposomes

Après avoir préparé les suspensions liposomales avec les conditions proposées par le plan d'expérience, nous avons pu déterminer la taille des liposomes comme réponse (voir le tableau VI.3).

**Tableau VI.3.** Résultats expérimentaux de la matrice

	Exp No	Exp Name	Run Order	Incl/Excl	propolis	phospholipides	cholesterol	taille
1	1	N1	14	Incl	50	10	3,25	5
2	2	N2	5	Incl	200	10	3,25	7
3	3	N3	3	Incl	50	20	3,25	8,3
4	4	N4	7	Incl	200	20	3,25	4,7
5	5	N5	4	Incl	50	15	1,5	4,8
6	6	N6	6	Incl	200	15	1,5	3
7	7	N7	10	Incl	50	15	5	2,6
8	8	N8	8	Incl	200	15	5	2,9
9	9	N9	12	Incl	125	10	1,5	5,6
10	10	N10	15	Incl	125	20	1,5	4
11	11	N11	13	Incl	125	10	5	2,56
12	12	N12	1	Incl	125	20	5	4,9
13	13	N13	9	Incl	125	15	3,25	5,25
14	14	N14	2	Incl	125	15	3,25	5,26
15	15	N15	11	Incl	125	15	3,25	5,2

### VI.1.2.1. Résultats

Les résultats expérimentaux montrent que la taille des liposomes varie avec la quantité de propolis, la quantité des phospholipides et la quantité de cholestérol, on observe que la taille des liposomes augmente avec l'augmentation de la quantité des phospholipides et elle diminue avec la diminution de la quantité de la propolis.

### VI.1.2.2. Observation et interprétation

Les résultats obtenus montrent que la quantité des phospholipides influencent positivement, et la propolis et le cholestérol influencent négativement, cela est peut être du à l'extraction des phospholipides et du cholestérol par la propolis ce qui fait que leur taille augmente.

### VI.1.2.3 Modèle mathématique

La modélisation par le plan d'expérience D-optimal, nous a permis d'obtenir le modèle suivant :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 + a_{33}x_3^2 + a_{12}x_1x_2 + a_{13}x_1x_3 + a_{23}x_2x_3.$$

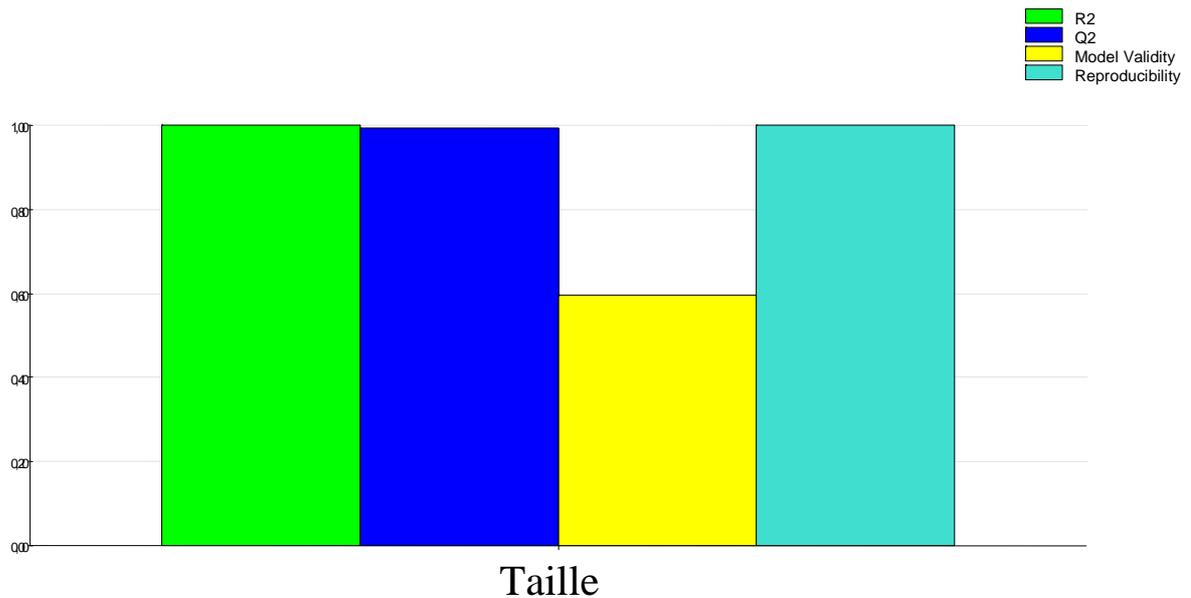
$$\begin{aligned} \text{Réponse} = & \text{CST} + a_1\text{pro} + a_2\text{pho} + a_3\text{cho} + a_{11}\text{pro}^2 + a_{22}\text{pho}^2 + a_{33}\text{cho}^2 + a_{12}\text{pro}*\text{pho} \\ & + a_{13}\text{pro}*\text{cho} + a_{23}\text{pho}*\text{cho}. \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{La taille des liposomes} = & 5.23667 - 0.3875\text{pro} + 0.2175\text{pho} - 0.555\text{cho} - \\ & 0.036666\text{pro}^2 + 0.976666\text{pho}^2 - 1.94833\text{cho}^2 - 1.4\text{pro}*\text{pho} + 0.525\text{pro}*\text{cho} + 0.985\text{pho}*\text{cho}. \end{aligned}$$

### VI.1.2.4. Analyse statistique

Les paramètres statistiques présentés dans la figure (VI.3) sont R2 et Q2 qui traduisent respectivement, l'explication et la prédiction du modèle associé aux résultats obtenus.

Lorsque ces paramètres tendent vers 1, le modèle associé explique la variation et prédit la réponse, donc on peut dire que le modèle est validé. Par contre lorsqu'ils tendent vers 0, le modèle ne peut pas être utilisé ni pour expliquer la variation ni la prédiction des réponses, et par conséquent le modèle n'est pas valide.



**Figure VI.3.** Facteurs statistique du plan d'expérience étudié

Les valeurs numériques des facteurs statistiques les plus pertinents sont résumés dans le tableau suivant :

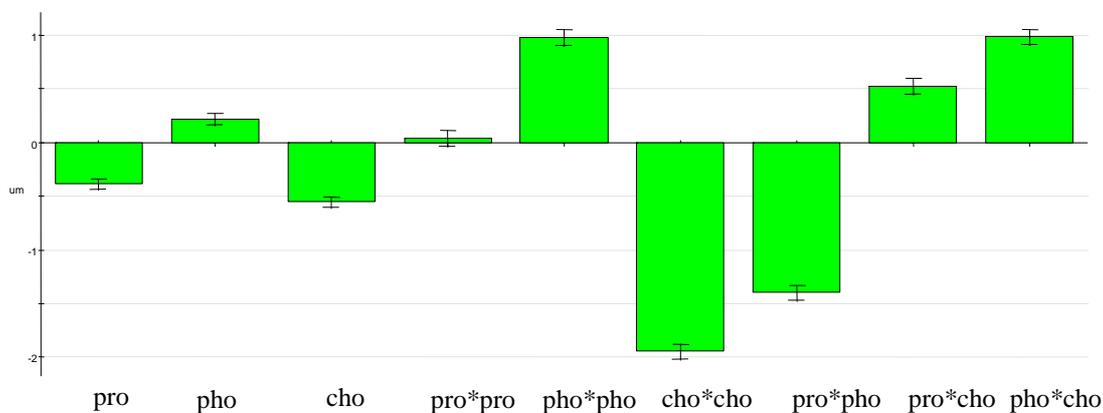
**Tableau VI.3.** Analyse statistique

	R2	R2 Adj	Q2	DF	RSD	P	Model validité	Reproductibilité
Taille de part	0.994	0.984	0.968	5	0.0018	<0.005	0.968	0.968

#### VI.1.2.4.1. Exploitation des données du plan d'expérience

A partir de ces résultats, la valeur de R2 tend vers 1, donc on peut dire que notre modèle explique les effets des facteurs sur la taille des liposomes, la valeur de Q2 indique que le modèle obtenu prédit à 99% la taille.

#### VI.1.2.4.2. Etudes des effets propres



**Figure VI.4.** Histogramme représentant l'influence des facteurs sur la taille des liposomes

On remarque que les facteurs (quantité de propolis et la quantité de cholestérol) influencent négativement sur la taille des liposomes (barre dirigée vers le bas), tandis que la quantité des phospholipides influence positivement (barre dirigée vers le haut).

Les résultats obtenus dans la figure VI.4 montrent que l'augmentation de la quantité des phospholipides influence positivement en augmentant la taille des liposomes, le cholestérol et la propolis ont un effet négatif. Cela est peut être dû à la composition chimique de la propolis qui est constituée de plus de 300 composés, par conséquent les phospholipides ne peuvent pas interagir avec tous les constituants, par contre on remarque que les interactions entre la propolis-cholestérol-phospholipides ont un effet positive ce qui démontre la perméabilité et la fluidité des bicouches lipidiques grâce à la présence du cholestérol.

#### VI.1.2.5. Détermination des conditions optimales

L'objectif de notre étude est d'obtenir la taille des liposomes idéale pour améliorer la solubilité de la propolis.

Nous avons pu déterminer par le logiciel modde 6.0 les conditions optimales de fabrication des liposomes pour un système d'encapsulation.

propolis	Phospholipides	Cholestérol	Taille
199.943 mg/ml	19.986 mg/ml	1.5 mg/ml	1.779 $\mu$ m

Les résultats obtenus montrent que pour avoir l'optimum, il est susceptible d'utiliser 199.943 mg de propolis, 19.986 mg des phospholipides, 1.5 mg de cholestérol afin d'obtenir une taille de 1.779  $\mu$ m, qui représentent une meilleure solubilité pour la propolis, l'optimum a été préparé dans ces conditions, la taille obtenue est de 2.5  $\mu$ m avec un taux d'encapsulation de 92,86 %.

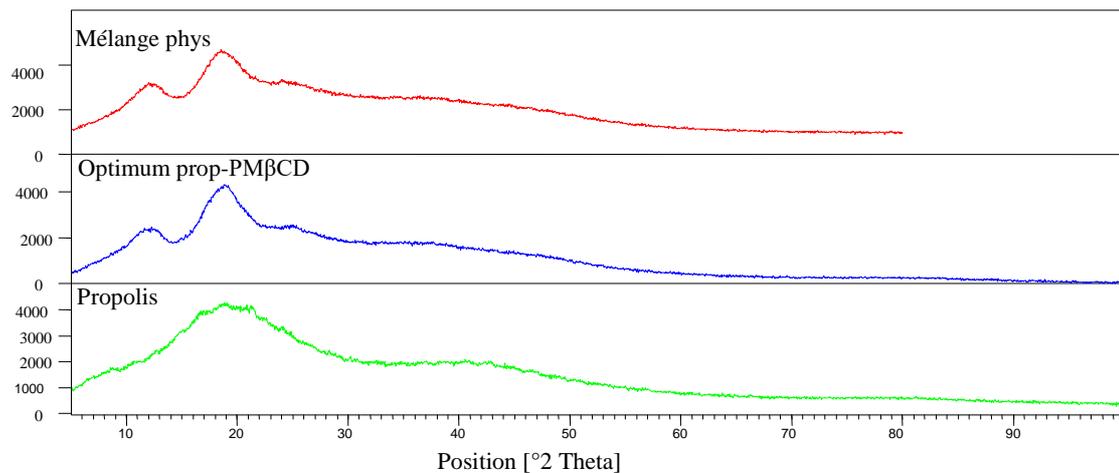
## VI.2. Analyse par la diffraction des rayons X (DRX)

La composition élaborée a été analysée par la technique de diffraction des rayons X (DRX).

Le traitement diffractogramme est réalisé à l'aide du logiciel X'Pert HighScore.

### VI.2.1. Observation

La figure (VI.5) montre le diagramme de diffraction du mélange physique, le complexe propolis-PM- $\beta$ CD et d'extrait sec de propolis. Pour la propolis un large pic de diffraction est observé de  $10^\circ$  à  $30^\circ$ , des résultats similaires ont été trouvés par (Nooshin Shakouri et al, 2021) [83]. Pour le complexe propolis- PM- $\beta$ CD deux pics de diffraction sont observés le premier est entre  $10^\circ$ - $14^\circ$ , le deuxième est de  $15^\circ$ - $22^\circ$ , et pour le mélange physique on observe les mêmes pics que le complexe propolis-PM- $\beta$ CD.



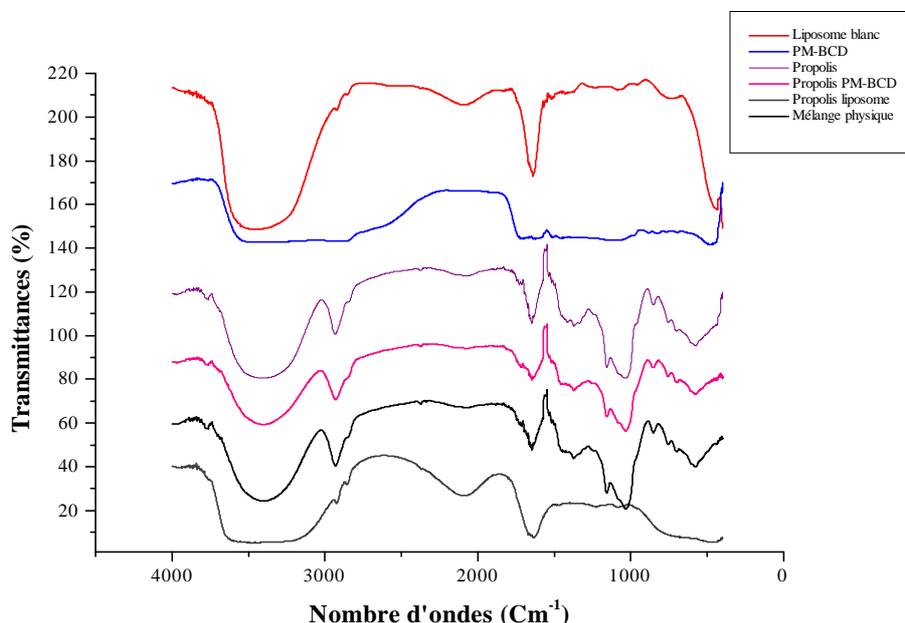
**Figure VI.5.** Analyse de diffraction des rayons X de : l'extrait de propolis, complexe propolis-PM- $\beta$ CD, et le mélange physique

#### VI.1.2.2. Interprétation

D'après les résultats obtenus, la présence de pics caractéristique de la propolis a été observée mais avec une intensité plus ou moins forte, ce qui peut être dû à la propolis libre qui n'est pas encapsulée dans les cyclodextrines. Cependant, dans le reste des échantillons le pic de l'extrait a disparu et ils sont devenus moins intenses après avoir été encapsulés. Cette observation montre que la cristallisation de la propolis a diminué ou s'est transformés en phase amorphe (Nooshin Shakouri et al, 2021), ont trouvé les mêmes résultats [83].

Les pics de mélange physique sont similaire aux pics de complexe propolis-CD avec une intensité diminuée, cela dû à présence des cyclodextrines dans les deux mélanges.

### VI.3. Analyse par spectroscopie infrarouge IR



**Figure VI.6.** Analyse spectrale FTIR de : liposome blanc, PM- $\beta$ CD, extrait de propolis, propolis-liposome, propolis-PM- $\beta$ CD, et mélange physique.

#### VI.3.1. Résultats

Les spectres IR de nos échantillons (propolis, PM $\beta$ CD, liposome blanc, propolis-CD, propolis-liposome et le mélange physique) sont représentés dans la figure (VI.6).

#### VI.3.2. Observation

- Pour le spectre d'extrait de propolis, on observe qu'il y'a un pic à  $3600\text{ cm}^{-1}$  qui correspond à l'étirement de liaison hydrogène O-H (liaison hydrogène, représente une vibration forte de plusieurs bande fine) ce qui est due à la présence des phénols, un pic à  $2900\text{ cm}^{-1}$  attribué à l'étirement de liaison C-H (liaison hydrocarbures, qui représente une vibration de forte intensité), une autre absorption détecté à  $1650$  et à  $1700\text{ cm}^{-1}$  qui correspondent à la vibration du carbonyle C=O qui sont due aux flavonoïdes et aux lipides présents dans l'extrait de propolis (Bruno Alves Rocha et al, 2012) [84].

- Pour le spectre propolis-PM- $\beta$ CD, on observe une large bande localisée autour de 3300-3600  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison O-H, et un pic à 1600  $\text{cm}^{-1}$  en raison de la vibration d'étirement C=O qui est due principalement à la présence des flavonoïdes. L'intensité des bandes caractéristiques représente l'interaction intermoléculaire entre la propolis et les cyclodextrines (Bruno Alves Rocha et al, 2012), ont trouvés des résultats similaires [84].
- Pour le spectre PM- $\beta$ CD, on observe une large bande caractéristique, qui possèdent les pics d'absorption à 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison hydrogène O-H (Ziman Hu et al, 2021), ont trouvés résultats similaire [85].
- Pour le spectre liposome blanc, on observe une large bande caractéristique, qui possèdent les pics d'absorption à 3400-3500  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison O-H, et un pic à 1600  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison C=O (Ramli N A et al, 2021), ont trouvée similaire [86].
- Pour le spectre propolis-liposome, on observe une large bande caractéristique, qui possède les pics d'absorption entre 3600 et 3200  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison hydrogène O-H, un pic à 1700  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison C=O qui est due principalement à la présence des flavonoïdes.
- Pour le mélange physique, on observe une large bande caractéristique de 3500 à 3200  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison hydrogène O-H, un pic à 2900  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison C-H, un autre pic aux alentours de 1600  $\text{cm}^{-1}$  qui correspond à la liaison C=O qui est due principalement à la présence des flavonoïdes et un pic à 1000  $\text{cm}^{-1}$  qui est du à la présence d'une liaison C-O.

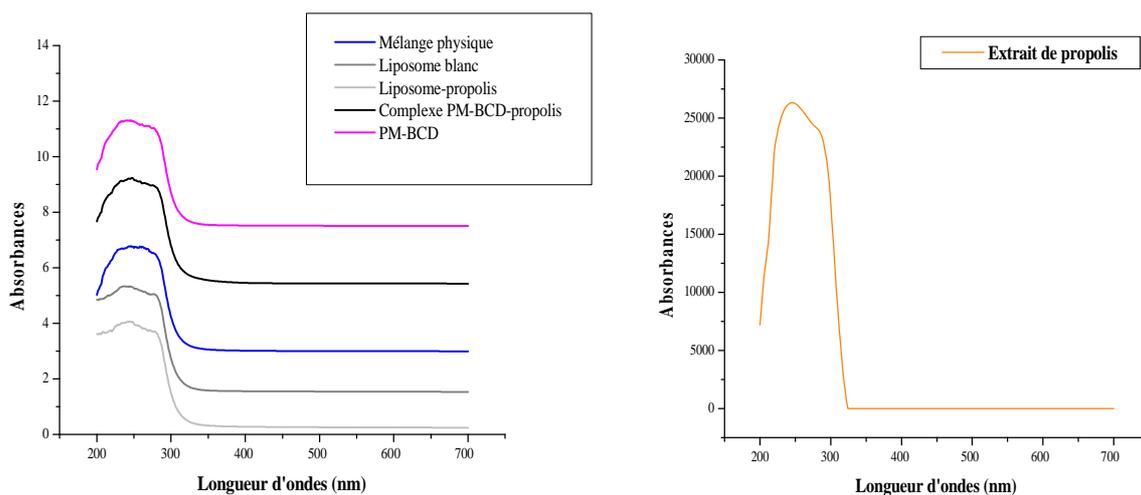
### VI.3.3. Interprétation

L'observation nous a permis de déduire que :

Il existe des bandes caractéristiques de départ disparues aux alentours de 2000-2800  $\text{cm}^{-1}$  surtout dans le cas de l'extrait de propolis, propolis-PM- $\beta$ CD et le mélange physique, et aussi les résultats montrent la diminution de l'intensité de ces bandes et celle des groupements hydroxyles OH, qui est expliqué par leurs interactions avec les cavités internes correspondantes aux groupements hydroxyles de nature hydrophobe des CDs.

L'existence des bandes caractéristique dans le complexe propolis-liposome correspondant aux groupes hydroxyle (O-H), a été attribuée à la présence des flavonoïdes et des composés phénoliques dans l'extrait de propolis.

#### VI.4. Analyse par spectrophotométrie d'absorption UV-visible



**Figure VI.7.** Les spectres UV-visible de : l'extrait de propolis, liposome-propolis, PM- $\beta$ CD, liposome blanc, propolis-PM- $\beta$ CD, et mélange physique

##### VI.4.1. Résultats

La figure VI.7 représente les spectres d'absorption UV des échantillons (propolis, PM $\beta$ CD, liposome blanc, propolis-CD, propolis-liposome et le mélange physique).

##### VI.4.2. Observation

D'après notre étude, on observe que l'intensité d'absorption a été progressivement augmentée, pour la propolis elle absorbe dans l'intervalle [200-340 nm] et pour les autres spectres, ils absorbent dans l'intervalle [200-290 nm].

### VI.4.3. Interprétation

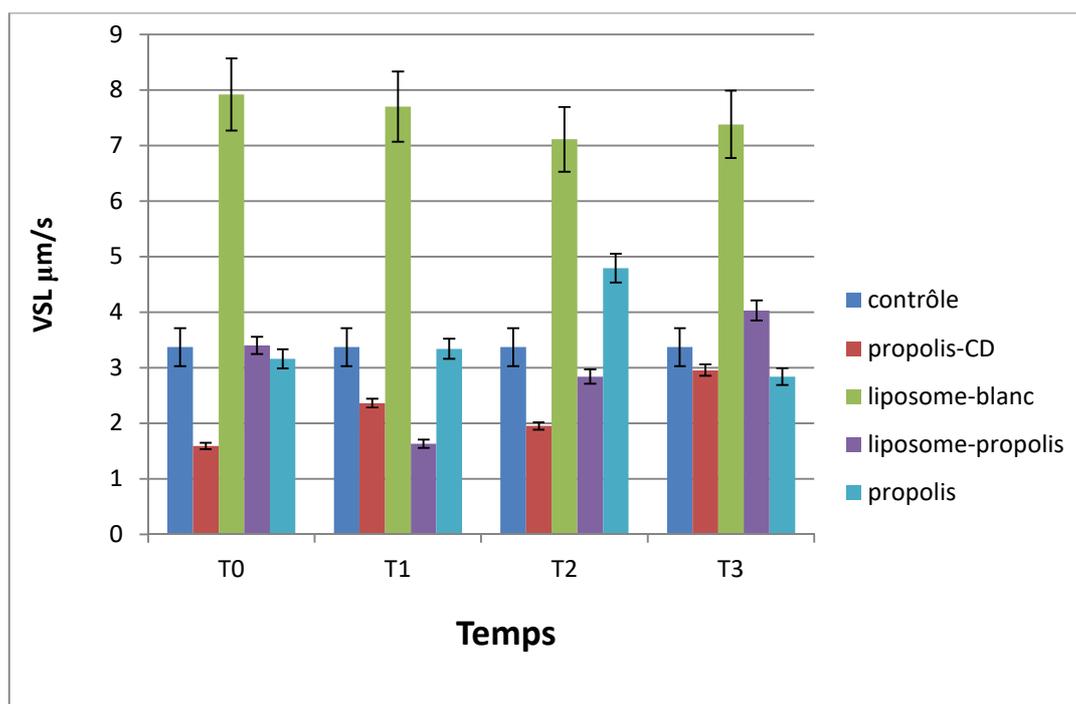
Le spectre de l'extrait de la propolis a montré une bande d'absorption significatif [200-340 nm], cela est dû à la présence des composés phénoliques tel : que les flavonoïdes (Ramli A N et al, 2019), ont trouvés résultats similaire [87].

Une bande d'absorption est similaire à été observé après l'encapsulation de l'extrait de propolis, cela confirme le piégeage de l'extrait de propolis dans les liposomes (Ramli N A et al, 2021), ont trouvés résultats similaire [86].

Une bande d'absorption est similaire à été observé après l'encapsulation de l'extrait de propolis dans les cyclodextrines, cela confirme aussi le piégeage de l'extrait de propolis dans la PM- $\beta$ CD (Vipin D et al, 2015), ont trouvée même résultats similaire [88].

## VI.5. Motilité des spermatozoïdes

### VI.5.1. Résultats



**Figure VI.8.** La VSL moyenne du sperme

La figure (VI.8) montre l'effet de l'extrait de propolis, le contrôle (sperme), liposome blanc, propolis-PM- $\beta$ CD et propolis-liposome sur le paramètre de motilité des spermatozoïdes (vitesse de leur déplacement).

### VI.5.2. Observation et interprétation

A T0, le liposome blanc a un effet positif et significatif sur la VSL, car la membrane de liposome est similaire à celle de sperme de plus elle contient du cholestérol qui joue un rôle important contre le stress oxydatif, par contre la propolis, propolis-PM- $\beta$ CD et propolis-liposome ont un effet moyen sur la VSL, car ils n'ont pas eu le temps nécessaire pour réagir avec le sperme.

Après 30 min, on remarque que le liposome-blanc a toujours le même effet positif et pour les autres échantillons l'extrait de propolis n'a pas eu encore le temps de se libérer et de réagir avec la membrane spermatique.

Après 2h, l'extrait de propolis a présenté une amélioration sur la VSL par rapport au contrôle, car elle a eu le temps nécessaire de réagir avec le sperme, cette réponse est due à l'effet antioxydant de la propolis plus exactement des polyphénols libérés.

Après 24h, la suspension propolis-liposome représente un meilleur effet sur la VSL par rapport au complexe propolis-PM- $\beta$ CD et au contrôle, cela peut être expliqué par l'effet antioxydant des composés actifs de propolis (polyphénols, flavonoïdes...) et du cholestérol qui protège la membrane cellulaire des spermatozoïdes en se complexant avec les radicaux libres durant la cryoconservation.

- Ces résultats ont démontré que les liposomes est une approche intéressante et prometteuse pour augmenter la solubilité de la propolis dans le milieu de conservation et d'améliorer la protection des spermatozoïdes, des résultats similaires ont été trouvés sur la vitamine E par Taouzin et al, 2022 [89].

# **CONCLUSION GENERALE**

Dans ce travail, nous avons pu préparer et caractériser des complexes d'inclusions de propolis-PM- $\beta$ CD et des solutions liposomales, dans le but d'améliorer la solubilité de la propolis plus particulièrement les polyphénols, et par la suite l'étude de son effet antioxydant sur la conservation spermatique.

Un enchainement d'étapes aussi importantes que nécessaires ont été suivies. Cette démarche a été planifiée est effectuée à l'aide d'un plan d'expérience.

La première partie de ce travail concerne la préparation des complexes propolis-PM- $\beta$ CD par la méthode de Co-évaporation. En second lieu, nous avons préparé des solutions liposomales (propolis-liposome) par la méthode d'injection de solvant organique en utilisant un plan d'expérience, qui nous a permis d'étudier les paramètres influençant sur le dosage des flavonoïdes et la taille des liposomes respectivement.

Après avoir réalisé tout les essais proposés par le plan d'expérience D-optimal, nous avons pu obtenir le complexe propolis-PM $\beta$ CD optimal et la solution liposomale optimale, dont le dosage des flavonoïdes totaux est de 0.0683 mg/ml et la taille des liposomes est de 1.779  $\mu$ m,

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

Au final, nous avons pu atteindre notre objectif principal, qui est l'amélioration de la solubilité de la propolis par la préparation d'un complexe d'inclusion avec la PM- $\beta$ CD et par les liposomes.

En guise de perspectives, il serait très intéressant de compléter ce travail par :

- L'étude de l'influence d'autres paramètres et facteurs tels que : le taux d'encapsulation.
- Inclure dans l'étude un autre type de cyclodextrine, possédant une solubilité importante, mais ayant une autre disposition spéciale (HP $\beta$ CD ou HP $\gamma$ -CD).
- Réaliser d'autres techniques de caractérisation tels que : le MEB, la polydispersité, et l'RMN.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] **De Almeida E C et al, 2002.** «Anti-inflammatory activity of propolis extract»: A review. *J of Venomous Animal and Toxins* ». Vol (8), pp 191-212.
- [2] **Singh M et al 2002.**«Biotechnological applications of cyclodextrins».Vol (20), pp 341-359.
- [3] **Lorin A et al, 2004.** «les liposomes :description,fabrication et application ». Vol(8), pp 163-176.
- [4] **FERHOUM F, 2010.** «Analyses physico chimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (*Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica sahariensis*) ». Mémoire de magister. Université M'hamed Bougara-Boumerdes.
- [5] **El Housseini N, 2013.** « Intérêts et applications cliniques de la propolis en médecine bucco-dentaire». Thèse de doctorat. Université De Nante.
- [6] **Soltani K, 2017.** «Caractérisation et activités biologique de substance, cas de la propolis». Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas-Sétif.
- [7] **AlMsrghitaş L et al, 2013.** « Important Developments in Romanian Propolis Research». Vol(10), pp 9.
- [8] **Sauvager F, 2014.** « La propolis: définition, récolte, propriétés et utilisation». Vol(3), pp 18-33.
- [9] **Kumazawa S et al, 2004.** « Antioxidant activity of propolis of various geographic origins». Vol (84), pp 329-339
- [10] **Shimizu A et al, 2004.** «Antioxydativebioavailability of artepillin C in Brazilian propolis». Vol (424), pp 181- 188.
- [11] **Adouane S, 2016.** « Etude ethnobotaniques des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès». Mémoire de magister, université mohamed khider, Biskra.
- [12] **Pandey K B et al, 2009.** « Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease».Vol (2), pp 270-278.
- [13] **Mohammadzadeh S et al, 2007.** «Antioxidant power of Iranian propolis extract». Vol(103), pp 729-733.

- [14] **Park YK et al, 2002.** « Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis». *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol(50), pp 2502–2516.
- [15] **Marcucci M C, 1995.** «Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity».vol( 26 ), pp 83-99
- [16] **Garabeth et al ,2007.** « Etude quantitative des coumarines d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boissier». Vol(5), pp 259-263.
- [17] **Parolia A et al, 2010.** Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of medicine and medical sciences*. Vol( 2), pp 210 – 215.
- [18] **Volpi N et al, 2006.** «Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol (42), pp 354 -361.
- [19] **Cardinault N et al, 2012.** «La propolis : Origine, Composition chimique et propriétés». Vol(10), pp 298-304.
- [20]**Ramos A et al, 2007.** «Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions». Vol(13), pp 697-710.
- [21] **Kimoto T et al, 1998.** «Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis». vol(22), pp 506–515.
- [22]**watanabe M et al,2021.**«Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effet». Vol(63), pp 1378-1386.
- [23] **Duran G et al, 2008.** «In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica* : a preliminary study».Vol(102), pp 1217–1225.
- [24] **Mickaël B, 2010.** «Propriétés et usage médical des produits de la ruche». Thèse doctorat. Université de Limoges.
- [25] **Lejeune B et al, 1986.** «Propolis extraction and utilisation in shampoos and lotions». vol(56), pp 65- 68.
- [26] **Park Y.K et al, 2002.** «Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol (50), pp 2502-2506

- [27] **Mizuno M et al, 1987.** «Useful ingredients and biological activity of propolis. fragrance Journal». Vol(15), pp 20-28.
- [28] **Broudiscou L P et al, 1997.** «Maintenance of rumen protozoa population in a dual outflow continous fermenter». Vol(75), pp 273-280.
- [29] **SEGUENI N, 2011.** «Contribution à l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis». Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine.
- [30] **Elodie T, 2010.** « Utilisation des cellules souches adultes dans le cadre de la thérapie cellulaire des organes solides : Etudes des relations cellules greffées environnement». Thèse de Doctorat. Université Toulouse III-Paul Sabatier (France).
- [31] **Félicie T, 2009.** «Conception et mise en œuvre d'un procédé intensifié continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale». Thèse de Doctorat. Université de Toulouse (France).
- [32] **Fávaro-Trindade C S et al, 2008.** « Microencapsulação de ingredientes alimentícios». Brazilian Journal of Food Technology. Vol (11), pp 103-112.
- [33] **Agnihotri N et al, 2012.** «Microencapsulation - A Novel Approach in Drug Delivery». Vol 2, pp1-20.
- [34] **Martins I M et al, 2014**«Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications».Chemical Engineering Journal. Vol(245), pp 191- 200.
- [35] **Barthès-Biesel D, Leclerc E, 2009** «Conception et réalisation d'un système micro-fluidique pour la production de gouttes calibrées et leur encapsulation». Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne.
- [36] **Cocero M J et al, 2009.** «Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications». Vol(47), pp 546–555.
- [37] **Giunchedi P et al, 1995.** «Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems». Vol(5), pp 276-290.

- [38] **Giraud S, 2002.** «Micro-encapsulation d'un disocyanate et d'un phosphate d'ammonium application : élaboration d'un système polyuréthane mono-composante à propriété retardatrice de flamme pour l'enduction textile». Thèse de Doctorat. Université des sciences et technologies de Lille (France).
- [39] **Dubey R et al, 2009.** «Microencapsulation Technology and Applications». Vol(59), pp 82-95.
- [40] **Poncelet D et al, 2008.** «Microencapsulation by solvent Evaporation: state of the art for process engineering approaches». Vol(363), pp 26-39.
- [41] **Kreuter J ,2006.**« Pharmaceutica Acta Helvetiae». Vol(72), pp 125-189.
- [42] **Fathi M et al, 2014.** «Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems». Vol(39), pp 18-39.
- [43] **Chen L et al, 2006.** «Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems». Vol(17), pp 272–283.
- [44] **Madene A et al, 2006.**« Flavour encapsulation and controlled release» .International Journal of Food Science and Technology. Vol(41), PP 1-21.
- [45] **Bakkour Y, 2005.** « Etude RMN des complexe d'inclusion avec les cyclodextrines native et polymérisées ». Thèse de doctorat. Université des sciences et technologie de Lille, (France).
- [46] **Jacquet R, 2006.** «Cyclodextrine hydrophiles : caractérisation et étude de leurs propriétés énantiométrique et complexante. Utilisation de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse ». Thèse de doctorat. Université d'Orleans (France).
- [47] **Moutard S, 2000.** «Relation entre la structure et les propriétés d'organisation de nouvelles cyclodextrines amphiphiles ». Thèse de doctorat. Université de Picardie (France).
- [48] **Tharin M, 2002.** « Synthèse de polyéthers linéaires et cycliques substitués par des cyclodextrines. Applications en chromatographie gazeuse et électrophorèse capillaire». Thèse de doctorat. Université de Neuchâtel(France).

- [49] **Bakkour Y, 2005.** « Etude par RMN des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines natives et polymérisées ». Thèse de doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille, France.
- [50] **Bonnet P, 2001.** « Etude par modélisation moléculaire de dimères de cyclodextrine et de leurs complexes d'inclusion ». thèse de doctorat. Université d'Orléans (France).
- [51] **Benhadi S, 2010.** «Greffage de cyclodextrines modifiées par traitement corona sur matériaux celluloseux». Thèse de doctorat. Université de Nancy I (France).
- [52] **Gross J, 2011.** « Caractérisation de surfaces bio fonctionnalisées pour l'étude de protéines de la chaîne respiratoire par spectroscopie infrarouge couplée à l'électrochimie ». Thèse de doctorat. Université de Strasbourg (France).
- [53] **Crini G et al, 2001.** « Quelques applications des complexes d'inclusion cyclodextrines/substrat ». Vol (247), pp18-25.
- [54] **Chekirou N L, 2012.** «Etudes des processus associatifs des complexes d'inclusion de la  $\beta$ -cyclodextrine par des méthodes quantochimiques et de spectroscopie Raman ». Thèse de doctorat. université d'Oran.
- [55] **Liu L et al, 2002.** « The driving force in the inclusion complexation of cyclodextrine », Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry. Vol(42), pp 1-14.
- [56] **Szejtli J, 2004.** « Pure and applied chemistry » vol(76), pp 1825-1845.
- [57] **Juvancz Z et al, 2002.** « Cyclodextrine as dominant chiral selective agents in the capillary separation techniques ». Vol(21), pp 379-388.
- [58] **Schneiderman E et al, 2000.** «Thermal characterization and cytotoxicity of complexes formed by papain and cyclodextrin ». Vol(745), pp 83-102.
- [59] **Khan A et al, 1996.** «Methods for selective modification of cyclodextrine». Vol(98), pp1977-1996.
- [60] **Szente L et al, 1999.** « Highly soluble cyclodextrin derivatives: Chemistry, properties and trends in development ». Vol( 36), pp17-38.

- [61] **Bangham A D et al, 1965.** « Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids ». Journal of Molecular Biology. Vol(13), pp 238-252.
- [62] **Chastagnier A, 1998.** « Les liposomes en thérapie orale et parentérale ». Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier (France).
- [63] **Hubert F, 2018.** « Synthèse enzymatique de phospholipides structurés riches en DHA ». Thèse de doctorat. Université Bretagne Loire (France).
- [64] **Maxfield F R et al, 2005.** « Role of cholesterol and lipid organization in disease ». Vol(438), pp 612-621.
- [65] **Kontogiannopoulos K N et al, 2014.** « Sterically stabilized liposomes as a potent carrier for shikonin ». Journal of Liposome Research. Vol(24), pp 230-240.
- [66] **Silva R et al, 2010.** « Effect ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation ». Vol(17), pp 628-632.
- [67] **Loftsson T et al, 2007.** « Cyclodextrins and their pharmaceutical application ». Journal of Pharmaceutics. Vol(329), pp 1-11.
- [68] **Hamilton R L Jr et al, 1980.** « Unilamellar liposome made with the french pressure Celle: a simple preparative and semi quantitative technique ». Journal of Lipid Research. Vol(21), pp 981-992.
- [69] **Akbarzadeh A et al, 2013.** « Liposome: classification, preparation, and application ». Vol(8), pp 102-110.
- [70] **Szoka F et al, 1978.** « Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation ». Vol(75), pp 4194-4198.
- [71] **Lasic D D, 1988.** « The mechanism of vesicle formation ». Journal Biochemical, Vol(256), pp 1-11.
- [72] **Riaz M, 1996.** « Liposome preparation methode ». Pakistan Journal of pharmaceutical Science. Vol(9), pp 65-77.
- [73] **Kyrikou I et al, 2005.** « A comparative study of the effects of cholesterol and sclareol, bioactive labdane type diterpene, on phospholipid bilayers ». Vol(133), pp 125-134.

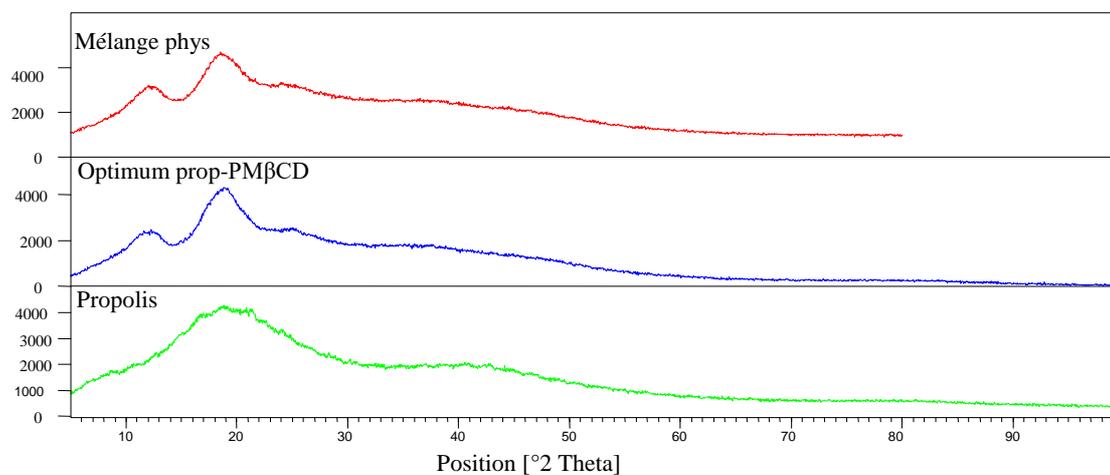
- [74] **Mosca M et al, 2011.** «Effect of membrane composition on lipid oxidation in liposome ». Vol(164), pp 158-165.
- [75] **Liu W et al, 2012.** « Structure and integrity of liposome prepared from milk-or soybean-derived phospholipids during invitro digestion ». Vol(48), pp 499-506.
- [76] **Taouzinat et al, 2020.** «Alpha Tocopherol Loaded in liposome: preparation,optimization,characterization and sperm Motility protection protection». Vol(10), pp 228-236.
- [77] **Boukemara L, 2009.** « Étude de l'adsorption des ions phosphate sur des oxyhydroxydes cas de l'hydroxyde de fer». Mémoire magister. Université Mentouri de Constantine.
- [78] **Ali Rachedi F et al, 2018.** «Analyse quantitative des composés d'un phénoliques d'un endémique algérienne scabiosa Atropurpurea sub.Martima L». Vol(87), pp 13-21.
- [79] **Abdenouche H, 2014.** «Détermination de la limite de substitution dans le système SrTiO<sub>3</sub>-NaF-MgF<sub>2</sub>». Mémoire de master. Université de Bejaïa.
- [80] **Benaissa A, 2011.** « Etude de la dégradation photocatalytique d'un colorant synthétique et d'un tensioactif ». Thèse doctorat. Université Mentouri Constantine.
- [81] **Permana A D et al, 2019.** «New HPLC–MS method for rapid and simultaneous quantification of doxycycline, diethylcarbamazine and albendazole metabolites in rat plasma and organs after concomitant oral administration ». Vol(170), pp 243–253.
- [82] **Chebil L, 2006.** « acylation des flavonoïdes par les lipases de candida antarctica et de pseudomonascepacia: études cinétique, structurale et conformationnelle ».Thèse doctorat institut national polytechnique de lorraine.
- [83] **Shakouri N et al, 2021.** «Encapsulation of propolis extract in whey protein nonoparticules ».Journal Pre-proof. Vol(158), pp 113138.
- [84] **Bruno A et al, 2012.** « Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl-β-cyclodextrin ». Vol(108), pp 87-94.

- [85] **Ziman Hu et al, 2021.** «Encapsulation of menthol into cyclodextrin metal-organic framework : preparation, structure characterization and evaluation of complexing capacity ». Vol(338), pp 8-39.
- [86] **Ramli N A et al, 2021.** « Physicochemical characteristics of liposome encapsulation of stingless bees' propolis ». Vol(7), pp4-9.
- [87] **Ramli N A et al, 2019.** « Indo-Malayan stingless bees'propolis extract-loaded chitosomes : caracterization and storage stability evaluation ». Vol(7), pp 2277-3878.
- [88] **Vipin D et al, 2015.** «Inclusion complex of ellagic acid with  $\beta$ -cyclodextrin : characterization and in vitro anti-inflammatory evaluation ». Journal Accepted Manuscript, 21786
- [89] **Taouzinet L et al, 2022.** « Drug release, stability and efficiency of vitamine E loaded in liposomes for Bovin sperm protection in crypreservation dedium ». Vol(43), pp 50-57.
- [90] **Sebaaly C et al, 2015.** «Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes». vol(10),pp 10-16.

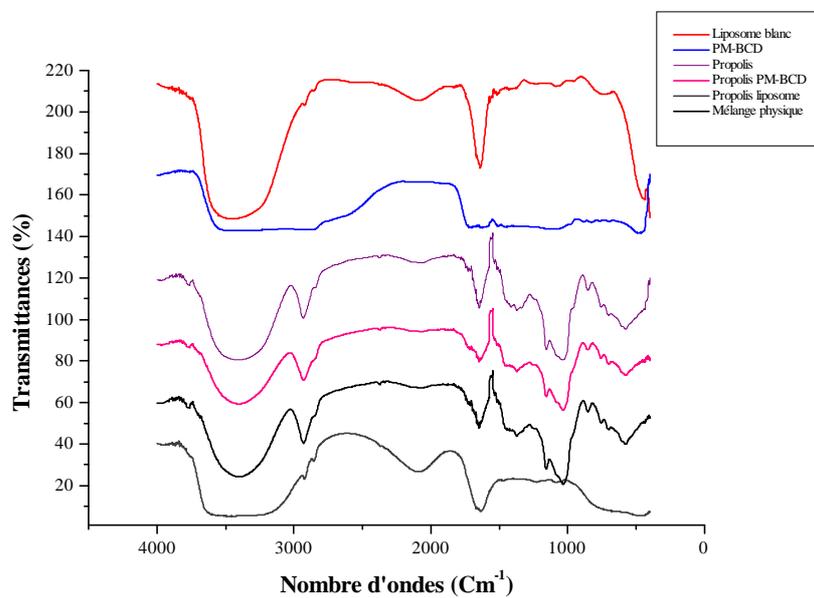
# **ANNEXES**

## Annexe 1 : Résultats des techniques de caractérisation

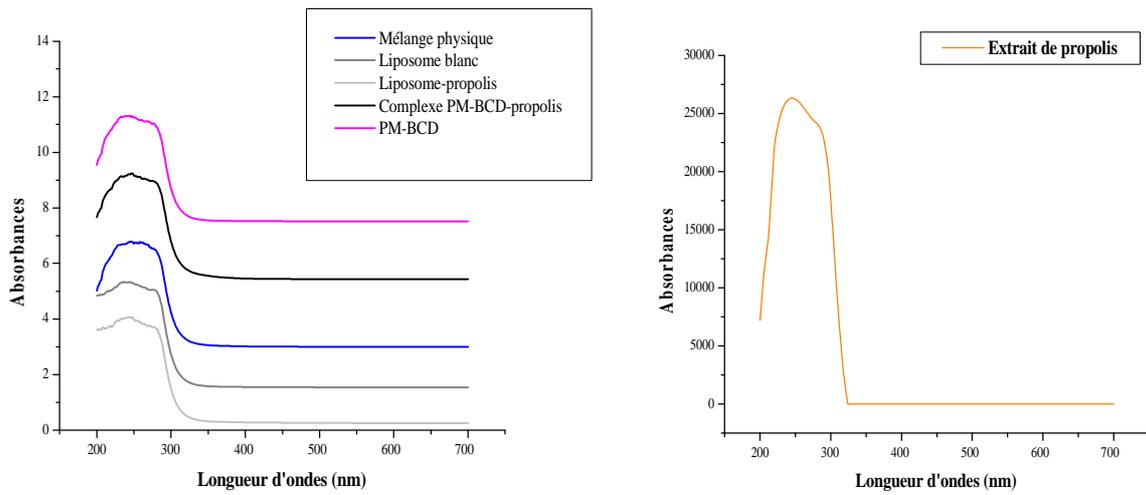
### a) Analyse par la diffraction des rayons X



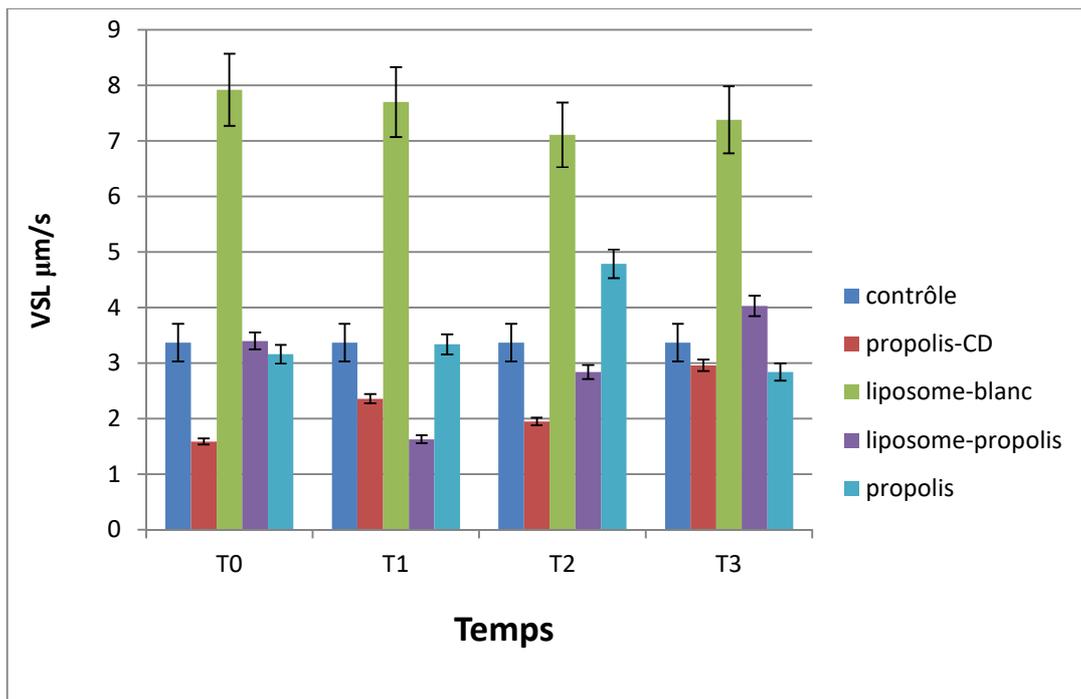
### b) Analyse par spectroscopie infrarouge IR



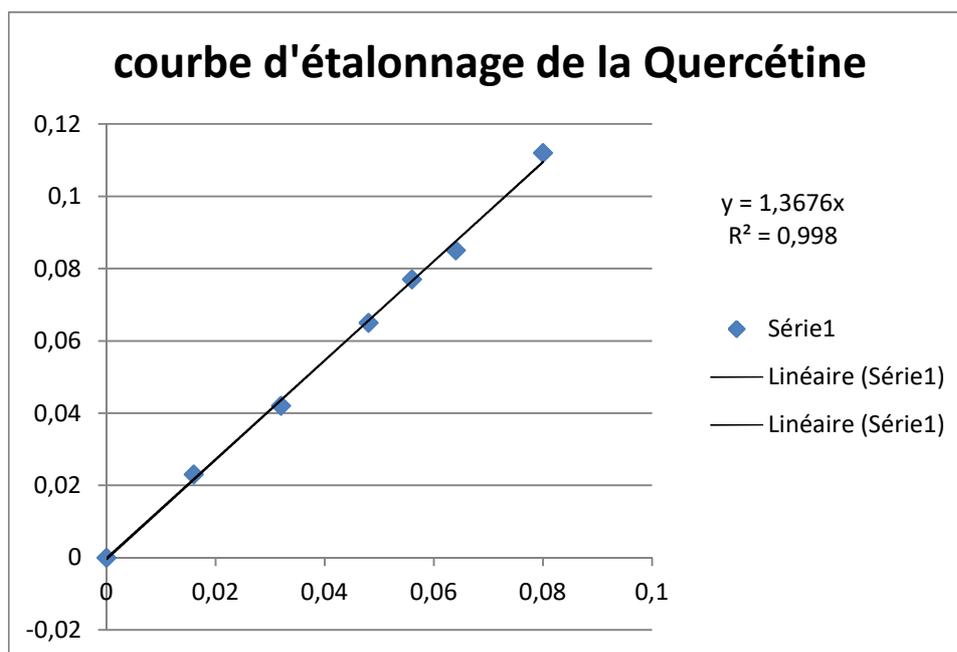
### c) Analyse par la spectrophotométrie d'absorption UV-visible



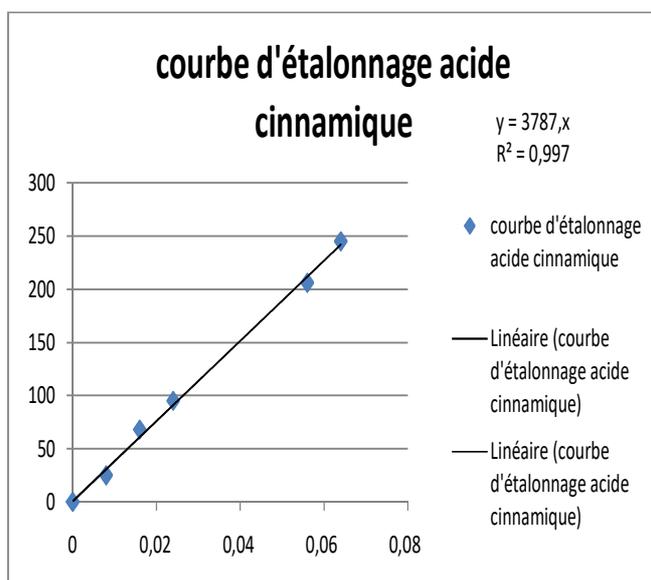
### d) Test de motilité des spermatozoïdes



**e) Courbe d'étalonnage de la quercétine.**



**f) Courbe d'étalonnage de l'acide cinnamique**



## Annexe 2 : Equipements et appareils utilisés durant cette étude

### a) Rota-vapeur



### b) Présentation d'un spectrophotomètre UV-visible



**c) Granulomètre laser**



**d) Présentation d'un diffractomètre des rayons X**



e) Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)



f) Présentation de la centrifugeuse



**g) Spectrophotomètre infrarouge IR**



**h) Microscope CASA**



**i) Balance analytique**



**j) Plaque chauffante**



**j) Plaque agitatrice**



**Résumé:**

Dans ce présent travail, nous nous sommes fixé comme objectif principal l'amélioration de la solubilité de la propolis dans les milieux aqueux, ceci est effectué avec un procédé d'encapsulation par les cyclodextrines (CD) et par les liposomes.

Pour cela nous avons optimisé, préparé, et caractérisé des complexes d'inclusions avec la PM $\beta$ -CD et les liposomes en fixant le dosage des flavonoïdes et la taille de liposome comme réponses, à l'aide d'un plan d'expérience (modèle 06). Les complexes et les solutions liposomales obtenues ont été caractérisées par la diffraction des rayons X (DRX), par la spectroscopie infrarouge IR, par une analyse d'absorption UV-visible, HPLC et en dernier l'amélioration de la conservation des spermatozoïdes a été étudié.

Les résultats obtenus montrent que nous avons pu améliorer la solubilité de la propolis par la préparation d'un complexe d'inclusion avec la PM- $\beta$ CD et par les suspensions liposomales, et d'une autre part la conservation des spermatozoïdes a été amélioré.

**Mots clés:** propolis, encapsulation, cyclodextrines, liposomes, spermatozoïdes.

**Abstract:**

In the present study, we set as a main objective the improvement of the solubility of propolis in aqueous medium; this is done with process of encapsulation by cyclodextrins (CD) and liposomes.

For this we optimized, prepared, and characterized inclusion complexes with PM $\beta$ -CD and liposomes by setting flavonoid content and liposome size as responses, using an experimental design (modèle 06). The complexes and liposomal solutions obtained were characterized by X-ray diffraction (XRD), IR infrared spectroscopy, UV-visible analysis, HPLC and finally the improvement of the spermatozoa conservation was studied.

The results show that we were able to improve the solubility of propolis by the preparation of an inclusion complex with PM- $\beta$ CD and liposomal suspensions, and on the other hand the conservation of spermatozoa was improved.

**Key words:** propolis, encapsulation, cyclodextrins, liposomes, spermatozoa.