



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

Et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb - BLIDA 1



Faculté de Médecine

Département de Pharmacie

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du titre de **Docteur en Pharmacie**

Présenté par : HELLALI Djafer Hamza

Thème :

- Nanoencapsulation de l'Huile Essentielle de *Rosmarinus officinalis* :
- Caractérisation Physicochimique et Évaluation Biologique

Session : Juillet 2023

Devant le jury composé de :

- Présidente Dr BENHAMIDA.S Maitre-assistante en pharmacologie
- Examineur Dr MAHFOUDH.M Maitre-assistant en microbiologie
- Encadreur Pr AYACHI.N Maitre de conférences A en pharmacie galénique

REMERCIEMENTS

Louange soit à **Allah**, le **Tout Puissant**, le **Clément** et le **Miséricordieux** qui m'a soutenu et permis de suivre ce parcours universitaire. Sa guidance divine m'a éclairé et m'a ouvert les portes que je ne pensais jamais pouvoir s'ouvrir. Sa grâce incommensurable, ainsi que sa bienveillance infinie m'ont donné la confiance et l'inspiration nécessaires pour réussir chacun de mes objectifs. Je suis reconnaissant de sa sagesse et sa bénédiction qui ont été mes guides constants tout au long de ce parcours. Que sa grâce continue de guider mes pas dans ma quête de connaissances et d'accomplissements.

Mes remerciements les plus sincères vont envers mon encadreur, la Professeure **Ayachi Nabila**, pour son soutien inestimable tout au long de ma thèse de fin d'études. Sa présence bienveillante, sa patience infinie et ses conseils avisés ont été une source d'inspiration constante. Son expertise et sa passion contagieuse pour la recherche, ainsi que sa confiance en mes capacités et son soutien indéfectible ont été des moteurs essentiels dans la réalisation de ce projet avec succès. C'était un honneur pour moi d'avoir travaillé à ses côtés et de l'avoir comme mentor durant cette année.

Je tiens à remercier chaleureusement, Docteur **Mahfoudh**, Maître assistant en microbiologie, ainsi que Docteur **Benhamida**, Maître assistante en pharmacologie, pour m'avoir honoré d'accepter d'examiner attentivement ce travail. Leur expertise et leurs vastes connaissances dans le domaine de la pharmacie sont d'une valeur inestimable pour l'évaluation approfondie de ce projet. Leur réputation et leurs contributions significatives à la recherche dans le domaine pharmaceutique n'est plus à démontrer.

Je suis sincèrement reconnaissant envers Docteur **Chikhaoui**, pharmacienne spécialiste en microbiologie ainsi que son équipe. J'ai pu bénéficier de son expertise ainsi que son aide précieux au niveau de l'**E.H.S TOT BLIDA**. Sa générosité et sa confiance en moi m'ont permis d'accéder à chaque recoin du laboratoire d'analyses et de réaliser mon travail dans les meilleures conditions.

Je tiens à remercier Docteur **Djellouli**, Maître assistant en pharmacologie, pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire de pharmacologie, ainsi que les résidentes en pharmacologie qui m'ont apporté leur contribution précieuse tout au long de cette expérience lors de la réalisation de l'activité anti-inflammatoire et analgésique in vivo sur les souris.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude envers les responsables du département de chimie et du département des génies des procédés pour m'avoir aimablement autorisé de réaliser mes analyses physico-chimiques au sein de leurs laboratoires respectifs. Je tiens également à remercier chaleureusement les doctorantes et ingénieurs qui m'ont apporté leur aide précieux, leur générosité et leur soutien ont été essentiels pour mener à bien mes expérimentations

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers chaque personne qui m'a apporté son soutien de près ou de loin dans la réalisation de ce mémoire. Leurs conseils, encouragements et contributions ont été inestimables tout au long de ce parcours. Leur aide, qu'il soit grand ou petit, a joué un rôle significatif dans la réalisation de ce mémoire.

DÉDICACE

À Ma **mère** bien-aimée, je tiens à te remercier du fond du cœur pour ton amour éternel, ton soutien indéfectible et ta présence précieuse tout au long de la réalisation de ce mémoire. Tes encouragements constants, ta confiance inébranlable en moi et ton soutien inconditionnel ont été des sources d'inspiration et de motivation inestimables.

Tes mots d'encouragement doux et réconfortants ont été une force motrice dans les moments de doute et de découragement. Ta tendresse et ta bienveillance ont allégé le fardeau des longues heures de travail et ont illuminé mon parcours académique. Tu as été mon roc, ma confidente et ma meilleure amie. Tes sacrifices, ton soutien inlassable et ton amour inconditionnel ont été les fondations sur lesquelles j'ai pu bâtir ce mémoire. Je t'exprime ma gratitude éternelle et mon amour infini.

À Mon cher **père**, je tiens à t'exprimer toute ma gratitude profonde pour ton soutien inégalé. Ta présence bienveillante, ta sagesse et tes encouragements constants ont été une source de force et de motivation tout au long de ce parcours académique exigeant, tes paroles d'encouragement m'ont donné la détermination nécessaire pour aller de l'avant, même lorsque les défis semblaient insurmontables.

À ma **sœur** adorée, ton soutien inconditionnel et ta croyance en moi m'ont poussé à donner le meilleur de moi-même. Tes encouragements constants, tes paroles inspirantes et ta présence réconfortante ont été des sources de motivation inépuisables.

À mon **frère** bien-aimé, ta présence réconfortante, ton soutien inconditionnel et tes encouragements sincères ont été d'une grande valeur pour moi. Merci d'avoir été là, même en étant plus jeune, et d'avoir apporté ton soutien à ta manière. Je suis reconnaissant d'avoir un frère comme toi.

À la mémoire de mon **grand-père**, dont l'amour et le soutien ont été une source d'inspiration inépuisable tout au long de ma vie. Ta foi inébranlable en moi et tes prières ferventes pour mon succès ont été une force motrice tout au long de cette aventure. Je t'honore en dédiant ce mémoire à ta mémoire bien-aimée, avec une profonde reconnaissance et un amour éternel.

TABLE DES MATIERES

Table des matières	A
Liste d'abréviations	B
Liste des figures	C
Liste des tableaux	D
Remerciements et dédicaces	E
Introduction	01

Partie I : Partie bibliographique

Chapitre 01 : Monde de la nanotechnologie

I- Généralités sur la nanotechnologie.....	03
1 - Définition de la nanotechnologie.....	03
2 - Histoire et origine de la nanotechnologie	04
3 -Avancées de la nanotechnologie	05
II - Nanomédecine.....	06
1 – Introduction à la nanomédecine.....	06
2 - Applications de la nanomédecine	06
a) Vectorisation des médicaments	07
b) Diagnostic.....	08
c) Septicémie.....	08

Chapitre 02 : Nanoparticules

I- Nanoparticules	09
1 - Définition des nanoparticules.....	09
2 - Classification des nanoparticules.....	10
a) Nanoparticules organiques	10

b) Nanoparticules inorganiques	12
c) Nanoparticules à base de carbone	12
3 – Synthèse des nanoparticules.....	13
4 – Propriétés des nanoparticules	14
a) Propriétés mécaniques	14
b) Propriétés magnétiques	14
c) Propriétés thermiques	15
d) Électronique et propriétés optiques	15
5 – Caractérisation des nanoparticules	16
a) Caractérisation de la taille des nanoparticules	16
b) Caractérisation de la morphologie des nanoparticules	17
c) Caractérisation de la charge de la surface	18
d) Caractérisation des propriétés optiques des nanoparticules.....	19
e) Caractérisation des groupements chimiques et fonctionnels	19
6 – Réglementation des nanoparticules dans le domaine médical	21

Chapitre 03 : Nanoparticules polymériques

I- Généralités sur les nanoparticules polymériques	22
1 - Définition.....	22
2 - Distinction entre les nanocapsules et les nanosphères	22
a) Nanosphères	22
b) Nanocapsules	23
II – Polymères	24
1 - Généralités sur les polymères	24
2 - Polymères utilisés dans la fabrication des nanoparticules polymériques.....	25
a) Polymères naturels	26
i) Collagène.....	26
ii) Alginate.....	26
iii) Chitosane.....	27

b) Polymères synthétiques	28
i) Polycaprolactone.....	28
ii) Acide polylactique	28
3 - Méthodes d'encapsulation par les nanoparticules polymériques	28
a) Évaporation du solvant	28
b) Méthode de nanoprécipitation.....	29
c) Gélification ionique	30
d) Mini-émulsion polymérisation.....	31
e) Spray drying.....	31
III – Application des nanoparticules dans le domaine pharmaceutique	32
1 - Nanoparticules polymériques – Vectorisation des médicaments.....	32
2 - Pharmacocinétique des nanoparticules polymériques.....	34
a) Absorption	34
b) Distribution	35
c) Métabolisme.....	35
d) Excrétion	35
 Chapitre 04 : Huiles essentielles	
I - Généralités sur les plantes médicinales	36
a) Phytothérapie.....	37
b) Homéopathie	37
c) Aromathérapie.....	38
II – Huiles essentielles	39
1 – Définition des huiles essentielles	39
2 – Composition chimique des huiles essentielles.....	40
3 - Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles	40
4 - Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	42
III – Plante étudié : Rosmarinus officinalis	43
1 - Origine du nom.....	43

2 - Étude botanique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	43
a) Classification	43
b) Caractéristiques botaniques du romarin	44
IV – Huile essentielle du romarin.....	45
1 - Composition phytochimique du romarin.....	45
2 - Composition de l'huile essentielle du <i>Rosmarinus officinalis</i>	45
3 - Propriétés physiques de l'huile essentielle du romarin.....	46
4 – Utilisations et applications de la plante de romarin	47
5 - Activités thérapeutiques de l'huile essentielle du romarin.....	48
a) Activité antioxydante.....	48
b) Activité anti inflammatoire	48
c) Activité antimicrobienne et antifongique.....	49
d) Activité analgésique	50
e) Activité anti tumoral	50

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre 01 : Matériels et méthodes

I – Matériel.....	52
1 – Matériel végétale	52
2 – Matières premières et réactifs	53
3 – Matériel biologique	59
a) Matériel microbiologique	59
b) Matériel animal	62
4 – Équipement et matériels utilisés	64
II – Mode opératoire	65
1 – Étude des activités microbiologiques de l'huile de romarin	65
1.1 - Étude de l'activité antibactérienne in vitro de l'huile du romarin	65
1.2 - Protocole expérimental pour évaluer l'activité antimicrobienne	66
1.3 - Étude de l'activité antifongique in vitro de l'huile du romarin.....	70

1.4 - Protocole expérimental pour évaluer l'activité antifongique	71
2 – Évaluation de l'activité antioxydante in vitro de l'huile de romarin	71
2.1 - Protocole expérimental pour évaluer l'activité antioxydante	72
3 – Préparation des nanoparticules encapsulant l'huile de romarin.....	74
III – Évaluation de l'activité anti inflammatoire et analgésique in vivo	76
IV – Caractérisation par la diffusion dynamique de la lumière (DLS)	81
V – Caractérisation par spectrophotométrie UV-Visible	83
VI – Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier FTIR	86
VII – Observation sous microscope électronique à balayage MEB	88

Chapitre 03 : Résultats et discussions

I – Évaluation de l'activité antibactérienne in vitro.....	89
II – Évaluation de l'activité antifongique in vitro	94
III – Évaluation de l'activité antioxydante de in vitro	98
IV – Évaluation de l'activité anti inflammatoire in vivo	100
V – Évaluation de l'activité analgésique in vivo	102
VI – Détermination de la taille du potentiel zêta et de l'indice de polydispersité par la DLS.....	103
VII – Détermination du spectre de balayage de l'huile essentielle	108
VIII – Résultat de la détermination de l'efficacité d'encapsulation (EE)	109
IX – Résultats de la détermination in vitro du profil de libération.....	114
X – Analyse des résultats obtenus par FTIR de nos échantillons	116
XI– Résultat de l'observation sous microscope optique.....	121
XII – Résultat de l'observation sous microscope électronique à balayage	122

Conclusion	125
-------------------------	------------

Références bibliographiques

Annexe

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma démontrant les différents domaines d'applications de la nanotechnologie .	05
Figure 2 : Conception de systèmes colloïdaux pour le transport de molécules variées	07
Figure 3 : Comparaison de différentes tailles d'objets par rapport à l'échelle nanométrique	09
Figure 4 : Nanoparticules organiques : a – Dendrimères, b – Liposomes et c – Micelles	10
Figure 5 : Schéma illustrant la configuration des nanocapsules et nanosphères	11
Figure 6 : Nanoparticules à base de carbone : a – Fullerènes, b – Graphène, c – Nanotubes de carbone, d – Carbone nanofibres, e - Noir de carbone	12
Figure 7 : Synthèse de nanoparticules via des approches top-down et bottom-up.....	15
Figure 8 : L'interaction du champ électrique de la lumière incidente avec les électrons libres ...	15
Figure 9 : Schéma du principe de la DLS « classique »	16
Figure 10 : Schéma illustrant le TEM	17
Figure 11 : Diagramme la concentration ionique et la différence de potentiel en fonction de la distance à la surface chargée d'une particule en suspension dans un milieu de dispersion	18
Figure 12 : Schéma illustrant le principe du spectroscope UV-Vis.....	19
Figure 13 : Représentation schématique de la structure d'une nanocapsule et d'une nanosphère	23
Figure 14 : Structure chimique de l'alginate de sodium	26
Figure 15 : Structure chimique du chitosane	27
Figure 16 : Représentation schématique du procédé d'évaporation du solvant.....	29
Figure 17 : Schéma de la méthode de nanopréciipitation.....	29
Figure 18 : Schéma illustrant la méthode de gélification ionique	30
Figure 19 : Schéma illustrant la formation de mini émulsion	31
Figure 20 : Illustration schématique des nanocapsules et des nanosphères, et comment les médicaments sont soit piégés, soit adsorbés à leur surface	32
Figure 21 : Schéma détaillant les quatre étapes de la Pharmacocinétique.....	35
Figure 22 : Manuscrit remontant à l'âge d'or de l'islam	35

Figure 23 : Illustration d'huiles essentielles en flacon	38
Figure 24 : Illustration de l'huile de romarin.....	43
Figure 25 : Différentes illustrations de la plante de romarin et schéma de ces différents composants	44
Figure 26 : Structure chimique de l' α -pinène.....	49
Figure 27 : Structure chimique du camphre	49
Figure 28 : Structure chimique du 1,8-cinéole	49
Figure 29 : Schéma représentant les différentes étapes de la démarche expérimentale	51
Figure 30 : Fiche technique de l'huile essentielle du romarin.....	52
Figure 31 : Illustration de l'huile de romarin.....	52
Figure 32 : Structure chimique de l'alginate de sodium	53
Figure 33 : Structure chimique du chitosane	54
Figure 34 : Structure chimique du Tween® 80	55
Figure 35 : Structure chimique du Tripolyphosphate de sodium	56
Figure 36 : Structure chimique du carbonate de calcium.....	57
Figure 37 : Structure chimique du DPPH.....	58
Figure 38 : Structure chimique du κ -carraghénane.....	58
Figure 39 : Ensemble des lots de souris qui ont subi les expérimentations.....	63
Figure 40 : Illustration de l'un des lots de souris.....	63
Figure 41 : Exemple d'un ré isolement d'une souche bactérienne	66
Figure 42 : Illustration démontrant l'ensemencement d'une souche bactérienne	67
Figure 43 : Schéma représentant les différentes étapes de réalisation de l'aromatogramme.....	68
Figure 44 : Illustration de la lecture du résultat de l'aromatogramme. A : Méthode de puits, B : Méthode de disques	69
Figure 45 : Représentation schématique de l'activité antioxydante de l'HE avec le DPPH.....	72
Figure 46 : Préparation de la solution méthanolique de DPPH	74

Figure 47 : Des images prises lors de la préparation de nos formulations de nanoparticules	76
Figure 48 : Administration de la solution de carraghénine à 1%.....	78
Figure 49 : La sonde de gavage employée par voie orale.....	78
Figure 50 : Appareil d'Algomètre employé pour la mesure pourcentage d'analgésie	80
Figure 51 : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antibactérienne.....	89
Figure 52 : L'activité de l'HE contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89
Figure 53 : L'activité de l'HE contre <i>Staphylococcus aureus</i>	90
Figure 54 : L'activité de l'HE contre <i>Salmonella enteritidis</i>	90
Figure 55 : L'activité de l'HE contre <i>Enterococcus faecalis</i>	90
Figure 56 : L'activité de l'HE contre <i>Escherichia coli</i>	90
Figure 57 : L'activité de l'HE contre <i>Serratia marcescens</i>	90
Figure 58 : L'activité de l'HE contre <i>Klebsiella pneumoniae</i>	90
Figure 59 : Résultat de la CMI anti bactérienne.....	92
Figure 60 : Microplaque utilisé lors de la détermination de la CMI.....	93
Figure 61 : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antifongique.....	94
Figure 62 : Résultat de l'activité de l'huile essentielle contre <i>Candida albicans</i>	95
Figure 63 : Résultat de l'activité de l'huile essentielle contre <i>Candida glabrata</i>	95
Figure 64 : Résultat de l'activité de l'huile essentielle contre <i>Candida kefyr</i>	95
Figure 65 : Résultat de la CMI anti fongique	97
Figure 66 : Courbe du pourcentage d'inhibition de l'activité anti oxydante	98
Figure 67 : Virage de la couleur violette du DPPH (B) à jaune clair (A) après neutralisation.....	99
Figure 68 : Évaluation du pourcentage de réduction de l'œdème.....	100
Figure 69 : Patte de souris ayant reçu la carraghénine (à gauche) Patte témoin (à droite).....	101
Figure 70 : Mesure de la taille des nanoparticules de la formulation 1	103
Figure 71 : Mesure de la taille des nanoparticules de la formulation 2.....	104

Figure 72 : Mesure de la taille des nanoparticules de la formulation 3 (à droite) et 4 (à gauche)	104
Figure 73 : Résultats de la mesure du potentiel zêta et du PDI des nanoparticules formulés.....	107
Figure 74 : Spectre de balayage de l'huile essentielle du romarin.....	108
Figure 75 : Courbe d'étalonnage de l'huile essentielle du romarin	109
Figure 76 : Profil de libération in vitro des nanoparticules formulés dans le milieu acide et basique	114
Figure 77 : Spectre FTIR de l'analyse de l'huile essentielle	117
Figure 78 : Spectre FITR de l'analyse de nanoparticules ALG/Copolymère encapsulant l'HERO et leurs NP blancs.....	118
Figure 79 : Spectre FITR de l'analyse de nanoparticules de chitosane.....	119
Figure 80 : Spectre FITR de l'analyse du blanc de nanoparticules de chitosane	119
Figure 81 : Spectre FITR de l'analyse du polymère de chitosane	120
Figure 82 : Spectre FITR de l'analyse du polymère de d'alginate de sodium	120
Figure 83 : Nanoparticules observés au microscope optique à l'objectif (40 X)	121
Figure 84 : Observation d'une dispersion de nanoparticules à l'objectif (40 X).....	121
Figure 85 : Formulation 1 observé par le MEB à l'objectif (15000 X).....	122
Figure 86 : Formulation 1 observé par le MEB à l'objectif (100000 X).....	123
Figure 87 : Formulation 3 observé par le MEB à l'objectif (12000 X).....	123

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Différentes facettes de la nanotechnologie : une revue des définitions les plus répandues.....	33
Tableau 2 : Tableau résumant les caractéristiques et méthodes de caractérisation des NP	20
Tableau 3 : Exploration des polymères naturels et synthétiques utilisés dans l'administration des médicaments.....	25
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des nanoparticules polymériques formulées à partir de différents polymères pour une administration ciblée de médicaments	33
Tableau 5 : Influence de quelques paramètres sur l'absorption des nanoparticules par le GIT	34
Tableau 6 : Tableau détaillant les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles et leurs techniques de détermination	41
Tableau 7 : Tableau démontrant les avantages et désavantages des différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	42
Tableau 8 : Tableau démontrant les variables molécules bioactives présentes dans le romarin .	45
Tableau 9 : Tableau démontrant les différentes caractéristiques physiques de l'huile essentielle du romarin	46
Tableau 10 : Propriétés physicochimiques de l'alginate de sodium	53
Tableau 11 : Propriétés physicochimiques du chitosane	54
Tableau 12 : Propriétés physicochimiques du Tween 80 (Polysorbate 80)	55
Tableau 13 : Propriétés physicochimiques du Tripolyphosphate de sodium.....	56
Tableau 14 : Propriétés physicochimiques du carbonate de calcium.....	57
Tableau 15 : Liste des autres réactifs employés dans notre étude	59
Tableau 16 : Tableau représentant les différents milieux de cultures utilisés dans notre étude	60
Tableau 17 : Tableau représentant les souches bactériennes et fongiques étudiés	61
Tableau 18 : Récapitulatif des appareils employés lors de ce travail.....	64

LISTE D'ABRÉVIATIONS

ATCC : American Type Culture Collection

AVC : Accident vasculaire cérébral

BHIB : Bouillon cœur-cervelle

DHT : Dihydrotestostérone

DDS : Drug delivery system

GN : Gélose nutritive

HE : Huile essentielle

HERO : Huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*

IP : Indice de polydispersité

ISO : Organisation internationale de normalisation

KBr : Bromure de potassium

MEB : Microscope électronique à balayage

MPS : Système macrophagocytaire

NP(s) : Nanoparticule(s)

PDI : Polydispersity index

PEG : Polyéthylène glycol

PI : Pourcentage d'inhibition

PNP : Nanoparticules polymériques

PZ : Potentiel zêta

RES : Système réticulo-endothélial

SC: Saboraud chloramphénicol

VOIE SC : Voie sous cutanée

µg : Microgramme

ml : Millilitre

µL : Microlitre

nm : Nanomètre

min : Minute

h : Heure

kDa : Kilodalton

rpm : Round per minute

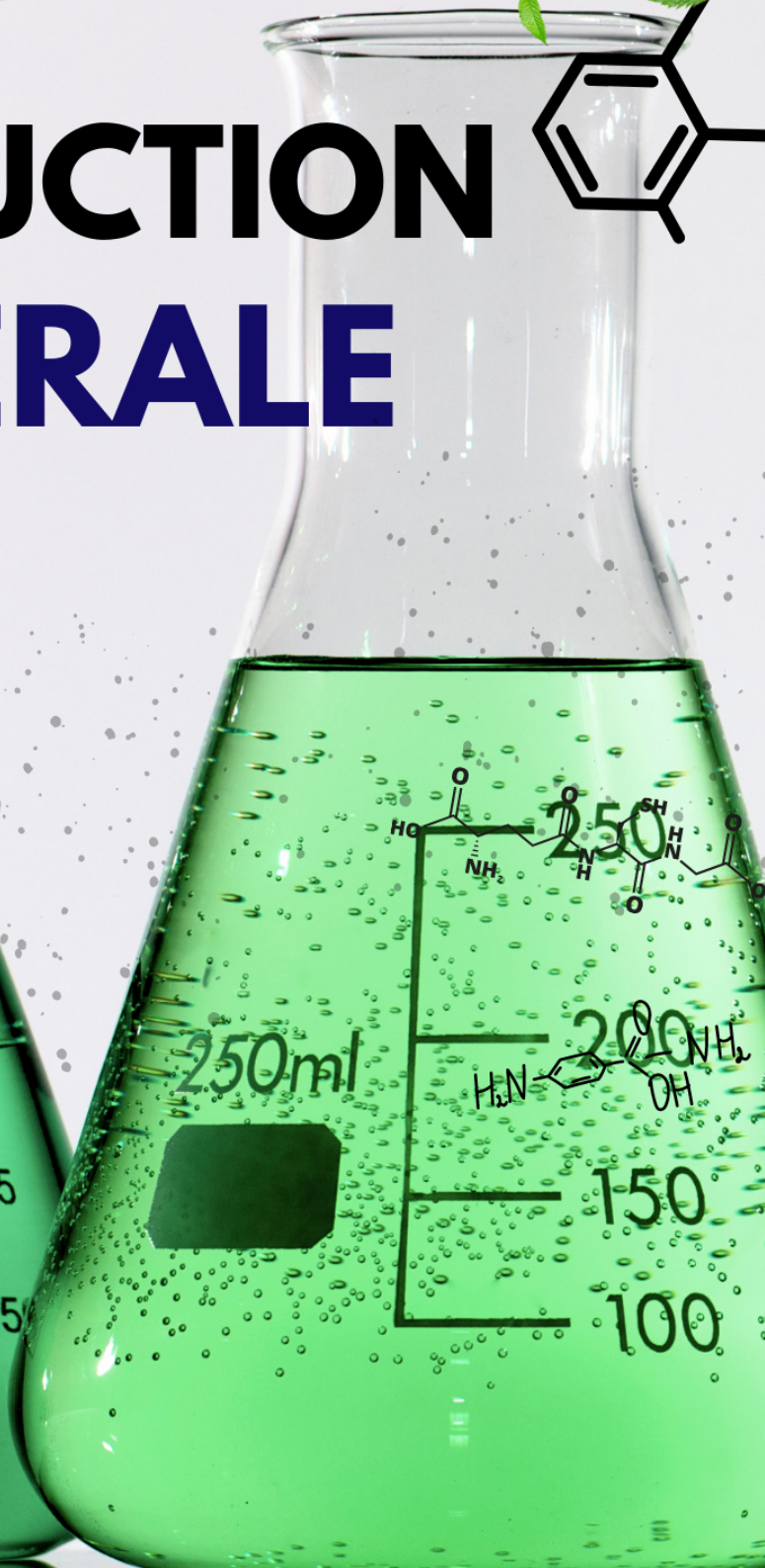
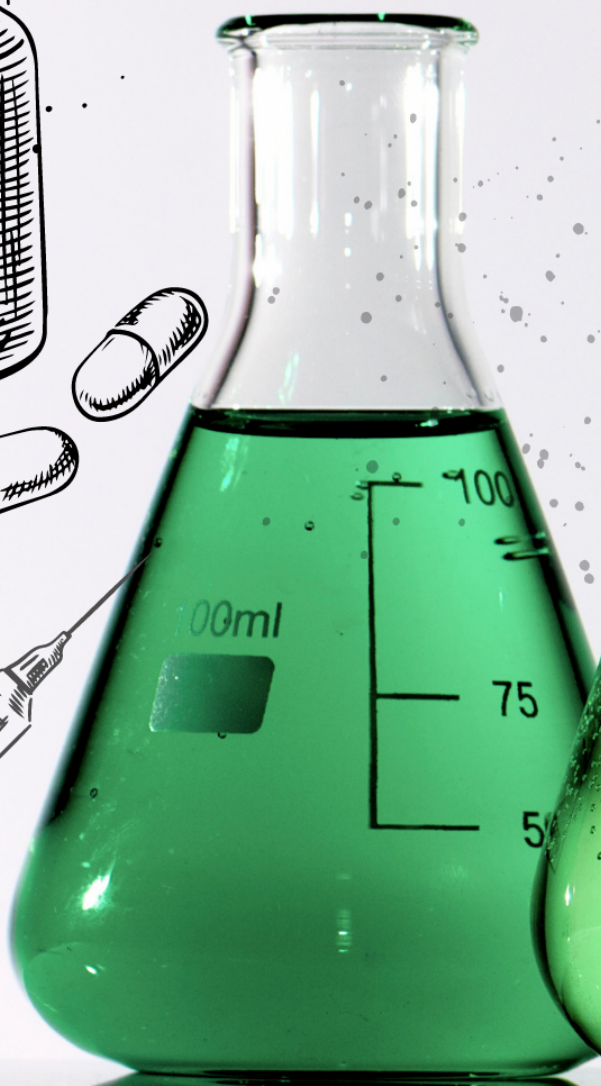
mV : Millivolt

pa : Pascal

Kpa : Kilopascal

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION GÉNÉRALE



La nanoscience est le domaine de la science et de la technologie qui s'occupe de la manipulation et de la conception des matériaux à l'échelle nanométrique, dont la taille est comprise entre 1 et 100 nanomètres. Cette technologie est utilisée pour créer de nouveaux matériaux ou améliorer ceux déjà existant avec des propriétés et des capacités uniques (1).

La caractéristique principale de la nanotechnologie est effectivement sa dimension à l'échelle nanométrique. Il est important de noter qu'elle englobe également d'autres aspects tels que les propriétés et les comportements particuliers des matériaux à cette échelle, outre leur grande résistance, leur légèreté, leur réactivité chimique (2).

L'histoire des nanoparticules remonte à plusieurs décennies, avec les premières observations de structures nanométriques dans divers matériaux. Cependant, ce n'est que récemment que les nanoparticules ont acquis une attention particulière en raison de leur potentiel remarquable. L'utilisation de nanoparticules pour l'encapsulation de composés actifs est un domaine de recherche en pleine expansion qui présente un grand potentiel dans de nombreux domaines, notamment la médecine. Les nanoparticules, avec leur taille nanométrique et leurs propriétés uniques, offrent des avantages considérables pour la protection, la libération contrôlée et l'amélioration de la stabilité des composés encapsulés (4). Parmi ces composés, les huiles essentielles ont attiré une attention particulière en raison de leurs propriétés thérapeutiques.

L'huile essentielle de romarin, est largement reconnue pour ses nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé. Elle est utilisée depuis des siècles dans la médecine traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques (5). Cependant, malgré cela, l'huile de romarin présente des défis en termes de stabilité, de solubilité et de libération contrôlée de ses composés actifs, Comment peut-on alors y remédier ? Quelles sont les stratégies les plus efficaces pour améliorer la stabilité de l'huile essentielle de romarin et optimiser sa libération ? Est-ce que l'encapsulation par des nanoparticules offre une solution viable pour surmonter ces obstacles ? En explorant ces questions, cette thèse vise à approfondir notre compréhension de l'encapsulation des huiles essentielles par des nanoparticules et à proposer des solutions innovantes pour améliorer leur utilisation thérapeutique.

Cette thèse est structurée en deux parties distinctes. La première partie, consacrée à la revue bibliographique, est composée de quatre chapitres. Le premier chapitre offre une introduction générale sur la nanotechnologie, en présentant ses principes fondamentaux, ses applications et son importance dans le domaine médical. Le deuxième chapitre se concentre sur les nanoparticules, en explorant leurs différentes propriétés, méthodes de synthèse, caractérisation et applications. Le troisième chapitre est dédié aux nanoparticules polymériques, mettant en évidence leurs avantages et leurs applications spécifiques. Enfin, le quatrième chapitre se concentre sur les huiles essentielles, en mettant l'accent sur l'huile de romarin, ses propriétés, ses composants actifs et ses utilisations thérapeutiques.

La deuxième partie de cette thèse est dédiée à la partie pratique et est composée de trois chapitres. Le premier chapitre présente en détail le matériel, les méthodes et les équipements utilisés dans cette étude. Dans ce même chapitre, nous détaillons également les expériences *in vitro* pour évaluer les activités thérapeutiques de l'huile essentielle de romarin. De plus, nous abordons la formulation des nanoparticules de chitosane et d'alginate associé à son copolymère encapsulant l'huile de romarin et l'évaluation de leurs activités *in vivo*. Nous entamerons ensuite la caractérisation physicochimique. Nous y décrivons en détail les différentes analyses physicochimiques réalisées pour caractériser nos formulations. Cette caractérisation approfondie nous permet de mieux comprendre les propriétés structurales et physicochimiques de nos échantillons.

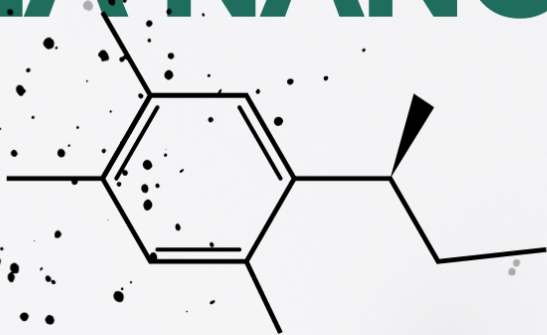
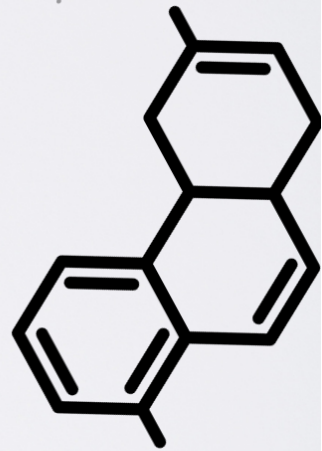
Le deuxième chapitre de la partie pratique est consacré à la présentation des résultats et à leur discussion. Nous y exposons les différents résultats obtenus à partir des expériences réalisées, des formulations développées et de la caractérisation physicochimique effectuée. Nous analysons également ces résultats, discutons de leur signification et de leurs implications dans le contexte de notre recherche.

En somme, cette thèse se clôture par une conclusion générale qui récapitule les principaux résultats obtenus et les contributions significatives de cette recherche. Des perspectives prometteuses sont également proposées pour orienter les travaux futurs dans ce domaine.

CHAPITRE 01

MONDE DE

LA NANOTECHNOLOGIE



I - Généralités sur la nanotechnologie :

I.1 - Définition de la nanotechnologie :

La nanotechnologie est un domaine révolutionnaire de la science et de la technologie qui opère à l'échelle nanométrique, généralement comprise entre 1 et 100 nanomètres. Elle englobe l'étude et la manipulation d'atomes et de molécules individuels, ouvrant de vastes possibilités de progrès dans diverses disciplines telles que la chimie, la biologie, la physique et l'ingénierie. Des vitraux anciens aux applications modernes, la nanotechnologie continue de façonner notre monde avec ses possibilités infinies d'innovation et de progrès (6).

Le tableau ci-dessous présente une synthèse des diverses définitions de la nanotechnologie issues de plusieurs sources :

Tableau 1 : Les différentes facettes de la nanotechnologie : une revue des définitions les plus répandues

Référence	Définition	Source
National Nanotechnology Initiative (NNI)	La nanotechnologie est une science, une ingénierie et une technologie menée à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire entre 1 et 100 nm.	(7)
Nanotechnology: Molecular Speculations on Global Abundance	La nanotechnologie est l'art et la science de construire des dispositifs complexes et pratiques avec une précision atomique.	(8)
Foresight Institute	Structures, dispositifs et systèmes ayant des propriétés et des fonctions nouvelles en raison de l'agencement de leurs atomes à l'échelle de 1 à 100 nm.	(9)
European Nanotechnology Gateway	Science et technologie de structures faites de matériaux ou de composites de matériaux inorganiques et organiques où au moins une dimension est inférieure à 100 nm.	(10)
Oxford Concise Medical Dictionary	Une branche de la science axée sur la matière de 100 nm ou moins.	(11)

I.2 - Histoire et origine de la nanotechnologie :

Le nom "nanotechnologie" est dérivé du mot grec "nanos", qui signifie "nain", et se réfère à l'échelle de la technologie, au fait que ça implique la manipulation et le contrôle de la matière à une échelle de un à cent nanomètres. Le préfixe "nano" est souvent utilisé pour décrire les mesures à l'échelle nanométrique (12).

Le terme "nanotechnologie" a été choisi pour refléter l'idée que cette technologie permettrait aux scientifiques et aux ingénieurs de manipuler et de contrôler la matière à une échelle beaucoup plus petite qu'auparavant.

- Les origines de la nanotechnologie peuvent être retracées aux années **1950** et **1960**, avec le développement de la physique du solide. En 1958, le physicien Richard Feynman a donné une conférence intitulée " There's Plenty of Room at the Bottom ", dans laquelle il a discuté la possibilité de manipuler des atomes et des molécules individuels pour créer de nouveaux matériaux. Cette idée a posé les fondements pour le domaine de la nanotechnologie (13).
- En **1974** Norio Taniguchi, un ingénieur japonais, utilise pour la première fois le terme "nanotechnologie" décrivant les techniques de manipulation d'objets à l'échelle nanométrique (14).
- K. Eric Drexler publie le livre " The Coming Era of Nanotechnology" en **1986**, qui popularise l'idée de la fabrication d'objets à l'échelle nanométrique, le livre explore l'impact potentiel de la nanotechnologie sur divers domaines tels que la médecine (15).
- Le Congrès des États-Unis crée le National Nanotechnology Initiative (NNI) en **2000**, qui vise à promouvoir la recherche en nanotechnologie (16).
- En **2023**, le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique en Algérie annonce la création d'une école nationale spécialisée dans les nanotechnologies.

Et depuis ce jour, la recherche en nanotechnologie n'a cessé de se développer et a considérablement progressé dans de nombreux domaines.

I.3 - Avancées de la nanotechnologie :

La nanotechnologie est un domaine de recherche interdisciplinaire qui vise à manipuler et à contrôler la matière à l'échelle nanométrique. Elle permet la création de nouveaux matériaux et dispositifs avec des propriétés uniques, ainsi que la révolution de nombreux secteurs industriels. Depuis ces dernières années, la nanotechnologie est de plus en plus exploitée pour des applications concrètes. Les domaines d'application de la nanotechnologie sont nombreux et variés, parmi eux le domaine de la :

- **Médecine** : la nanotechnologie est utilisée pour développer de nouvelles méthodes de diagnostic et de traitement, notamment en utilisant des NPs pour cibler des cellules ou des tissus spécifiques dans le corps. Les nanoparticules sont utilisées pour améliorer la distribution et la disponibilité des médicaments dans le corps, pour réduire les effets secondaires et pour améliorer l'efficacité thérapeutique. Le domaine de la nanotechnologie a déjà élargi les outils médicaux, les connaissances et les thérapies actuellement disponibles pour les prestataires de soins de santé. La nanomédecine, qui consiste à appliquer la nanotechnologie à la médecine, tire parti de l'échelle naturelle des phénomènes biologiques pour créer des solutions précises pour la prévention, le diagnostic et le traitement des maladies (17).

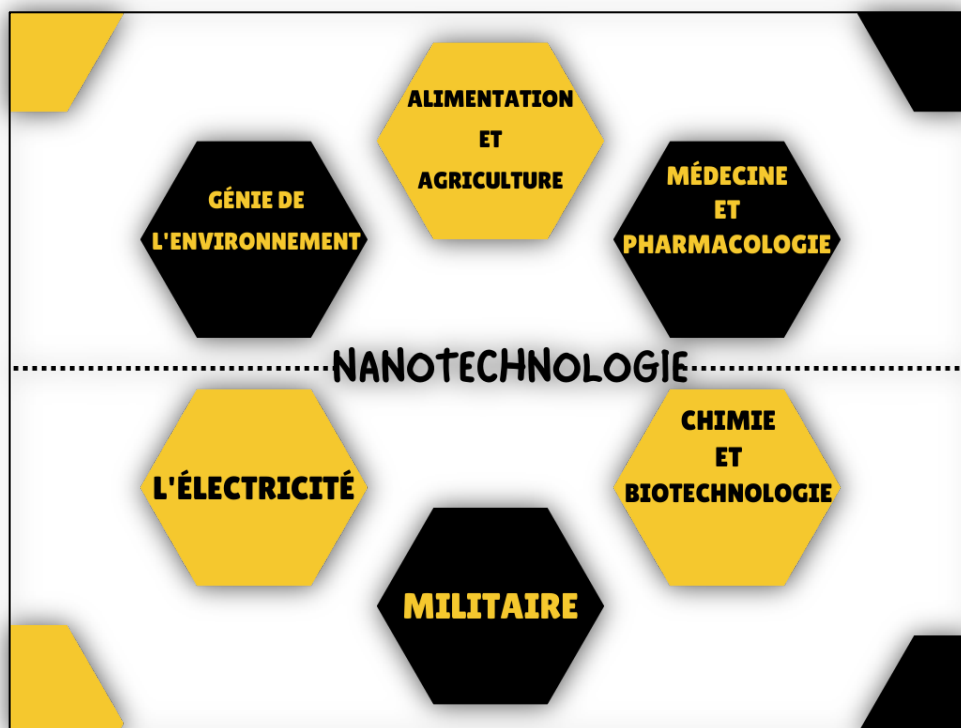


Figure 1 : Schéma démontrant les différents domaines d'applications de la nanotechnologie

II - Nanomédecine :

II.1 - Introduction à la nanomédecine :

La nanomédecine est un domaine en plein essor de la recherche qui utilise les avancées en nanotechnologie pour développer de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques pour la médecine. Les nanomatériaux, comme les nanoparticules, les liposomes et les dendrimères, sont utilisés pour améliorer la capacité des médicaments à atteindre les cellules cibles, augmenter leur efficacité et réduire les effets secondaires, réguler les interactions moléculaires et détecter les changements moléculaires de manière sensible à haut débit (19).

La nanotechnologie a apporté de nombreuses nouvelles possibilités pour la découverte biologique et la pratique clinique.

La nanomédecine peut être défini de manière générale comme étant la surveillance globale, la réparation et l'amélioration de tous les systèmes biologiques humains, en travaillant au niveau moléculaire à l'aide d'appareils et de nanostructures conçus pour obtenir des bénéfices médicaux (20). Elle s'appuie sur une gamme de disciplines larges, notamment la nanoscience, la physique, la science des matériaux, l'immunologie, la biologie moléculaire, la pharmacologie, la pharmacie et la médecine, pour atteindre ses objectifs (21).

II.2 - Applications de la nanomédecine :

La nanomédecine est un domaine interdisciplinaire où la nanoscience ou bien la nanotechnologie interagit avec les sciences de la vie, Il est attendu à ce qu'elle implique tous les aspects de la médecine. La nanomédecine est un domaine qui utilise la nanotechnologie pour diagnostiquer, traiter et prévenir les maladies. Cela inclut l'utilisation de nanoparticules pour l'administration des médicaments, le développement d'outils de diagnostic et l'utilisation de nanorobots pour la chirurgie et d'autres procédures médicales. L'objectif de la nanomédecine est d'améliorer l'efficacité, la spécificité et la sécurité des traitements médicaux tout en réduisant leur coût (22).

Les champs d'application de la nanomédecine sont variés et les avancées dans ce domaine promettent de révolutionner la médecine en permettant des traitements plus ciblés, et moins invasifs. Pour cela nous explorerons par la suite les différents domaines d'utilisation de la nanomédecine qui ont un impact sur la médecine moderne :

a) Vectorisation des médicaments : Les médicaments à faible solubilité posent de nombreux problèmes en vue de leur administration, tels qu'une biodisponibilité limitée après une prise par voie orale. Cependant il est notamment possible de surmonter ces limitations grâce à l'utilisation des approches de la nanotechnologie dans le mécanisme d'administration de médicaments (4). L'utilisation de nanoparticules pour une administration ciblée et spécifique de médicaments demeure très prometteuse. Les nanoparticules ont été initialement développées comme des vecteurs pour les vaccins (23) et les médicaments anticancéreux (24). En raison de leur petite taille, elles ont une grande surface qui peut augmenter la solubilité des médicaments, ce qui entraîne une meilleure biodisponibilité. De plus, la petite taille des nanoparticules leur permet de traverser la barrière hémato-encéphalique, d'accéder au système pulmonaire et d'être absorbées à travers les jonctions serrées des cellules endothéliales de la peau, permettant ainsi une administration ciblée et efficace des médicaments dans des zones spécifiques du corps (25).

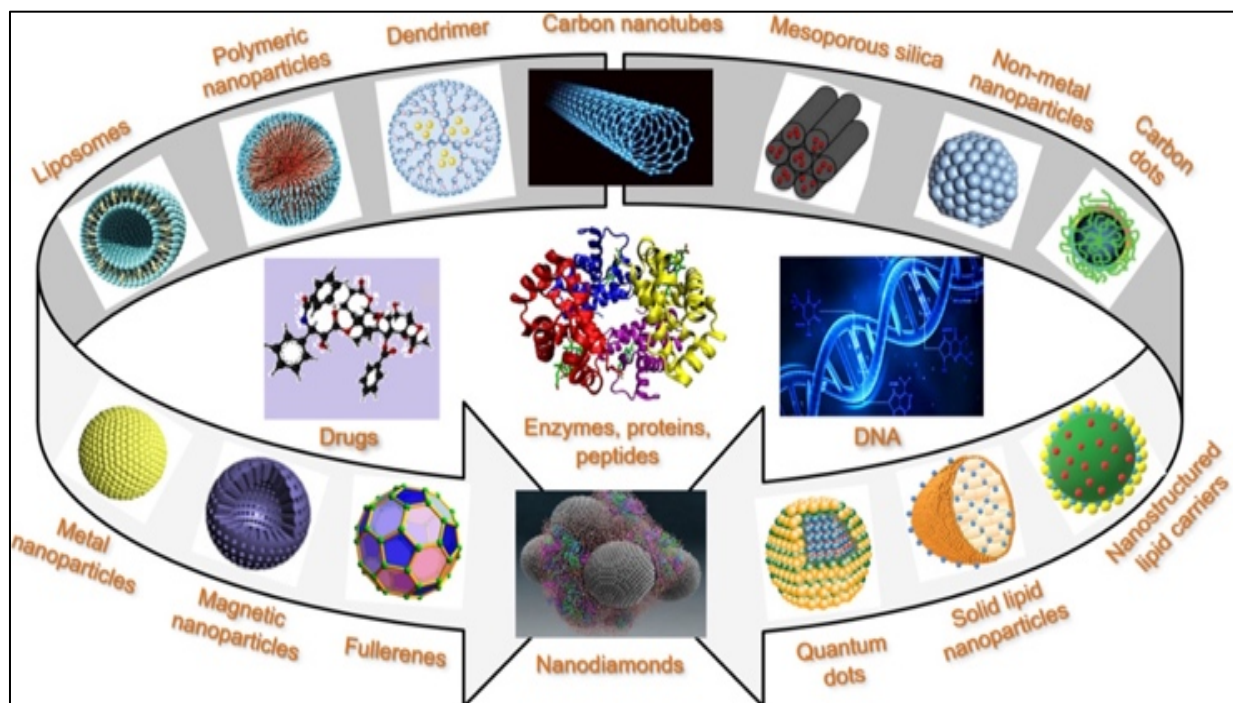


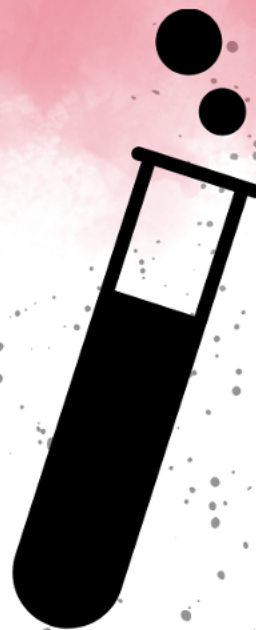
Figure 2 : Conception de systèmes colloïdaux pour le transport de molécules variées (26)

b) Diagnostic : Les nanoparticules possèdent le potentiel d'améliorer la détection et le diagnostic des maladies. En étant capables de fournir un contraste dans la zone d'intérêt, les nanoparticules intelligentes peuvent rapporter des informations sur l'environnement local après avoir été administrées dans le corps. Ces informations peuvent aider à imager les structures fines des organes et à étiqueter les tissus avec des marqueurs spécifiques. De plus, les nanoparticules peuvent être utilisées pour analyser les concentrations de molécules d'intérêt, permettant une analyse directe des maladies à l'intérieur du corps humain. En outre, elles sont des composants clés de machines de diagnostic à haut débit qui peuvent analyser des échantillons tels que le sang et les tissus en dehors du corps, permettant la détection rapide de marqueurs biologiques et de modifications moléculaires. La capacité à analyser simultanément plusieurs biomarqueurs peut améliorer la précision diagnostique (22).

c) Septicémie : La recherche sur l'utilisation de la nanotechnologie pour faire face aux perturbations importantes causées par la septicémie est en cours, explorant diverses possibilités, plusieurs NPs ont été étudiées pour permettre le diagnostic des infections microbiennes liées à la septicémie, telles que les NPs magnétiques les NPs d'or les NPs fluorescentes (silice et points quantiques) et les NPs à base de lipides (27).

Les NPs sont particulièrement attractifs pour le diagnostic de la septicémie en raison de leurs propriétés uniques, telles que la taille, la forme, la chimie de surface, la charge et la composition, qui peuvent être ajustées pour permettre une liaison ciblée et sélective (28).

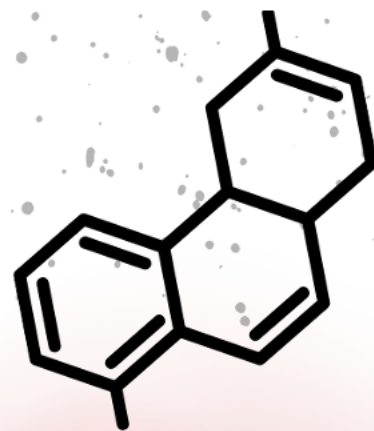
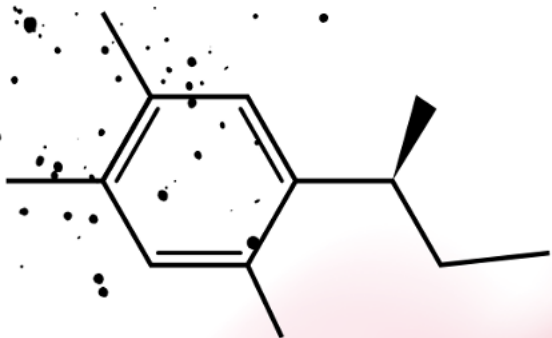
L'utilisation de nanoparticules pour délivrer des agents antimicrobiens a été efficace pour résoudre les problèmes de mauvaise pharmacocinétique et de toxicité. Les NPs peuvent être conçues pour avoir une meilleure solubilité, biocompatibilité et profils pharmacocinétiques. De plus, les NPs peuvent être fonctionnalisées avec des molécules biologiques qui permettent une administration ciblée d'antibiotiques. De plus, les nanoparticules peuvent prolonger le temps de circulation des médicaments et leur demi-vie, et également fournir une libération prolongée des médicaments, améliorant ainsi leur efficacité thérapeutique tout en réduisant la toxicité (29).



CHAPITRE 02



NANOPARTICULES



I - Nanoparticules :

I.1 - Définition des nanoparticules :

Une nanoparticule fait référence à une minuscule particule dont la taille varie de 1 à 100 nanomètres. Ces particules sont si petites qu'elles ne peuvent pas être détectées à l'œil nu, elles sont plus petites que les objets de la vie courante, mais plus grandes que les atomes ou les molécules ce qui les rend soumises à des lois différentes de celles de la physique classique. Selon la définition fournie par la Commission européenne, au moins la moitié des particules dans la distribution de taille numérique doivent avoir une taille de 100 nm ou moins. En fait, la plupart des nanoparticules ne sont constituées que de quelques centaines d'atomes, ce qui met en évidence leur échelle incroyablement petite et leurs caractéristiques uniques (30).

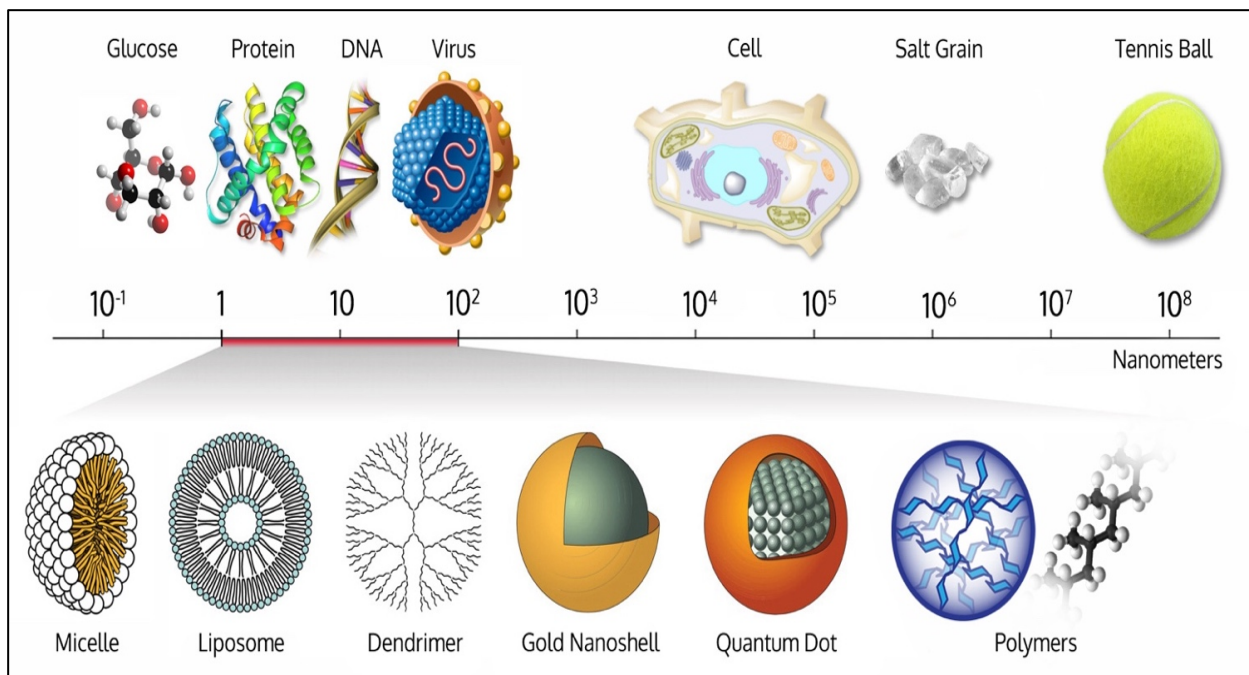


Figure 3 : Comparaison de différentes tailles d'objets par rapport à l'échelle nanométrique (31)

I.2 - Classification des nanoparticules :

La classification des nanoparticules est une étape cruciale pour comprendre leurs propriétés et leurs applications potentielles. Il existe plusieurs façons de catégoriser les nanoparticules, chacune avec ses avantages et ses limites.

D'abord, les nanoparticules sont généralement regroupées en trois catégories en fonction de leur composition : organiques, inorganiques et à base de carbone (32, 33).

a) Nanoparticules organiques :

Les nanoparticules organiques, sont couramment utilisées dans le domaine biomédical en raison de leurs propriétés uniques. Ils sont biodégradables, non toxiques et certains, comme les micelles et les liposomes, ont un noyau creux, ce qui les rend sensibles aux rayonnements thermiques et électromagnétiques, tels que la chaleur et la lumière. Ces caractéristiques en font un choix idéal pour les systèmes d'administration de médicaments. L'efficacité de ces NPs dans l'administration de médicaments est déterminée par des facteurs tels que leur capacité de transport de médicaments, leur stabilité et leur système d'administration, qu'il s'agisse de médicaments piégés ou de médicaments adsorbés. La taille, la composition, la morphologie de surface et d'autres caractéristiques jouent également un rôle dans la détermination du domaine d'application (32, 33).

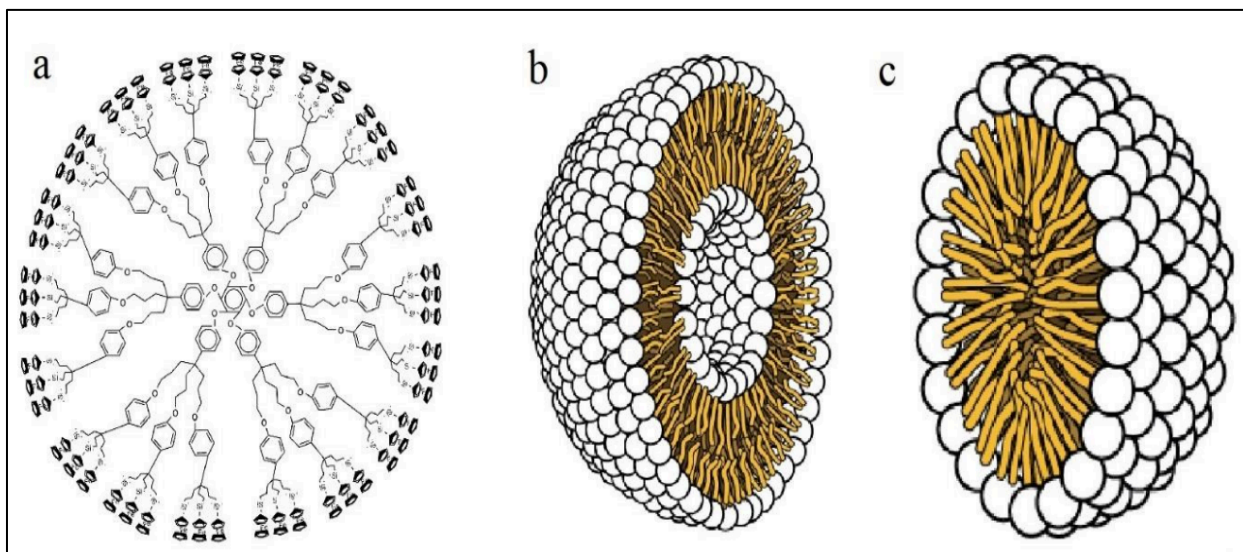


Figure 4 : Nanoparticules organiques : a – Dendrimères, b – Liposomes et c – Micelles (33)

On évoquera parmi les nanoparticules organiques ce qui suit :

- **Dendrimères** : Les dendrimères sont des nanostructures bien définies, stables et homogènes qui ont une structure tridimensionnelle et hautement ramifiée, ce qui permet des capacités fonctionnelles élevées. Les groupes fonctionnels qui peuvent être attachés aux branches globulaires ou semi-globulaires des dendrimères comprennent les glucides, les peptides et les groupes de silicium, entre autres (34).
- **Liposomes** : Les liposomes sont des vésicules, de taille nano ou micro, constituées d'une bicouche phospholipidique entourant un compartiment aqueux central. Ces vésicules utilisées pour administrer des médicaments, les médicaments hydrosolubles étant contenus dans le noyau et les médicaments hydrophobes étant piégés dans la couche lipidique (35).
- **Nanoparticules polymériques** : Les NPs à base de polymères sont composées de polymères naturels ou synthétiques, ce qui en fait un choix populaire en tant que systèmes colloïdaux. Ils offrent plusieurs avantages par rapport à d'autres options de nanovecteurs comme les liposomes, les micelles. Ils sont très stables dans les fluides biologiques, ont une grande variété de polymères parmi lesquels choisir et peuvent être facilement modifiés afin de contrôler la libération de la substance piégée en réponse à certains stimuli (36).

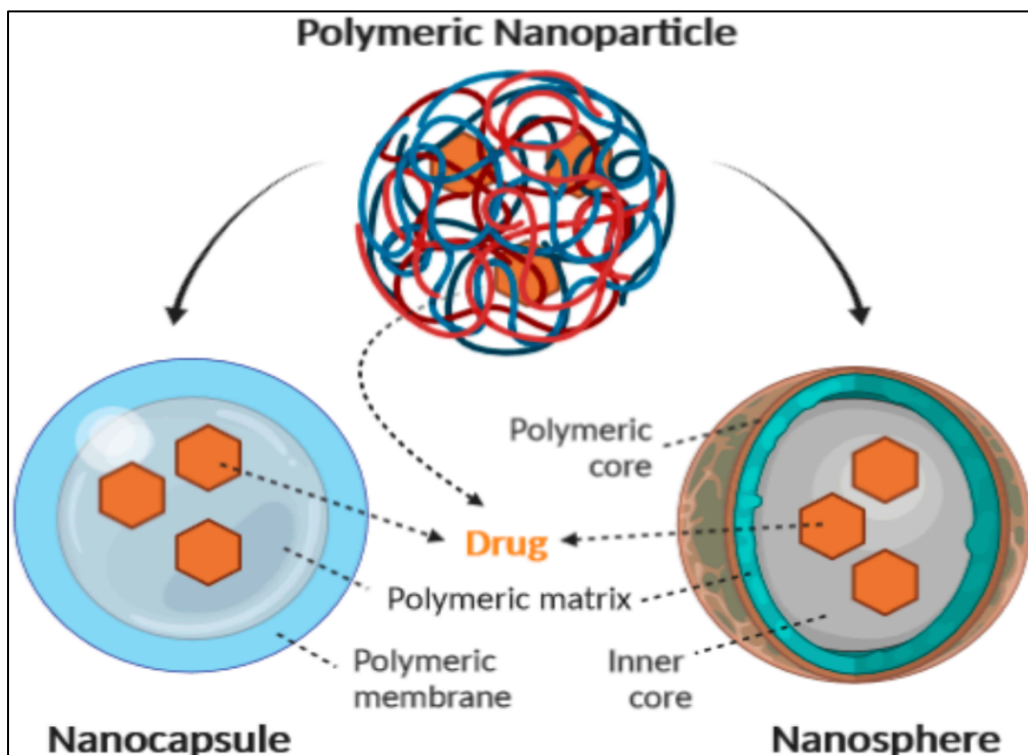


Figure 5 : Schéma illustrant la configuration des nanocapsules et nanosphères (37)

Les NPs polymériques ont été largement étudiées ces derniers temps en raison de leurs caractéristiques uniques, résultant de leur petite taille. Ils offrent de nombreux avantages en tant que vecteurs de médicaments, tels que la capacité de contrôler la libération de médicaments, de protéger les molécules actives de leur environnement, d'améliorer la biodisponibilité et d'améliorer les résultats thérapeutiques, les nanoparticules polymériques se sont révélées très prometteuses dans l'administration ciblée de médicaments pour le traitement de diverses maladies (37).

b) Nanoparticules inorganiques : Les nanoparticules inorganiques sont un type de NPs qui ne sont pas constituées de carbone. Ils sont divisés en deux grandes catégories : à base de métal et à base d'oxyde métallique. Les nanoparticules à base de métal peuvent être fabriquées à partir de divers métaux comme l'aluminium, l'argent, l'or. D'autre part, les nanoparticules à base d'oxydes métalliques sont fabriquées à partir d'oxydes métalliques et sont synthétisées pour modifier les propriétés de leurs homologues à base de métaux respectifs. Ils possèdent une réactivité et une efficacité accrues par rapport à leurs homologues métalliques (32, 33).

c) Nanoparticules à base de carbone : Les nanoparticules à base de carbone sont entièrement constituées de carbone et peuvent être classées en différents types, notamment les fullerènes, le graphène, les nanotubes de carbone, les nanofibres de carbone, le noir de carbone et le charbon actif de taille nanométrique (33).

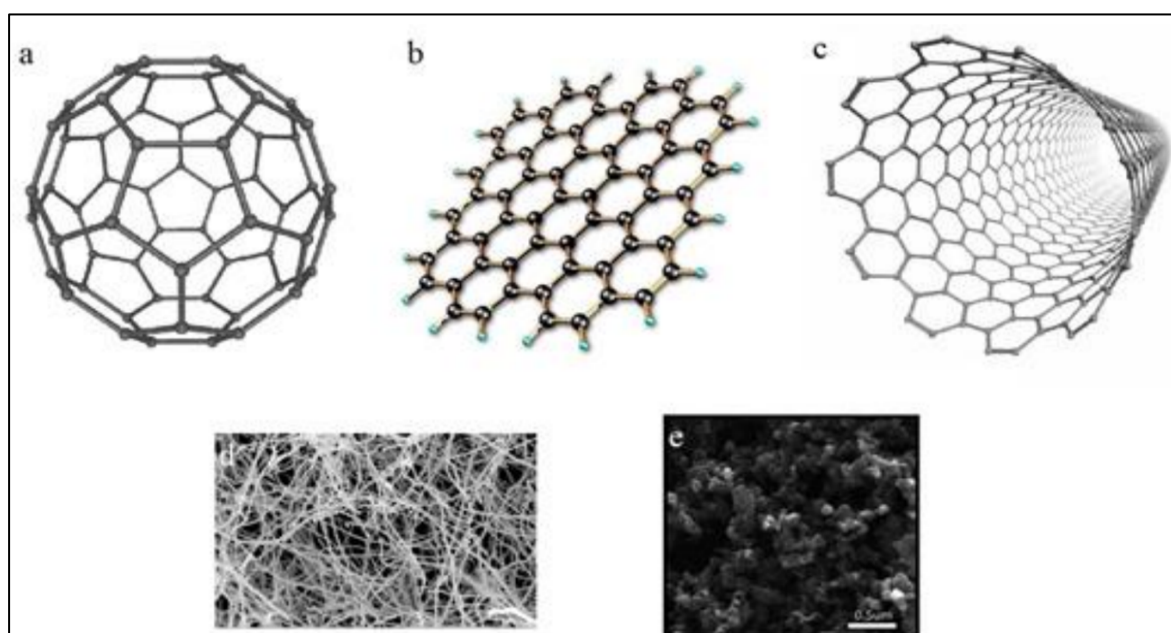


Figure 6 : Nanoparticules à base de carbone : a – Fullerènes, b – Graphène, c – Nanotubes de carbone, d – Carbone nanofibres, e - Noir de carbone (37)

1.3 - Synthèse des nanoparticules :

La synthèse de NPs peut être réalisée par deux méthodes principales : l'approche Top-down et l'approche Bottom-up. L'approche Top-down consiste à réduire la taille d'un matériau de départ par des moyens mécaniques ou chimiques, tandis que l'approche Bottom-up consiste à construire des structures atome par atome, molécule par molécule ou cluster par cluster. Les NPs sont d'abord formées puis assemblées dans le matériau final à l'aide de procédures chimiques ou biologiques. La lithographie peut être considérée comme une approche hybride car elle implique la croissance de couches minces par la méthode ascendante et la gravure par la méthode Top-down. Les deux méthodes ont leurs propres avantages et limites, et toutes deux jouent un rôle important dans la nanotechnologie (38).

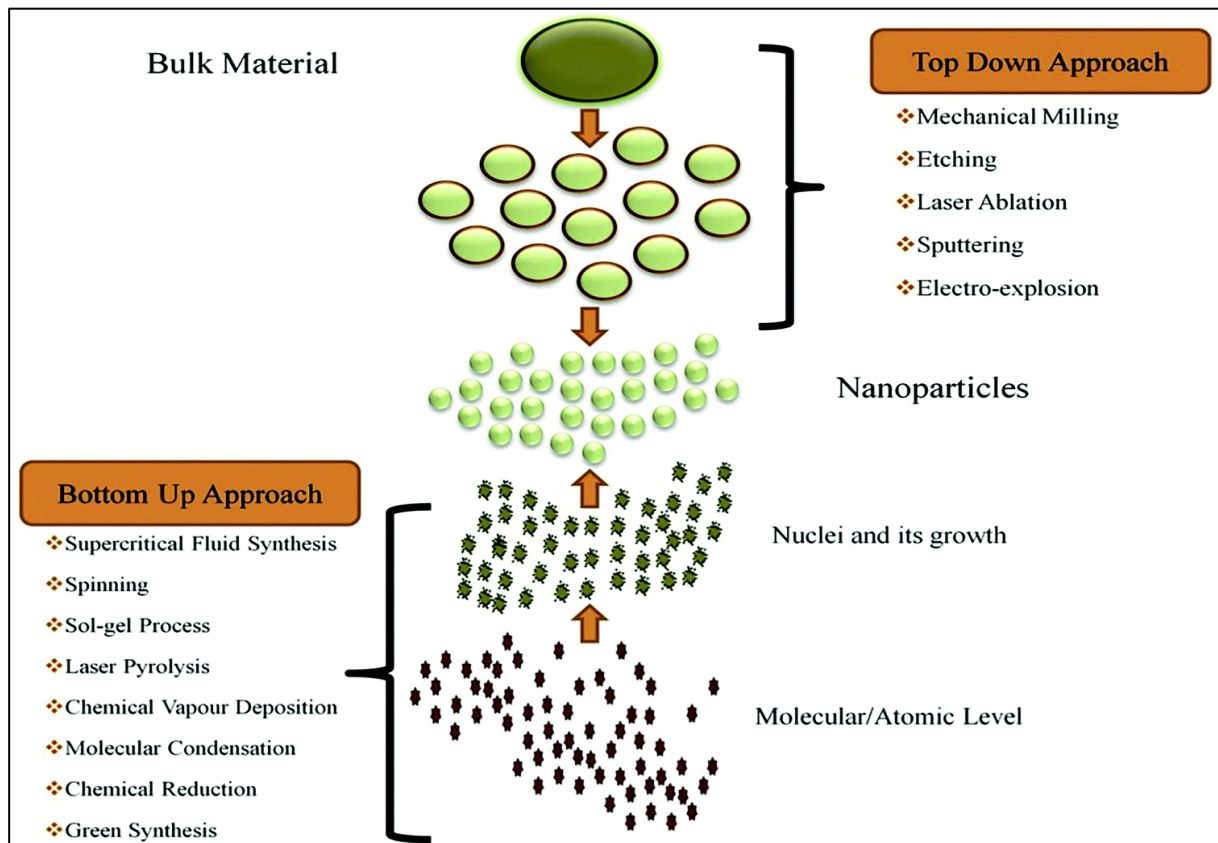


Figure 7 : Synthèse de nanoparticules via des approches top-down et bottom-up (39)

I.4 - Propriétés des nanoparticules :

Les nanoparticules sont des particules ayant au moins une dimension à l'échelle nanométrique. En raison de leur petite taille, les nanoparticules ont des propriétés uniques qui diffèrent de celles des matériaux massifs. Ces propriétés sont liées à leur rapport surface/volume élevé, qui peut affecter leur réactivité, leurs propriétés optiques, leur stabilité thermique, leurs propriétés magnétiques et un tas d'autres propriétés (40). La petite taille des NPs peut également leur permettre de traverser les membranes cellulaires et de pénétrer dans les cellules (41). Dans les points suivants, nous discuterons plus en détail des propriétés physicochimiques des NPs :

a) Propriétés mécaniques :

Les propriétés mécaniques font référence à la façon dont un matériau se comporte dans différentes conditions, environnements et forces externes. En raison de leur petite taille et de leur rapport surface/volume élevé, les nanoparticules possèdent des propriétés mécaniques exceptionnels. Ces propriétés, qui comprennent une résistance et une ductilité excellentes, sont le résultat des effets du volume, de la surface et la quantique des nanoparticules (42).

Les nanoparticules présentent des propriétés mécaniques différentes de celles des matériaux en vrac en raison des diverses forces d'interaction entre les nanoparticules ou entre elles et une surface. Ces forces comprennent les forces de van der Waals, les forces électrostatiques et électriques de la double couche, les forces capillaires normales et latérales, les forces de solvatation, structurelles et d'hydratation (43, 44).

b) Propriétés magnétiques :

Les nanoparticules magnétiques ont fait l'objet d'intenses recherches ces dernières années en raison de leurs propriétés uniques et de leurs applications potentielles dans un large éventail de domaines. Ces applications comprennent la catalyse hétérogène et homogène, la biomédecine, les fluides magnétiques, le stockage de données et la remédiation environnementale telle que la décontamination de l'eau (40).

c) Propriétés thermiques :

Les propriétés thermiques des nanoparticules se sont avérées d'une importance significative dans de nombreux domaines, en particulier dans le domaine du transfert de chaleur (40). La surface accrue des nanoparticules peut également entraîner une absorption accrue de chaleur, ce qui les rend utiles dans diverses applications telles que le traitement du cancer par hyperthermie. L'hyperthermie est un type de traitement du cancer dans lequel la température corporelle est élevée à un niveau toxique pour les cellules cancéreuses, sans nuire aux cellules saines. En utilisant des nanoparticules à grande surface, plus de chaleur peut être absorbée, ce qui peut augmenter l'efficacité du traitement (45).

d) Électronique et propriétés optiques :

Les nanoparticules ont des propriétés optiques et électroniques uniques étroitement liées. Par exemple, les nanoparticules de métal noble ont des propriétés optiques dépendant de la taille et présentent une forte bande d'extinction ultraviolet-visible qui n'est pas présente dans le spectre du métal en vrac. Cette bande, connue sous le nom de résonance plasma de surface localisée, résulte de l'excitation collective des électrons de conduction et se caractérise par une absorption sélective en longueur d'onde, un coefficient d'excitation molaire élevé et des champs électromagnétiques locaux améliorés près de la surface des nanoparticules (40).

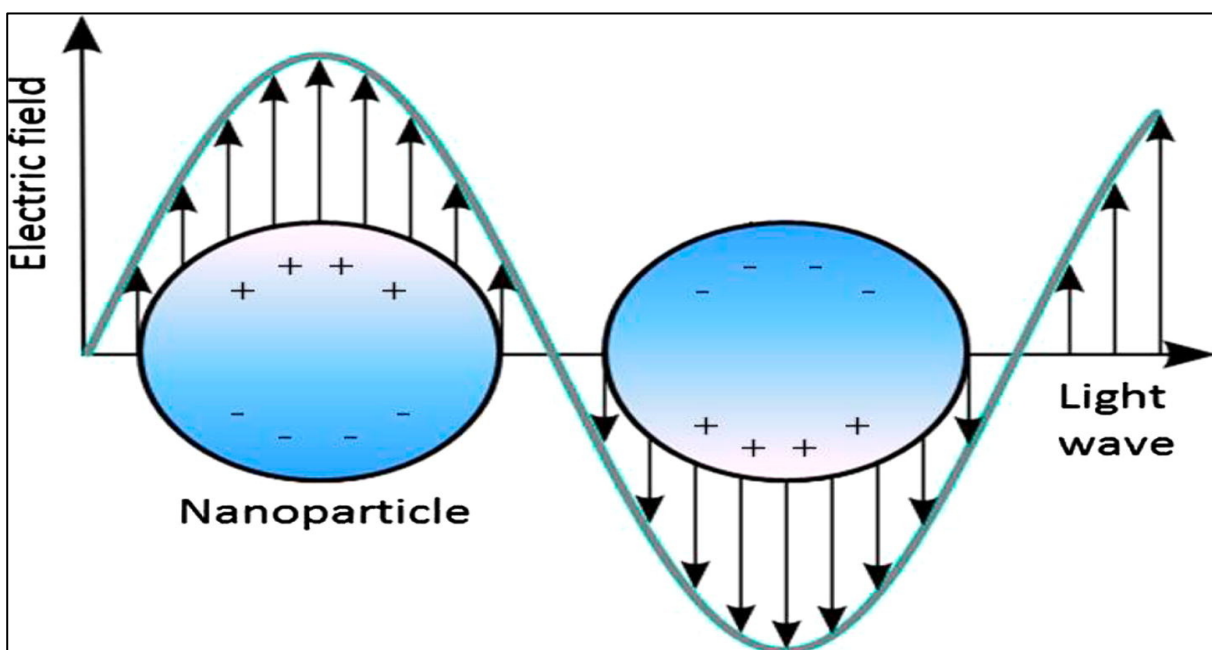


Figure 8 : L'interaction du champ électrique de la lumière incidente avec les électrons libres (46)

I.5 - Caractérisation des nanoparticules :

La caractérisation des NPs est cruciale pour comprendre leurs propriétés, leur comportement et leurs applications potentielles. Le processus de caractérisation fournit des informations sur divers aspects des nanoparticules, notamment la taille, la forme, la composition, la surface et la distribution. En acquérant ces connaissances, les chercheurs peuvent prendre des décisions éclairées sur la pertinence d'un type particulier de nanoparticules pour une application spécifique et apporter les modifications nécessaires pour améliorer les performances.

a) Caractérisation de la taille des nanoparticules :

Caractériser la taille des nanoparticules est une étape initiale critique dans le processus de caractérisation. Ce paramètre joue un rôle important dans la détermination de l'application potentielle de ces minuscules particules et, par conséquent, il est impératif de collecter ces informations de base avec précision et efficacité, on utilise pour cela :

- **Diffusion dynamique de la lumière :** La diffusion dynamique de la lumière (DLS) est une technique optique qui mesure la taille des particules en suspension en analysant leur mouvement brownien et la corrélation de leur coefficient de diffusion avec la taille. Un dispositif DLS typique consiste en une source laser polarisée à une longueur d'onde connue (typiquement 633 nm), qui éclaire l'échantillon contenant les nanoparticules à mesurer (47).

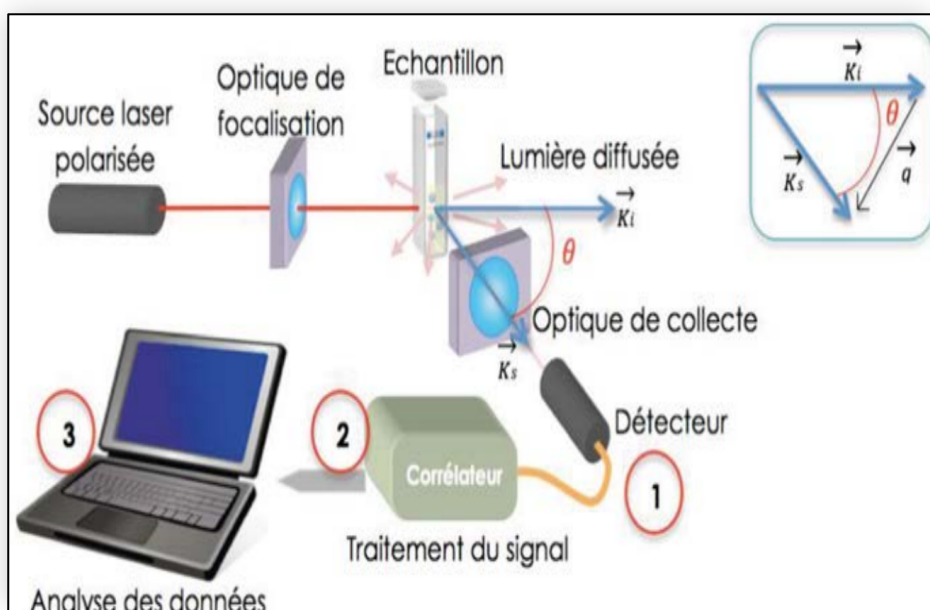


Figure 9 : Schéma du principe de la DLS « classique » (47)

b) Caractérisation de la morphologie des nanoparticules :

L'apparence physique d'une particule, y compris sa forme structurale globale et sa topographie de surface, est appelée sa morphologie. Cet aspect du comportement des nanoparticules est important car il a un impact sur sa dispersion, son efficacité dans l'exécution de sa fonction prévue et sa toxicité potentielle (48).

Il existe plusieurs techniques pouvant être utilisées pour caractériser la forme des nanoparticules, chacune avec ses propres avantages et limites :

▪ Microscopie électronique en transmission (TEM) :

La microscopie électronique en transmission est une technique d'imagerie puissante qui a été largement utilisée dans le domaine de la recherche nano médicale. Cela implique l'utilisation d'un faisceau d'électrons qui sont transmis à travers un échantillon mince pour générer des images, ce qui permet une visualisation détaillée de l'intérieur de l'échantillon (49).

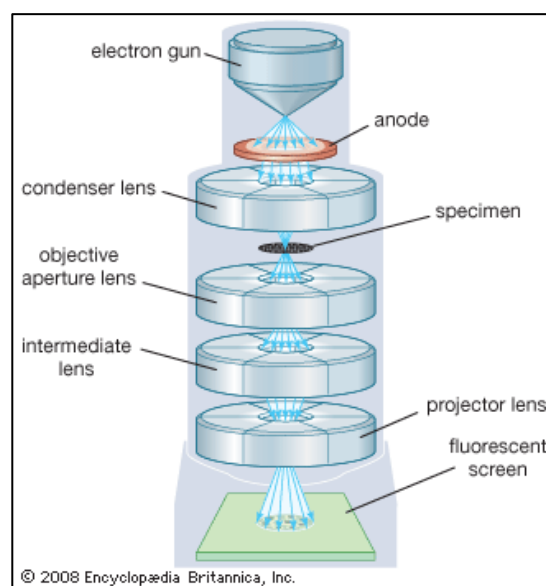


Figure 10 : Schéma illustrant le TEM (50)

- **Microscope électronique à balayage :** connu aussi par le MEB, c'est un outil couramment utilisé pour caractériser la taille et la forme des nanoparticules. L'image du MEB est créée par les électrons secondaires et/ou les électrons rétrodiffusés qui sont produits lorsque l'échantillon est bombardé par un faisceau d'électrons primaire. Ces dernières années, le MEB a réussi à faire un grand succès, notamment dans l'analyse des nanoparticules, en raison de son excellente résolution spatiale supérieure à 1 nm (51).

c) Caractérisation de la charge de la surface :

La mesure du potentiel zêta est une méthode utilisée pour déterminer la charge de surface des nanoparticules dans une solution colloïdale. Elle est basée sur l'observation que les nanoparticules ont une charge à leur surface qui attire une fine couche de contre-ions, créant une double couche d'ions qui se déplace avec la particule lors de sa diffusion. Le potentiel électrique à la frontière de cette double couche est appelé potentiel zêta, qui a des valeurs allant typiquement de +100 à -100 mV. L'amplitude du potentiel zêta est un prédicteur de la stabilité colloïdale de la solution, les particules ayant des valeurs de potentiel zêtas supérieurs à +30 mV ou inférieures à -30 mV possèdent des degrés élevés de stabilité. Les dispersions avec des valeurs de potentiel zêtas inférieurs à +25 mV ou supérieures à -25 mV finiront par s'agglomérer en raison de diverses interactions interparticulaires. L'analyse du potentiel zêta est important pour comprendre la surface de la nanoparticule et prédire sa stabilité dans une solution. Le potentiel zêta peut être mesuré par un zêta sizer (52).

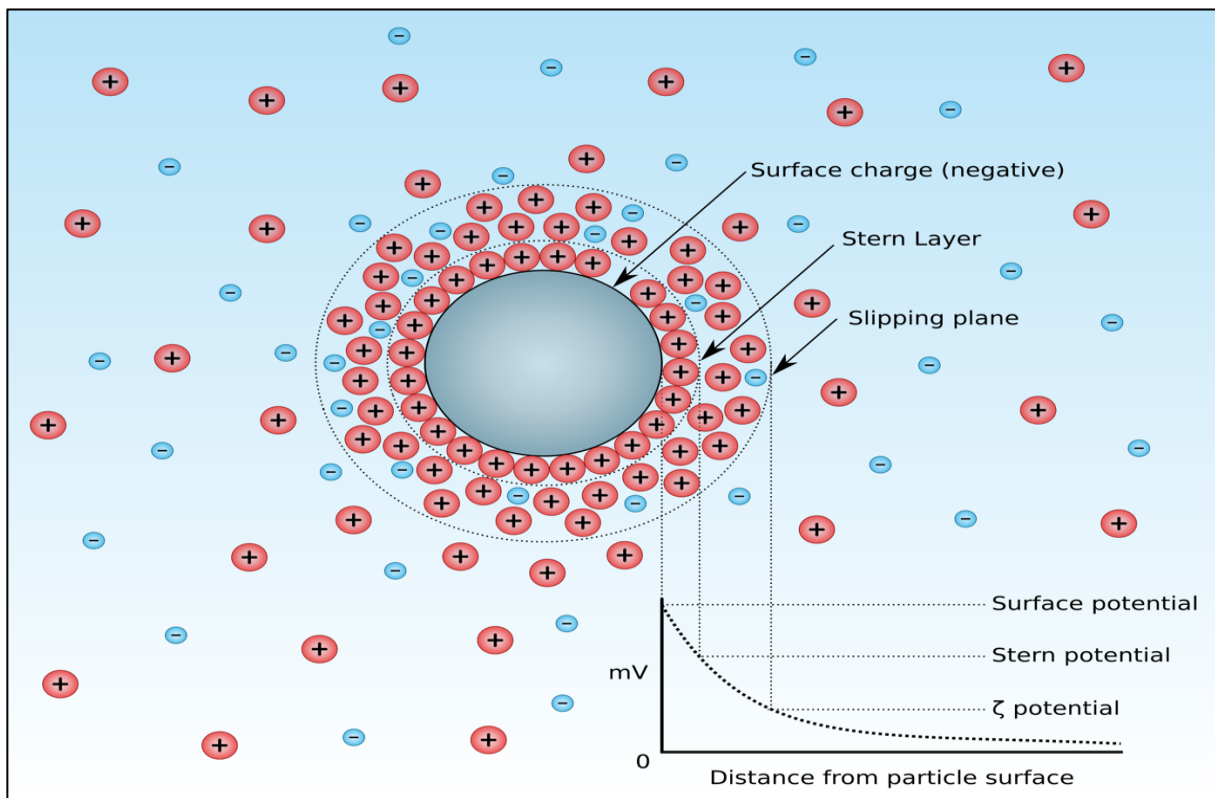


Figure 11 : Diagramme la concentration ionique et la différence de potentiel en fonction de la distance à la surface chargée d'une particule en suspension dans un milieu de dispersion (53)

d) Caractérisation des propriétés optiques des nanoparticules :

Pour caractériser les propriétés optiques des matériaux à l'échelle nanométrique, il est possible d'utiliser la spectroscopie UV-Vis qui est une méthode simple et économique. La technique fonctionne en mesurant l'intensité de la lumière réfléchie par un échantillon et en la comparant à l'intensité de la lumière réfléchie par un matériau de référence. Les propriétés optiques uniques des NPs, qui sont sensibles à des facteurs tels que la taille, la forme, la concentration, l'état d'agglomération et l'indice de réfraction près de la surface des NP, font de la spectroscopie UV-Vis un outil essentiel pour identifier, caractériser et étudier ces petites particules de taille nanométrique (54).

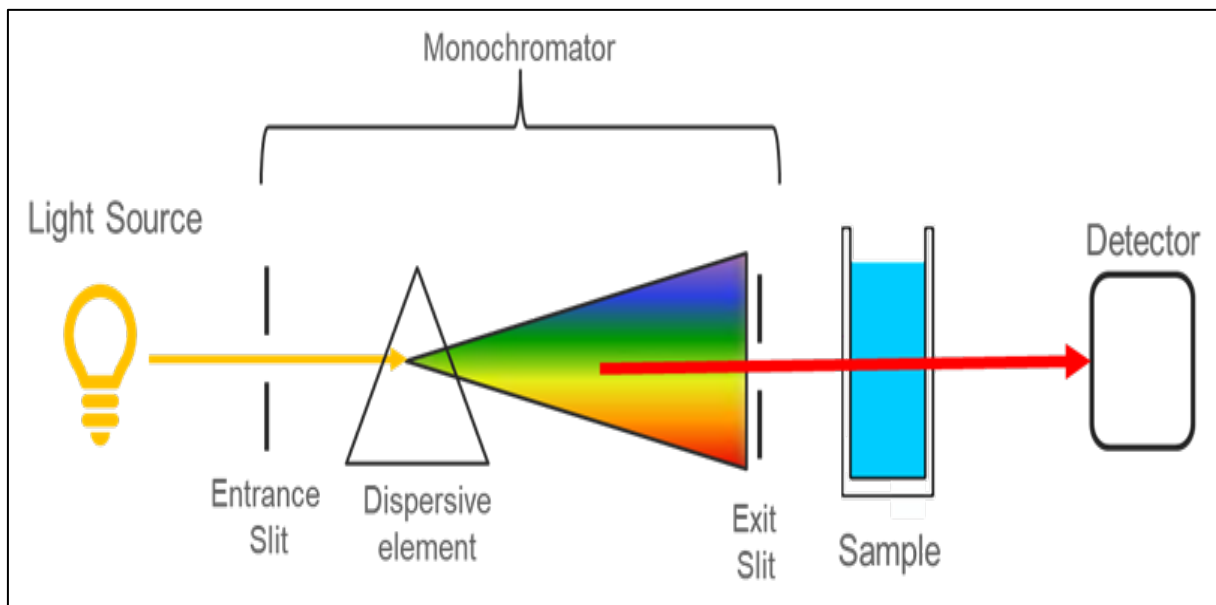


Figure 12 : Schéma illustrant le principe de la spectroscopie UV-Vis (55)

e) Caractérisation des groupements chimiques et fonctionnels :

Le FTIR (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) est une méthode très utile pour la caractérisation des nanoparticules. Avec les bonnes conditions, le FTIR peut déterminer la composition chimique de la surface de la nanoparticule, ainsi qu'identifier les sites réactifs sur la surface qui contribuent à sa réactivité. Le spectre FTIR est constitué de pics d'absorption qui reflètent la fréquence des vibrations entre les liaisons des atomes dans la nanoparticule (56).

Pour résumer voici les différents paramètres nécessaires à déterminer concernant les nanoparticules et techniques de caractérisation correspondantes (54):

Tableau 2 : Tableau résumant les caractéristiques et méthodes de caractérisation des NPs

Caractéristique	Technique de caractérisation
Taille	TEM, XRD, DLS, NTA, SAXS, HRTEM, SEM, AFM, EXAFS, FMR, DCS, ICP-MS, UV-Vis, MALDI, NMR, TRPS, EPLS
Forme	TEM, HRTEM, AFM, EPLS, FMR, 3D-tomography
Structure cristalline	XRD, EXAFS, HRTEM, Diffraction des électrons, STEM
Propriétés optiques	UV-Vis-NIR, PL, EELS-STEM
Charge de la surface	Potentiel zêta, EPM
Densité	DCS, RMM-MEMS
Liaison ligand/ Composition/Densité/ Arrangement/Masse/ Composition de surface	XPS, FTIR, NMR, SIMS, FMR, TGA, SANS

MET : Microscopie Électronique à Transmission, **XRD** : diffraction des rayons X, **DLS** : diffusion dynamique de la lumière, **NTA** : analyse de suivi des nanoparticules, **SAXS** : diffusion des rayons X aux petits angles, **HRTEM** : Microscopie Électronique à Transmission Haute Résolution, **MEB** : Microscopie Électronique à Balayage, **AFM** : Microscopie à Force Atomique, **EXAFS** : structure fine d'absorption étendue des rayons X, **FMR** : résonance ferromagnétique, **DCS** : Spectroscopie Classificatrice Diffusive, **ICP-MS** : spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif, **UV-Vis** : Spectroscopie Ultraviolet-Visible, **MALDI** : Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice, **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire, **TRPS** : spectroscopie de photoluminescence résolue en temps, **EPLS** : Spectroscopie de Résonance Paramagnétique Électronique, **XPS** : spectroscopie photo électronique à rayons X, **FTIR** : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, **RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire, **SIMS** : spectrométrie de masse d'ions secondaires, **FMR** : résonance ferromagnétique, **TGA** : Analyse Thermogravimétrique, **SANS** : diffusion de neutrons aux petits angles, **EPM** : Mesure Électroacoustique des Particules, **STEM** : Microscopie Électronique à Transmission à Balayage, **EELS-STEM** : Spectroscopie de perte d'énergie électronique dans le STEM, **PL** : photoluminescence, **UV-Vis-NIR** : Spectroscopie Ultraviolet-Visible-Proche Infrarouge, **RMM-MEMS** : Systèmes Micromécaniques Résonnants

I.6 - Réglementation des nanoparticules dans le domaine médical :

L'utilisation des nanoparticules en biomédecine a connu une croissance significative au cours de la dernière décennie avec divers systèmes de nanoparticules utilisés dans le cadre clinique. Malgré l'engouement dans le domaine de la nanomédecine et son impact potentiel sur l'industrie pharmaceutique, il y a un manque d'orientation réglementaire et de cohérence dans la définition des nanoparticules. Cela a semé la confusion parmi les fabricants, les prestataires de soins de santé et le public (57).

▪ Réglementation européenne :

Dans l'Union européenne, des progrès significatifs ont été réalisés en matière de réglementation des nanotechnologies, y compris des nanoparticules. Des groupes de travail et des consortiums ont été créés pour définir la signification des nanomatériaux et fournir des recommandations pour l'alimentation, l'environnement et la santé. Les projets EU-NCL (European Nanomedicine Characterization Laboratory) et REFINE ont été financés par le gouvernement pour contribuer à l'avancement du domaine. Contrairement au Royaume-Uni, l'Agence européenne des médicaments (EMA) a publié des lignes directrices préliminaires pour les normes de préparation des nanoparticules, mais elles sont encore au stade de la consultation publique et aucune réglementation formelle n'a encore été mise en place (57).

▪ Réglementation Américaine :

La FDA réglemente les nanoparticules, en utilisant les autorités statutaires et réglementaires en vigueur et les normes spécifiques aux produits sous sa juridiction. La FDA a publié des directives sur les nanomatériaux dans les aliments, les cosmétiques et les aliments pour animaux. En 2017, la FDA a produit un projet de directives pour les produits pharmaceutiques contenant des nanomatériaux, et chaque nanotechnologie est évaluée au cas par cas. La FDA évalue les produits de nanomédecine d'une manière spécifique au produit, et les fabricants sont encouragés à consulter la FDA lors du développement de leurs produits dans le domaine de la nanotechnologie (57).



CHAPITRE 03



NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES



I - Généralités sur les nanoparticules polymériques :

I.1 - Définition :

Les NPs polymériques sont de petites particules dont la taille varie de 1 à 1000 nm qui peuvent être conçues pour transporter des composés actifs soit en étant piégées à l'intérieur, soit en adhérant au noyau polymère. Le terme «nanoparticule polymérique» englobe à la fois les nanocapsules et les nanosphères, qui diffèrent en fonction de leur forme et leur structure (37).

Les nanosphères sont des particules à base de matrice où le médicament est uniformément réparti, tandis que les nanocapsules sont constituées d'un noyau contenant le médicament, enfermé dans un revêtement polymère spécifique. Les nanocapsules servent d'unités de stockage de médicaments en raison de leur forme vésiculaire, où le médicament est logé dans un centre aqueux ou non aqueux entouré d'un revêtement polymère. D'autre part, les nanosphères sont simplement des boules sphériques de polymères avec le médicament dispersé dans la matrice polymère ou attaché à la surface (58).

I.2 - Distinction entre les nanocapsules et les nanosphères :

a) **Nanosphères** : les nanosphères polymériques, sont des particules solides d'un diamètre compris entre 100 et 200 nm qui peuvent être utilisées pour transporter des médicaments en les dissolvant, en les piégeant, en les encapsulant, en les liant chimiquement ou en les adsorbant sur une matrice polymère. Bien que la petite taille des nanosphères puisse ralentir leur élimination du corps, elles sont toujours éliminées par le système réticulo-endothélial (RES) et séquestrées dans des organes comme le foie et la rate en raison de leur surface hydrophobe. Afin de prolonger leur circulation, les surfaces des nanoparticules doivent être modifiées pour éviter la clairance par le RES (59).

b) Nanocapsules : Les nanocapsules sont des systèmes vésiculaires de taille nanométrique avec une structure noyau-coquille, dans lesquels le médicament est confiné dans un réservoir ou une cavité entourée d'une membrane ou d'un revêtement polymère. La cavité peut contenir le médicament sous forme liquide ou solide, ou sous forme de dispersion moléculaire, et peut être lipophile ou hydrophobe selon le procédé de préparation et les matériaux utilisés. Les nanocapsules peuvent également porter la substance active sur leurs surfaces ou à l'intérieur de la membrane polymérique (60).

On peut donc déduire que la principale distinction entre les nanocapsules et les nanosphères réside dans leur structure. En termes de taille, les nanocapsules comme les nanosphères ont des dimensions de l'ordre du nanomètre, typiquement entre 100 et 200 nm.

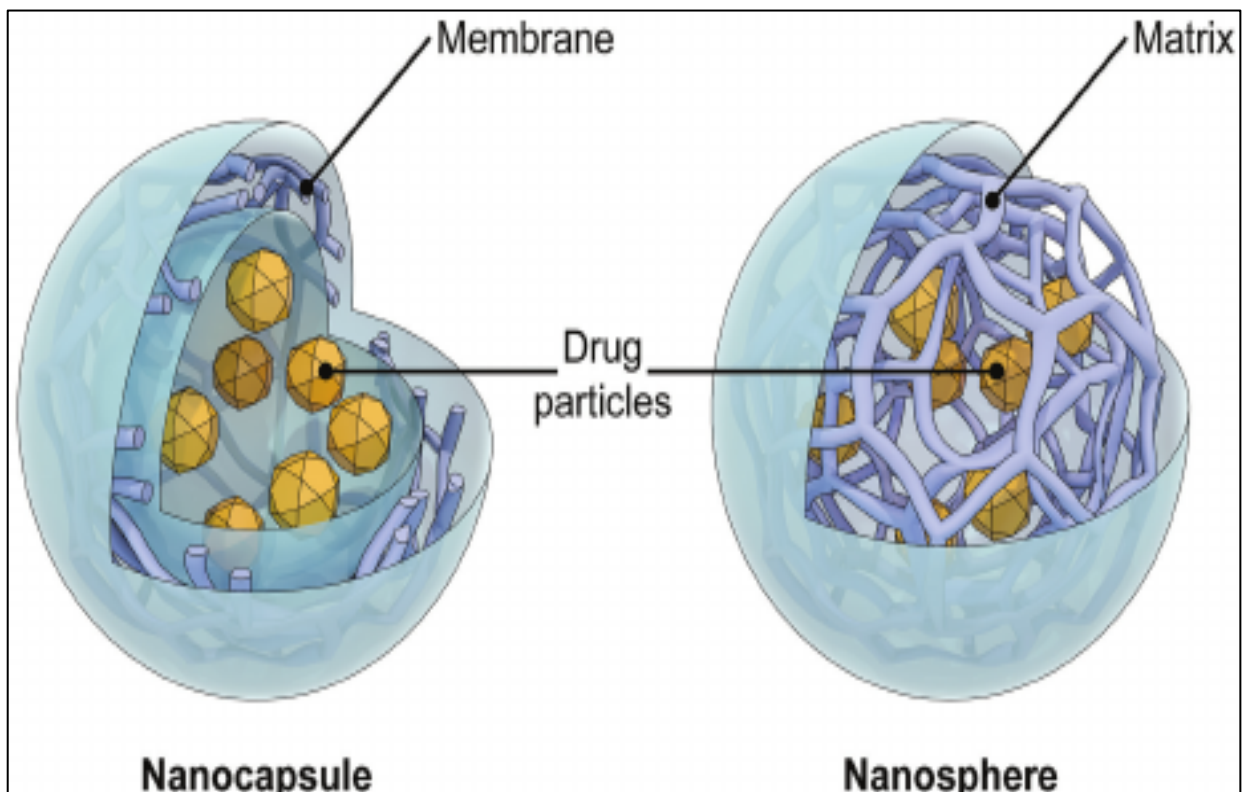


Figure 13 : Représentation schématique de la structure d'une nanocapsule et d'une nanosphère (61)

II - Polymères :

II.1 - Généralités sur les polymères :

Les polymères sont présents dans la nature depuis le début de la vie, les polymères naturels essentiels tels que l'ADN, l'ARN, les protéines et les polysaccharides jouant un rôle essentiel dans l'existence des plantes et des animaux. Tout au long de l'histoire, les humains ont utilisé des polymères naturels pour répondre à leurs besoins en matière de vêtements, de décoration, d'abris, d'outils, d'armes, de matériel d'écriture, etc. Cependant, l'origine de l'industrie moderne des polymères remonte au XIXe siècle, lorsque des progrès significatifs ont été réalisés dans la modification de polymères naturels spécifiques. Ces découvertes ont conduit au développement de polymères synthétiques et à leur utilisation généralisée dans un large éventail d'applications industrielles et grand public. Aujourd'hui, les polymères sont un composant essentiel de nombreux produits et matériaux que nous utilisons dans notre vie quotidienne (62).

Un polymère est un type de substance, naturelle ou artificielle, constituée de grosses molécules appelées macromolécules. Ces macromolécules sont constituées d'unités plus simples appelées monomères. Les polymères se trouvent dans de nombreux organismes vivants, notamment sous forme de protéines, de cellulose, ainsi que dans les minéraux tels que le diamant, le quartz et le feldspath. Ils sont également les éléments constitutifs de nombreux matériaux fabriqués par l'homme, tels que le béton, le verre, le papier, les plastiques et les caoutchoucs. Le terme "polymère" fait référence à un groupe d'unités monomères, et lorsque le nombre de monomères est très grand, le polymère est appelé haut polymère. Les polymères peuvent être composés de types de monomères identiques ou différents, et ceux composés de deux types de monomères différents ou plus sont appelés copolymères (63).

II.2 - Polymères utilisés dans la formulation des nanoparticules polymériques :

Les polymères jouent un rôle crucial dans la synthèse des nanoparticules polymériques. Ces nanoparticules sont constituées de polymères naturels ou synthétiques qui offrent des avantages uniques. Les polymères offrent le potentiel d'une production à grande échelle, d'une fonctionnalisation des surfaces et d'une dégradation et d'une libération contrôlées des composés piégés. L'utilisation de polymères naturels dans la formulation de nanoparticules polymériques présente certains avantages, tels que la biodégradabilité et la biocompatibilité. D'autre part, les polymères synthétiques offrent plus de cohérence et de polyvalence, car ils se présentent dans une plus large gamme de compositions et ont des propriétés qui peuvent être facilement ajustées pour répondre à des exigences spécifiques (64).

Dans ce tableau, nous allons explorer les deux principaux types de polymères : naturels et synthétiques qui sont notamment utilisés dans l'administration des médicaments (65) :

Tableau 3 : Exploration des polymères naturels et synthétiques utilisés dans l'administration des médicaments

Classification	Polymère
Polymères à base de protéines	Collagène, Albumine, Gélatine
Polysaccharides	Agarose, Alginate, Carraghénane, Chitosane, Acide hyaluronique, Dextrane, Cyclodextrines
Polyesters	Poly(acide lactique), Poly(acide glycolique), Poly(hydroxybutyrate), Poly(ϵ caprolactone), Poly(acide β -malique), Poly(dioxanones)
Polyanhydrides	Poly(acide sébacique), Poly(acide adipique), Poly(acide terphtalique) et divers copolymères
Polyamides	Poly(iminocarbonates), Polyamino acides
Dérivés cellulosiques	Carboxyméthylcellulose, Acétate de cellulose,
Polymères acryliques	Polyméthacrylates, Poly(méthyl méthacrylate), Poly hydro(éthylméthacrylate)

Polymères naturels

Polymères synthétiques

a. Polymères naturels :

i. **Collagène** : Le collagène est une protéine présente en abondance dans les os, les tendons, les muscles et la peau. Ses propriétés, telles que la résistance à la traction, la biodégradabilité, la biocompatibilité, la faible antigénicité, en font un élément idéal pour les systèmes d'administration de médicaments. Les nanoparticules de collagène sont un vecteur efficace pour délivrer des gènes, des médicaments, des protéines et des facteurs de croissance. Ça offre plusieurs avantages par rapport aux autres NPs polymériques naturels et synthétiques, notamment une surface de contact élevée, une toxicité réduite et un potentiel élevé de densité de charge cationique, grâce aux nombreux groupes amino qu'ils possèdent (66).

ii. **Alginate** : L'alginate est un polymère naturel composé d'acide guluronique et d'acide mannuronique. Il est biocompatible et biodégradable, ce qui a été approuvé par la Food and Drug Administration pour une utilisation chez l'homme. L'alginate est un polymère hydrophile et anionique soluble dans l'eau mais insoluble dans les solvants organiques comme l'éthanol. L'alginate est utilisé dans la production de nanoparticules d'alginate. L'alginate a diverses applications, telles que dans l'industrie alimentaire et des boissons en tant que stabilisants pour les boissons, l'industrie pharmaceutique, la culture cellulaire et la transplantation (67).

L'alginate de sodium est synthétisé par la réaction du carbonate de sodium avec l'acide alginique. Le processus de fabrication consiste à laver les algues avec de l'eau et de l'acide pour éliminer les substances hydrosolubles telles que le chlorure de sodium, le chlorure de potassium, les colorants, le mannitol et les protéines solubles (68).

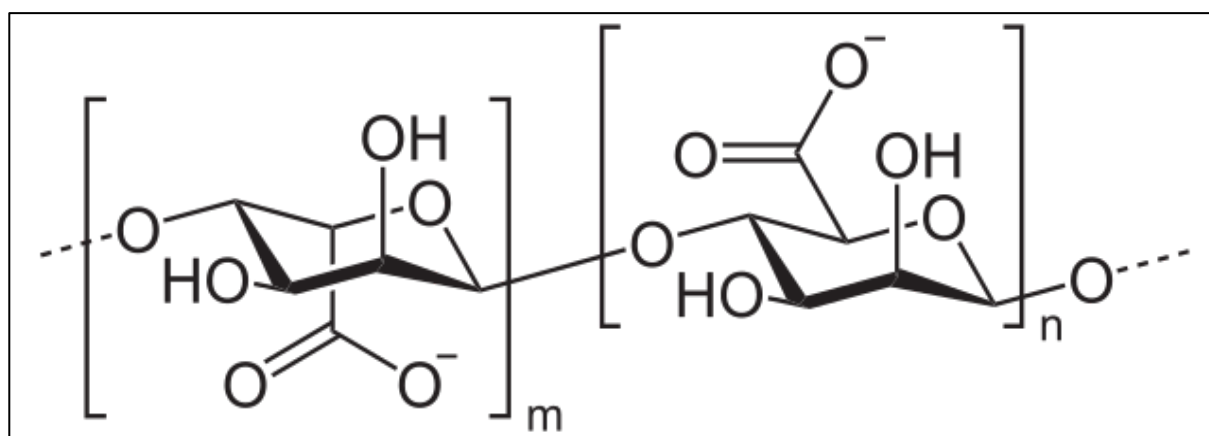


Figure 14 : Structure chimique de l'alginate de sodium (69)

iii. **Chitosane** : Le chitosane est un polysaccharide linéaire polycationique naturel dérivé de désacétylation partielle de la chitine, il se trouve dans l'exosquelette des insectes, des crustacés et des parois cellulaires des champignons. Le chitosane est composé de d-glucosamine à liaison β -(1-4) et de N-acétyl-d-glucosamine, il possède des propriétés cationiques uniques qui lui permettent de former des complexes électrostatiques avec d'autres synthétiques ou chargés négativement. Sa biocompatibilité, sa non-toxicité, son faible pouvoir allergisant et sa biodégradabilité le rendent utile dans diverses applications, notamment dans la vectorisation des médicaments. Le chitosane présente également des activités antitumorales, antimicrobiennes et antioxydantes, et ses propriétés sont affectées par le degré de désacétylation et le poids moléculaire (70).

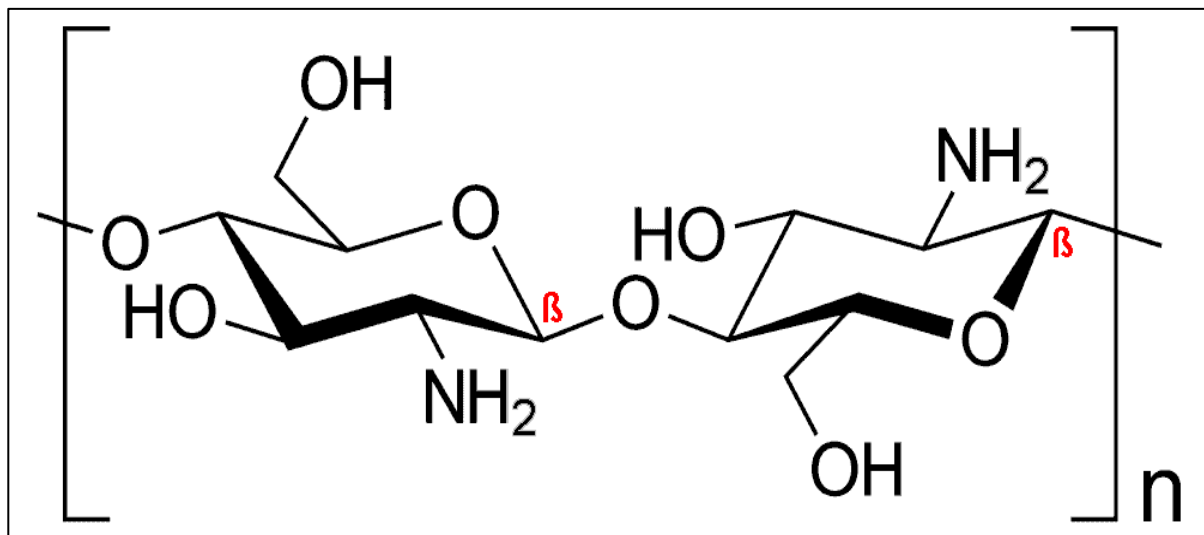


Figure 15 : Structure chimique du chitosane (71)

La chitine est la matière première pour la production de chitosane. Selon la source de chitine, différents traitements sont nécessaires pour atteindre un haut niveau de pureté. La purification est particulièrement importante pour les applications biomédicales ou pharmaceutiques, car les protéines, minéraux ou pigments résiduels peuvent provoquer des effets indésirables. La désacétylation est le processus de conversion de la chitine en chitosane et peut être accomplie en utilisant des méthodes enzymatiques ou chimiques. Quelle que soit la méthode utilisée, la dépolymérisation de la chitine est inévitable (70).

b. Polymères synthétiques :

i. **Polycaprolactone** : La polycaprolactone est un type de polyester biodégradable qui a été approuvé par la FDA pour une utilisation dans diverses applications biomédicales. Il s'est révélé prometteur dans l'administration contrôlée et ciblée de médicaments, ainsi que dans la réduction des effets secondaires systémiques. La polycaprolactone peut être combinée avec d'autres polymères pour obtenir des propriétés souhaitables pour le chargement et la libération des médicaments, et est connue aussi pour sa biocompatibilité et sa capacité à être entièrement excrétée du corps une fois qu'elle a été absorbée (72).

ii. **Acide polylactique** : ou bien PLA est un polyester thermoplastique qui possède des propriétés biodégradables, biocompatibles. L'acide lactique monomère, dont le PLA est dérivé, est obtenu par la fermentation bactérienne de diverses sources de biomasse telles que le maïs et la canne à sucre. Les NPs à base d'acide polylactique ont des applications potentielles en tant que transporteur de principes actifs, protéines et de gènes en nanomédecine (73).

II.3 - Méthodes d'encapsulation par les nanoparticules polymériques :

On va détailler ici les principes des plus importantes méthodes utilisées afin d'encapsuler les médicaments par les nanoparticules polymériques :

a) **Évaporation du solvant** : La méthode d'évaporation de solvant est une technique largement utilisée pour la préparation de nanoparticules polymériques chargées de médicament dans des formulations pharmaceutiques. Dans cette méthode, un polymère est dissous dans un solvant organique volatil avec le médicament. La solution résultante est ensuite émulsionnée dans une phase aqueuse contenant des tensioactifs sous haute homogénéisation. Le solvant organique est ensuite éliminé soit par augmentation de la température sous pression réduite, soit par agitation continue, ce qui entraîne une dispersion des nano gouttelettes. Cette méthode peut également être utilisée pour créer des particules noyau-enveloppe en formant et en stabilisant le noyau dans un solvant organique, en formant une émulsion eau-dans-huile dans la première phase, puis en dispersant la phase aqueuse finale avec des tensioactifs et des stabilisants (74).

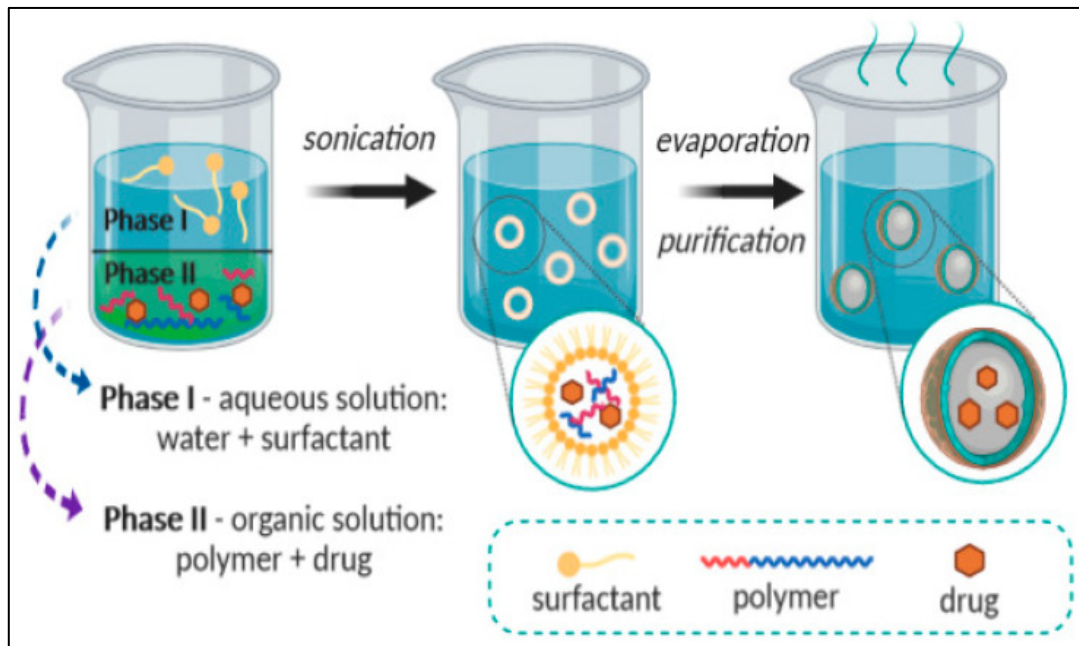


Figure 16 : Représentation schématique du procédé d'évaporation du solvant (37)

b) Méthode de nanoprécipitation : La méthode de nanoprécipitation, également connue sous le nom de méthode de déplacement de solvant, a été développée par le groupe Fessi et fonctionne sur le principe de l'effet Marangoni. Dans cette méthode, des nanoparticules sont créées dans une suspension colloïdale en ajoutant lentement la phase huileuse à la phase aqueuse sous agitation modérée. Cette technique est souvent utilisée pour encapsuler des médicaments hydrophobes, mais également pour les médicaments hydrophiles (75).

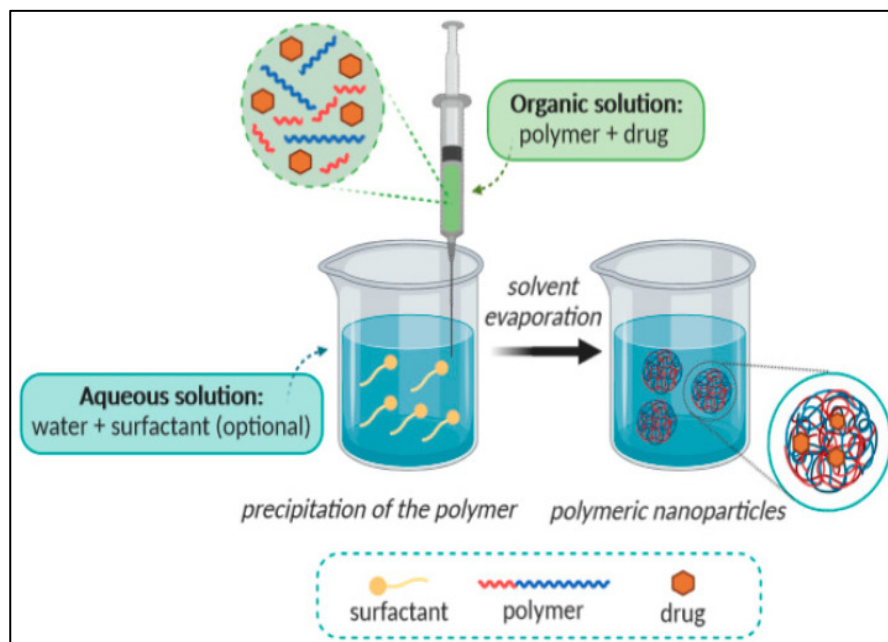


Figure 17 : Schéma de la méthode de nanoprécipitation (37)

c) **Gélification ionique** : Ou bien ‘‘ Ionic gelation ‘‘ est une technique qui produit des NPs en utilisant l'interaction de deux substances ioniques dans certaines conditions. L'une de ces substances doit être un polymère. Lorsqu'un médicament ou un composé bioactif est ajouté, il peut être piégé dans les chaînes polymères, entraînant une encapsulation dans la structure des nanoparticules. La méthode initiale d'encapsulation de protéines à l'aide de la gélification ionique a été rapportée par **Calvo et al** (76). Le procédé utilise les propriétés cationiques d'un polymère tel que le chitosane en présence d'acides dilués et les propriétés poly anioniques d'une substance ionique telle que le tri polyphosphate de sodium. Les groupes amino chargés positivement du polymère se réticulent avec les groupes phosphate chargés négativement pour former des hydrogels. En agitant constamment le mélange à des concentrations spécifiques, des NPs se forment spontanément. La procédure peut être réalisée par deux voies différentes : une où la solution polymérique est mélangée avec le principe actif avant d'ajouter la solution de contre-ions, ou une autre où les contre-ions sont ajoutés goutte à goutte au mélange du principe actif et de la solution polymérique (77).

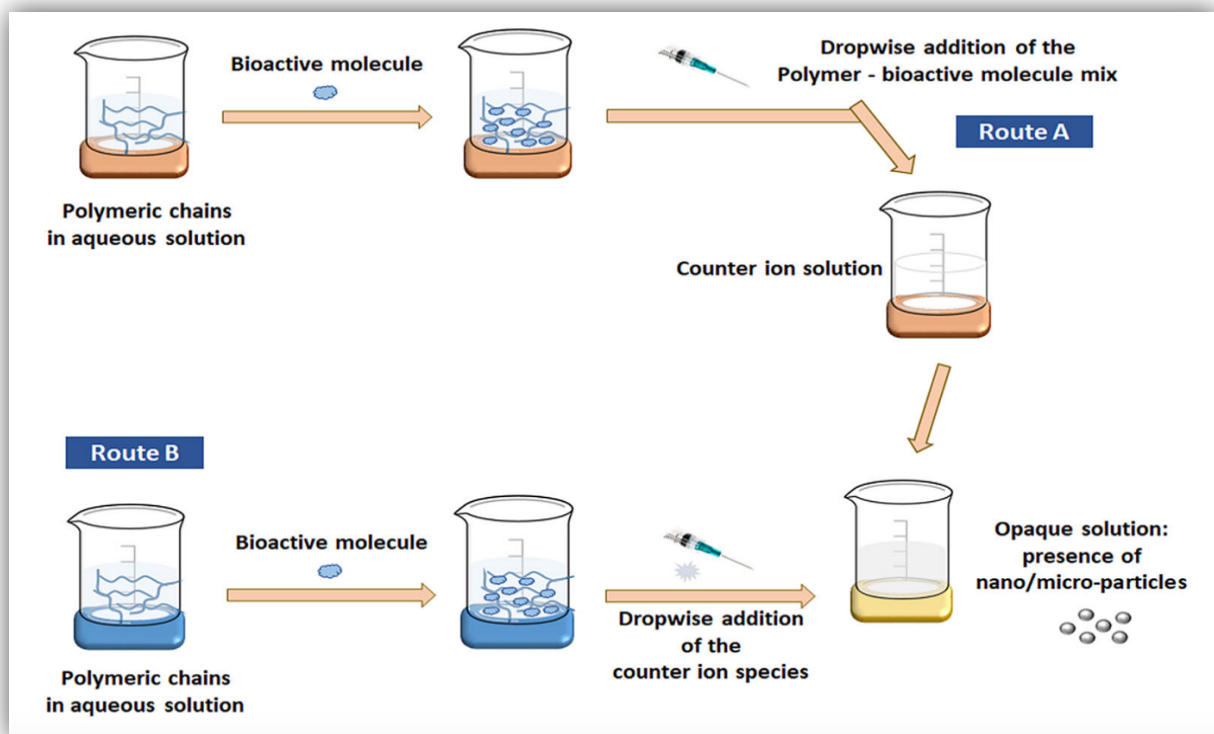


Figure 18 : Schéma illustrant la méthode de gélification ionique (77)

d) Mini-émulsion polymérisation : Le terme "mini-émulsion" fait référence à un type d'émulsion également appelé "nanoémulsion". Ce type d'émulsion est formulé à l'aide d'un mélange d'eau, de monomères, de co-stabilisants (composés de faible poids moléculaire), de tensioactifs et d'initiateurs, et est produit à l'aide d'un dispositif à haut cisaillement tel qu'un ultrason haute puissance ou un homogénéisateur haute pression. Bien que les mini-émulsions soient plus stables que les émulsions conventionnelles, elles ne sont stables que cinétiquement et non thermodynamiquement. La méthode de polymérisation en mini-émulsion a été utilisée pour produire divers types de PNP en utilisant différentes combinaisons de co-stabilisants et d'initiateurs, qui se sont avérés avoir un impact significatif sur les caractéristiques et la formation des nanoparticules (78).

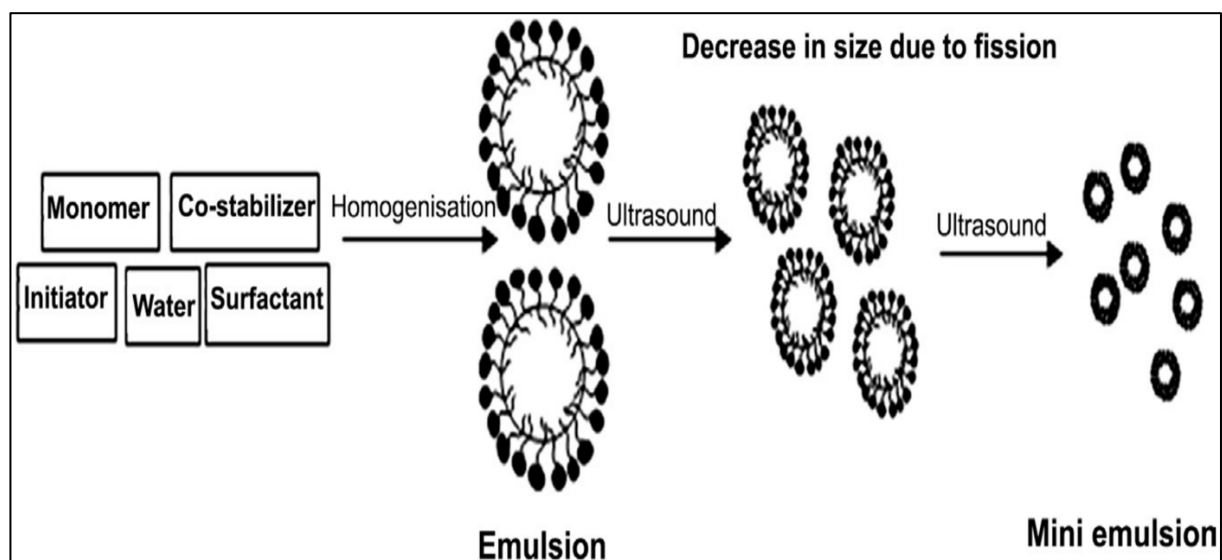


Figure 19 : Schéma illustrant la formation de mini émulsion (78)

e) Spray drying : Le séchage par atomisation est une technique pratique pour créer des nanoparticules polymériques sous forme de poudre, ce qui améliore leur stabilité physico-chimique. Cette méthode est un processus en une étape qui permet la préparation de poudres aux propriétés spécifiques adaptées à diverses applications. Pour initier ce processus, un polymère est d'abord dissous dans un solvant approprié, et de petites gouttelettes de cette solution sont ensuite pulvérisées dans un environnement chaud à l'aide d'un atomiseur. Au contact des gouttelettes avec l'environnement chaud, le solvant s'évapore, entraînant la précipitation du polymère sous forme de nanopoudres (78).

III - Application des nanoparticules dans le domaine pharmaceutique :

III.1 - Nanoparticules polymériques – Vectorisation des médicaments :

Alors que les maladies deviennent plus complexes et que certains traitements comportent plus de risques de toxicité, il existe un besoin croissant de nouvelles méthodes d'administration de médicaments. Un système de délivrance de médicaments (DDS) est un produit ou un dispositif qui facilite l'introduction d'ingrédients actifs dans le corps pour non seulement améliorer leur efficacité, mais aussi leur sécurité. En régulant la quantité, le moment et l'emplacement de la libération du médicament, le DDS peut aider les médicaments à atteindre leur cible thérapeutique en passant à travers les membranes biologiques (79).

La figure suivante classe les nanoparticules polymériques en fonction de leur organisation structurale en deux types principaux : les nanocapsules et les nanosphères. Les nanocapsules ont une structure noyau-enveloppe, où les molécules de médicament sont piégées dans un noyau liquide ou solide entouré d'une enveloppe polymère. D'autre part, les nanosphères sont des particules solides où les molécules de médicament sont soit dispersées dans la matrice polymère, soit adsorbées à la surface de la particule (80) :

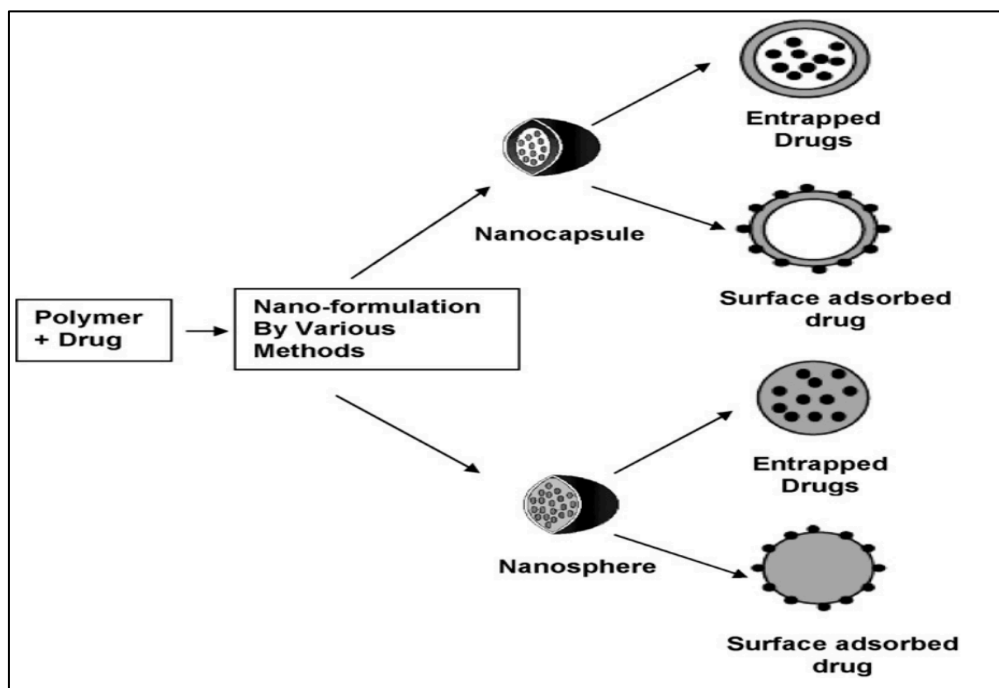
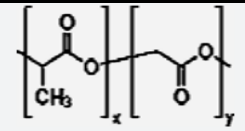
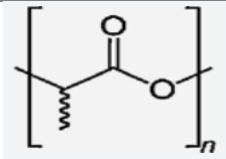
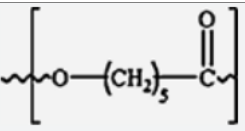
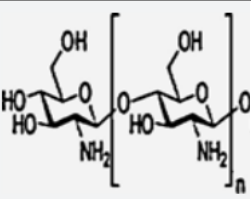
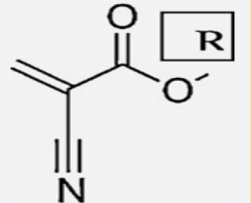


Figure 20 : Illustration schématisée des nanocapsules et des nanosphères, et comment les médicaments sont soit piégés, soit adsorbés à leur surface (32)

Dans le tableau ci-dessous, nous résumons certaines des nanoparticules polymériques ayant déjà été formulés ainsi que les polymères utilisés dans leur production. Ces nanoparticules sont classées en fonction de leur type de polymère, ainsi que les spécificités de chaque nanoparticule. Les nanoparticules polymériques ont montré un grand potentiel pour améliorer l'administration de médicaments, et leur commercialisation est une étape prometteuse vers la mise à disposition de cette technologie pour une utilisation généralisée dans l'industrie de la santé :

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des nanoparticules polymériques formulées à partir de différents polymères pour une administration ciblée de médicaments

Polymère	Structure	Encapsulant	Avantage thérapeutique	Référence
PLGA Poly (lactic-co-glycolic acid)		Estradiol	Biodisponibilité accrue	(81)
Acide polylactique (PLA)		Hémoglobine	Absorption moindre des macrophages	(82)
Polycaprolactone (PCL)		Insuline	Préservation de l'activité biologique de l'insuline	(83)
Chitosane		Glycyrrhizinate d'ammonium	Augmentation de l'absorption orale du glycyrrhizinate d'ammonium	(84)
Poly-alkyl-cyanoacrylate (PAC) Poly(éthyl) cyanoacrylate		Ftorafur	Libération contrôlée du médicament jusqu'à 10 heures	(85)

III.2 - Pharmacocinétique des nanoparticules polymériques :

Les avantages de l'utilisation de nanoparticules comme systèmes d'administration de médicaments sont beaucoup. Les nanoparticules peuvent être développées pour tous les types de molécules médicamenteuses et peuvent modifier la pharmacocinétique des médicaments pour aboutir à une cinétique favorable et éviter la toxicité (86).

a) Absorption : Le tractus gastro-intestinal (GIT) fournit un site attrayant pour l'absorption des nutriments et des médicaments solubilisés en raison de sa grande surface, de son pH variable et de la présence de plaques de Peyer. Cependant, lors de l'administration de nanoparticules par voie orale, les variations du GIT doivent être prises en compte. La couche de mucus et la membrane des cellules épithéliales agissent comme des barrières pour les nanoparticules qu'il faut traverser. Alors que certains chercheurs suggèrent que les nanoparticules sont absorbées par les cellules M des plaques de Peyer, d'autres supposent qu'elles sont absorbées par des cellules épithéliales gastriques saines (86). La couche de mucus dans l'épithélium gastrique est importante dans l'absorption des médicaments libérés par les nanoparticules (87). Les nanoparticules peuvent être absorbées intactes ou adsorbées sur le mucus pour libérer des médicaments. La taille des nanoparticules et leur charge de surface jouent un rôle essentiel dans leur absorption, les particules plus petites étant plus facilement absorbées et les nanoparticules non ioniques montrant des améliorations significatives de l'absorption. La géométrie des particules influence également l'absorption, avec un rapport d'aspect élevé et des nanoparticules en forme de bâtonnet mieux absorbées que les nanoparticules sphériques (86).

Tableau 5 : L'influence de quelques paramètres sur l'absorption des NPs par le GIT (86)

Paramètre	Caractéristique	Résultat
Forme	Rapport d'aspect élevé	Meilleure absorption lymphatique
Charge de la surface	Non-ionique	Absorption accrue
Modification de la surface	PEGylation	Amélioration de l'absorption
Taille	< 500 nm	Absorbés à travers le GIT
Ligand de surface	Peptides inertes	Amélioration de l'absorption

b) Distribution : La façon dont les nanoparticules encapsulant les principes actifs sont distribuées dans le corps dépend de la voie d'administration, telle que l'administration par voie orale ou bien par voie intraveineuse. L'efficacité des nanoparticules dépend de leur distribution lors du ciblage, qui peut être passif ou actif. Le ciblage passif tire parti de la physiologie des zones touchées, tandis que le ciblage actif consiste à utiliser des revêtements de surface ou des ligands chimiquement attachés sur des nanoparticules qui sont personnalisés pour répondre à des exigences spécifiques. Les circulations sanguine et lymphatique jouent toutes deux un rôle important dans la distribution des NPs (86).

c) Métabolisme : Lorsqu'elles sont absorbées par le système lymphatique, les NPs évitent le métabolisme de premier passage, qui est généralement subi par les médicaments absorbés par le GIT. Après administration orale, les nanoparticules sont éliminées du corps à un rythme plus lent, ce qui entraîne une exposition plus longue au médicament et une puissance accrue. Cela peut être dû au fait que le médicament n'est pas libre et n'est pas facilement disponible pour le métabolisme lorsqu'il est encapsulé dans des nanoparticules (88, 89).

d) Excrétion : Les nanoparticules de taille inférieure à 5 nm sont généralement excrétées par les reins. Cependant, la plupart des nanoparticules à base de polymères sont plus grosses et ne sont pas excrétées directement, ce qui augmente leur temps de circulation et réduit leur clairance. Les nanoparticules polymériques sont généralement excrétées par les matières fécales après avoir été métabolisées dans le foie et d'autres tissus (86).

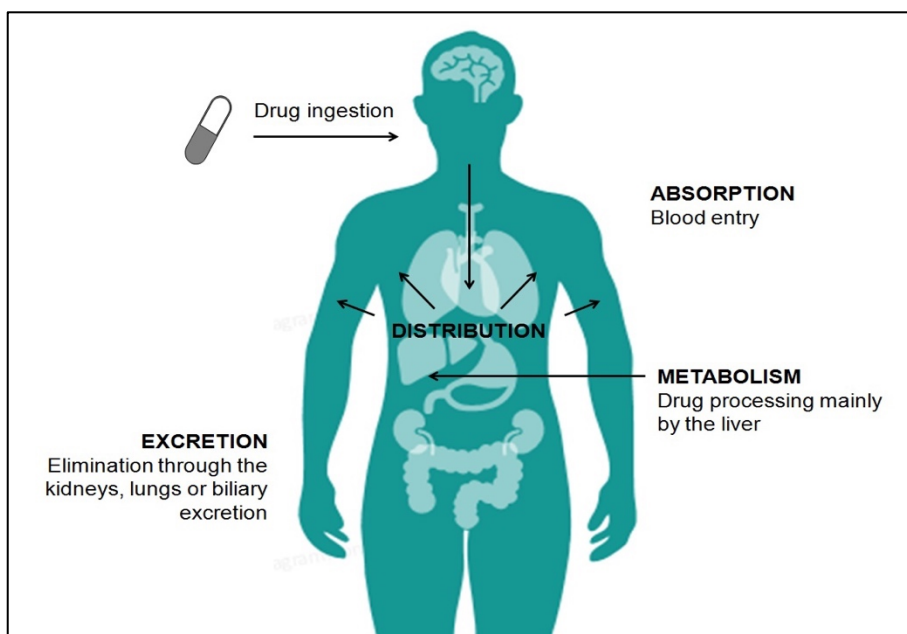


Figure 21 : Schéma détaillant les quatre étapes de la Pharmacocinétique (90)

The background is a light, neutral color, possibly white or light grey. It is decorated with various green elements: numerous small, vibrant green leaves of different shapes are scattered throughout, some appearing to float or fall. In the upper right corner, there is a larger, detailed palm frond with many fine, pointed leaflets. At the bottom of the image, there are several stalks of dried, golden-brown flowers or herbs, likely lavender, which are slightly out of focus.

CHAPITRE 4

HUILES ESSENTIELLES

I - Généralités sur les plantes médicinales :

Les plantes médicinales sont utilisées depuis des siècles pour traiter diverses maladies et affections. Ils constituent une source précieuse de composés naturels au potentiel thérapeutique, et bon nombre des médicaments modernes utilisés aujourd'hui trouvent leur origine dans les médicaments à base de plantes. Les plantes contiennent un large éventail de composés chimiques, notamment des alcaloïdes, des terpénoïdes, des flavonoïdes et des acides phénoliques, qui possèdent diverses activités biologiques telles que des effets antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires et anticancéreux. Ces composés se trouvent souvent dans différentes parties de la plante, y compris les feuilles, les racines, les tiges et les fleurs.

L'utilisation des plantes médicinales dans les pratiques de la médecine traditionnelle, remonte à la préhistoire. Les plantes synthétisent divers composés chimiques qui remplissent diverses fonctions, notamment la protection contre les maladies et les insectes (91). Les premiers archives d'herbes médicinales ont été trouvés dans la civilisation sumérienne, où des centaines de plantes médicinales, y compris l'opium, ont été répertoriées sur des tablettes d'argile. L'utilisation des plantes médicinales s'est poursuivie dans l'Égypte et la Grèce antique, où les médecins ont documenté des centaines de recettes de médicaments utilisant diverses plantes médicinales. Les enseignements et les prédications islamiques ont toujours souligné l'importance de l'utilisation des plantes médicinales pour traiter les maladies (92).

Les plantes médicinales ont été une source importante de remèdes pour les humains depuis des milliers d'années, et leur utilisation remonte aux premières sociétés humaines. Au fil du temps, les humains ont découvert comment utiliser différentes parties de plantes, telles que les feuilles, les racines, les fleurs, les écorces et les fruits, pour traiter une variété de problèmes de santé. Avec l'évolution de la science et de la médecine, de nombreuses thérapies à base de plantes ont été développées et continuent d'être étudiées pour leurs effets thérapeutiques potentiels, on évoquera notamment :

a) Phytothérapie :

La phytothérapie est une branche de la médecine qui utilise les plantes pour le traitement de maladies ou pour améliorer la santé globale. L'utilisation des phytothérapies en médecine traditionnelle vise à maintenir la composition et la pureté originelles de la source végétale. Cela signifie que soit la plante entière, soit des composants spécifiques et non altérés de la plante sont utilisés à des fins médicinales (93).

Ce texte décrit l'utilisation du cumin et de l'aneth dans une copie en arabe de 1334 de la matière médicale de Dioscoride. Arabic Book of Simple Drugs from Dioscorides' *Materia Medica*. Cumin & dill. c. 1334 By Kathleen Cohen in London's British Museum

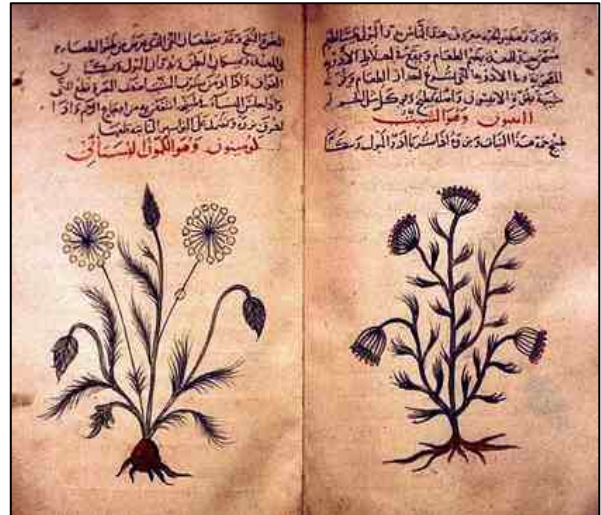


Figure 22 : Manuscrit remontant à l'âge d'or de l'islam

Il s'agit d'une pratique médicale scientifiquement fondée, distincte des approches traditionnelles comme l'herboristerie médicale, qui s'appuie sur une connaissance empirique des herbes médicinales et est souvent liée à la sagesse traditionnelle. La phytothérapie s'appuie sur des essais cliniques et des études pharmacologiques de préparations végétales spécifiques. Cependant, l'interprétation et l'acceptation de ces preuves varient d'un pays à l'autre. De nombreuses préparations phytothérapeutiques sont utilisées, notamment celles dérivées du Ginkgo biloba, du millepertuis, de l'échinacée et de l'Harpagophytum procumbens, qui sont utilisées pour traiter diverses affections (94).

b) Homéopathie :

L'homéopathie – en grec homoios = similaire, pathos = souffrance -, est un système médical qui fonctionne selon le principe de "similia similibus curentur" en latin. Son fondateur était Samuel Christian Friedrich Hahnemann, un médecin allemand. Le concept fondamental de l'homéopathie est la similitude, utilisant des substances hautement diluées, telles que des extraits de plantes, pour stimuler les processus de guérison innés du corps (95).

c) Aromathérapie :

L'aromathérapie est une pratique de guérison holistique qui utilise des extraits naturels de plantes, également connus sous le nom d'huiles essentielles, pour améliorer le bien-être physique et émotionnel. Ces huiles sont dérivées de diverses parties de plantes et sont utilisées depuis des milliers d'années pour favoriser la relaxation, soulager le stress et traiter un large éventail de maux physiques et mentaux. L'aromathérapie est généralement administrée par inhalation ou absorption cutanée, et les huiles peuvent être diffusées, ajoutées aux bains ou aux huiles de massage, ou appliquées localement sous forme diluée. Selon l'Association nationale pour l'aromathérapie holistique, l'aromathérapie est une pratique qui consiste à utiliser des extraits naturels de plantes pour équilibrer, harmoniser et promouvoir la santé globale du corps, de l'esprit. Ces extraits sont dérivés de plantes et sont connus sous le nom d'huiles essentielles. La pratique de l'aromathérapie est basée à la fois sur l'art et la science et vise à améliorer le bien-être physique et émotionnel, actuellement, l'aromathérapie consiste à utiliser des huiles essentielles, des hydrolats et des huiles de support pour une guérison holistique. Les propriétés thérapeutiques des huiles aromatiques et de l'eau sont utilisées pour favoriser la guérison de l'esprit, en aidant à rétablir l'équilibre naturel du corps (96).



Figure 23 : Illustration d'huiles essentielles en flacon (97)

II - Huiles essentielles :

II.1 - Définition des huiles essentielles :

Les substances connues sous le nom d'huiles essentielles peuvent être trouvées dans les plantes et sont très volatiles, ce qui signifie qu'elles peuvent être facilement isolées par distillation à la vapeur. Ces huiles sont connues sous le nom de la plante dont elles sont issues, et leur odeur est similaire à celle de la partie de la plante dont elles proviennent, mais généralement plus intense. Les huiles essentielles sont des mélanges complexes qui sont généralement formés de nombreux constituants, généralement liquides, mais parfois solides. Ils ont une faible densité, à l'exception de certaines huiles telles que les huiles de cannelle, de clou de girofle et de saffran, qui sont plus denses que l'eau. Ces huiles ont une faible solubilité dans l'eau mais sont solubles dans la plupart des solvants organiques courants, y compris l'éthanol et l'éther diéthylique, et se mélangent bien avec les huiles végétales, les graisses et les cires. Les huiles essentielles ont un indice de réfraction et un pouvoir rotatoire élevés, ce qui pourrait être intéressant pour leur identification et leur contrôle qualité.

Différents groupes, sociétés et entreprises ont également établi leurs propres critères pour réglementer les quantités maximales et les utilisations de certaines huiles et des composés uniques qu'elles contiennent. Néanmoins, les normes **ISO** sont généralement acceptées dans le monde entier (98).

L'Organisation internationale de normalisation a établi des critères pour la définition des huiles essentielles comme un produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale par distillation à la vapeur, par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des agrumes, ou par distillation sèche (98).

Bien qu'il existe de nombreuses définitions des huiles essentielles, celle proposée par **Schilcher, Hegnauer et Cohn-Riechter** est considérée comme la plus précise. Cette définition, qui a été résumée par **Sonwa** en **2000**, définit les huiles essentielles comme des produits ou des mélanges de produits qui se forment dans le cytoplasme et se retrouvent généralement sous forme de petites gouttelettes entre les cellules. Les huiles essentielles sont volatiles, ce qui signifie qu'elles s'évaporent facilement et qu'elles ont un arôme distinct (99).

II.2 - Composition chimique des huiles essentielles :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés organiques qui sont produits par diverses structures dans les plantes, les structures et caractéristiques spécifiques variant considérablement. Ces huiles se trouvent généralement dans les poils sécrétoires, les cellules épidermiques, les cellules sécrétoires internes et les poches sécrétoires de la plante. Les huiles sont constituées de composés volatils à faible poids moléculaire et à haute pression de vapeur à température ambiante. Les huiles essentielles contiennent une grande variété de classes chimiques, telles que les alcools, les éthers ou les oxydes, les aldéhydes, les cétones, les esters, les amines, les amides, les phénols, les hétérocycles et principalement les terpènes. Les terpènes sont le plus grand groupe de composés trouvés dans les huiles essentielles et sont responsables de bon nombre des arômes et saveurs caractéristiques de ces huiles (100).

De plus, les huiles essentielles comprennent des composés non terpéniques qui sont produits par la voie des phénylpropanoïdes, qui comprend des substances comme le cinnamaldéhyde, l'eugénol et le safrole. La composition des huiles essentielles est très variable tant en qualité qu'en quantité. Cette variabilité est attribuée à deux catégories de facteurs : les facteurs intrinsèques liés à la plante et à son interaction avec l'environnement, tels que le type de sol, le climat et la maturité de la plante au moment de la récolte ; et les facteurs extrinsèques liés au processus d'extraction et à l'environnement (100).

II.3 – Propriétés physico chimiques des huiles essentielles :

L'analyse physico-chimique des huiles essentielles implique la mesure de diverses propriétés physiques et chimiques. Ces propriétés fournissent des informations précieuses sur la pureté, la qualité et la stabilité des huiles essentielles, ainsi que sur leurs applications potentielles dans diverses industries, notamment les parfums et les arômes, les cosmétiques et la médecine, ça implique notamment la mesure de la densité, l'indice de réfraction, la rotation optique, la solubilité et la composition chimique, l'évaluation de l'odeur (101) :

- **La densité** : La densité d'une huile essentielle peut fournir des informations sur sa pureté et sa concentration, ainsi que sur son adéquation à différentes applications (101).
- **L'indice de réfraction** : c'est une propriété physique importante utilisée pour déterminer la qualité et la pureté des huiles essentielles. Cette propriété est liée à la concentration de l'huile essentielle et à sa capacité à dévier la lumière (101).
- **La rotation optique** : une propriété physique clé qui est liée à la façon dont la lumière est tournée lorsqu'elle traverse l'HE. Le degré de rotation peut fournir des informations sur la concentration de l'HE, ainsi que sur ses propriétés thérapeutiques potentielles (101).
- **La composition chimique** : c'est un autre aspect important de l'analyse physico-chimique des huiles essentielles. Cette analyse passe par l'identification et la quantification des différents composés présents dans l'huile essentielle. La chromatographie en phase gazeuse, la spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire sont quelques-unes des techniques analytiques utilisées pour identifier et quantifier les composés présents dans les huiles essentielles (101).

Tableau 6 : Tableau détaillant les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles et leurs techniques de détermination (101)

Propriété Physico-Chimique	Technique d'analyse
Densité	Hydromètre, pycnomètre, densitomètre
Indice de réfraction	Réfractomètre
Rotation optique	Polarimètre
Composition chimique	Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS), spectroscopie infrarouge (IR).
Point d'ébullition	Distillation
Viscosité	Viscosimètre, rhéomètre
Ph	pH-mètre
Solubilité	Essais de solubilité

II.4 - Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Le processus d'extraction des huiles essentielles varie en fonction des caractéristiques souhaitées et des composants nécessaires à l'extrait botanique. La qualité des huiles essentielles est principalement déterminée par la méthode d'extraction utilisée, car des procédures inappropriées peuvent endommager ou altérer les composés phytochimiques présents dans les huiles, entraînant la perte de constituants pharmacologiques, des saveurs/odeurs désagréables, des changements physiques. Les techniques d'extraction peuvent être divisées en deux catégories : les méthodes classiques et les méthodes innovantes, qui ont été développées pour augmenter l'efficacité du processus d'extraction en réduisant le temps nécessaire à l'isolement de l'HE, en augmentant le rendement (102).

Ci-dessous, un tableau résumant les différentes méthodes employés pour l'extraction des huiles essentielles :

Tableau 7 : Tableau démontrant les avantages et désavantages des différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles (103)

Méthode d'extraction	Avantages	Désavantages
Distillation à la vapeur	<ul style="list-style-type: none"> - Extraction efficace de la plupart des huiles essentielles - Huile de haute qualité - Peut être utilisé avec une variété de matières végétales 	<ul style="list-style-type: none"> - Ne convient pas aux huiles délicates ou sensibles à la chaleur - Temps d'extraction long - Consommation d'énergie élevée
Hydrodistillation	<ul style="list-style-type: none"> - Convient aux huiles sensibles à la chaleur - Procédé relativement simple et peu coûteux - Peut extraire une large gamme d'huiles 	<ul style="list-style-type: none"> - Temps d'extraction long - Nécessite une grande quantité de matériel végétal
Extraction par solvant	<ul style="list-style-type: none"> - Rendement élevé d'huiles essentielles - Temps d'extraction court 	<ul style="list-style-type: none"> - Nécessite l'utilisation de solvants, qui peuvent être nocifs - Huile de mauvaise qualité
Extraction par fluide supercritique	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité d'extraction élevée - Sélectivité pour les composés cibles - Résidu de solvant minimal - Conditions d'extraction douces 	<ul style="list-style-type: none"> - Équipement coûteux - Évolutivité limitée - Exigences de pression et de température élevées
Extraction assistée par ultrasons	<ul style="list-style-type: none"> - Efficacité d'extraction élevée - Temps d'extraction réduit - Faible consommation d'énergie 	<ul style="list-style-type: none"> - Limité à l'extraction à petite échelle. - Potentiel de dégradation des composés thermosensibles

Méthodes classiques

Méthodes innovantes

III - Plante étudié : *Rosmarinus officinalis* Linnaeus

III.1 - Origine du nom :

Rosmarinus officinalis est le nom scientifique du romarin, une plante aromatique et médicinale originaire du bassin méditerranéen. Ce nom a plusieurs étymologies possibles. Il pourrait venir du latin *rosmarinus*, qui signifie "rosée de mer", en référence à l'habitat littoral du romarin et à ses fleurs bleues. Il pourrait aussi venir du grec *rhops myrinos*, qui signifie "buisson aromatique", en raison de son odeur caractéristique. Une autre hypothèse est qu'il dérive du latin *rhus marinus*, qui signifie "sumac de mer", un arbuste aux feuilles semblables à celles du romarin. Le nom *officinalis* indique que le romarin est une plante utilisée en pharmacopée depuis l'Antiquité, cependant, depuis 2017, le nom officiel du romarin est *Salvia rosmarinus* (104).



Figure 24 : Illustration de l'huile de romarin (105)

Le romarin a été introduit dans le monde arabe par les marchands espagnols et portugais au cours des XIe et XIIe siècles. Le romarin était connu des Arabes sous le nom de «*ikleel al-jabal*» (106) ou «*couronne de la montagne*». À cette époque, les Arabes ont commencé à cultiver la plante dans les jardins et ont commencé à l'utiliser dans leur cuisine et leur médecine traditionnelle.

III.2 - Étude botanique de *Rosmarinus officinalis* L :

a) Classification :

Le romarin, scientifiquement connu sous le nom de *Rosmarinus officinalis*, est une espèce appartenant au genre *Rosmarinus*, nommé par **Carl Linnaeus**. Elle possède des feuilles persistantes, se caractérise par sa structure touffue dense, son port ramifié et ses fleurs bleu-blanc. Atteignant généralement une hauteur supérieure à 1 m. Il appartient à la famille des Lamiacées, qui est reconnue comme l'une des familles de plantes à fleurs les plus remarquables au monde. Avec environ 236 genres et 6900 à 7200 espèces (107).

La classification suivante est la classification classique de **Carl von Linné**, également connue sous le nom de classification linnéenne ou système de Linné (107):

- **Royaume** : Plantae
- **Clade** : Trachéophytes
- **Clade** : Angiospermes
- **Clade** : Eudicotylédones
- **Clade** : Asteranae
- **Ordre** : Lamiales
- **Famille** : Lamiaceae
- **Sous-famille** : Nepetoideae
- **Tribu** : Mentheae
- **Genre** : *Rosmarinus*
- **Espèce** : *officinalis*

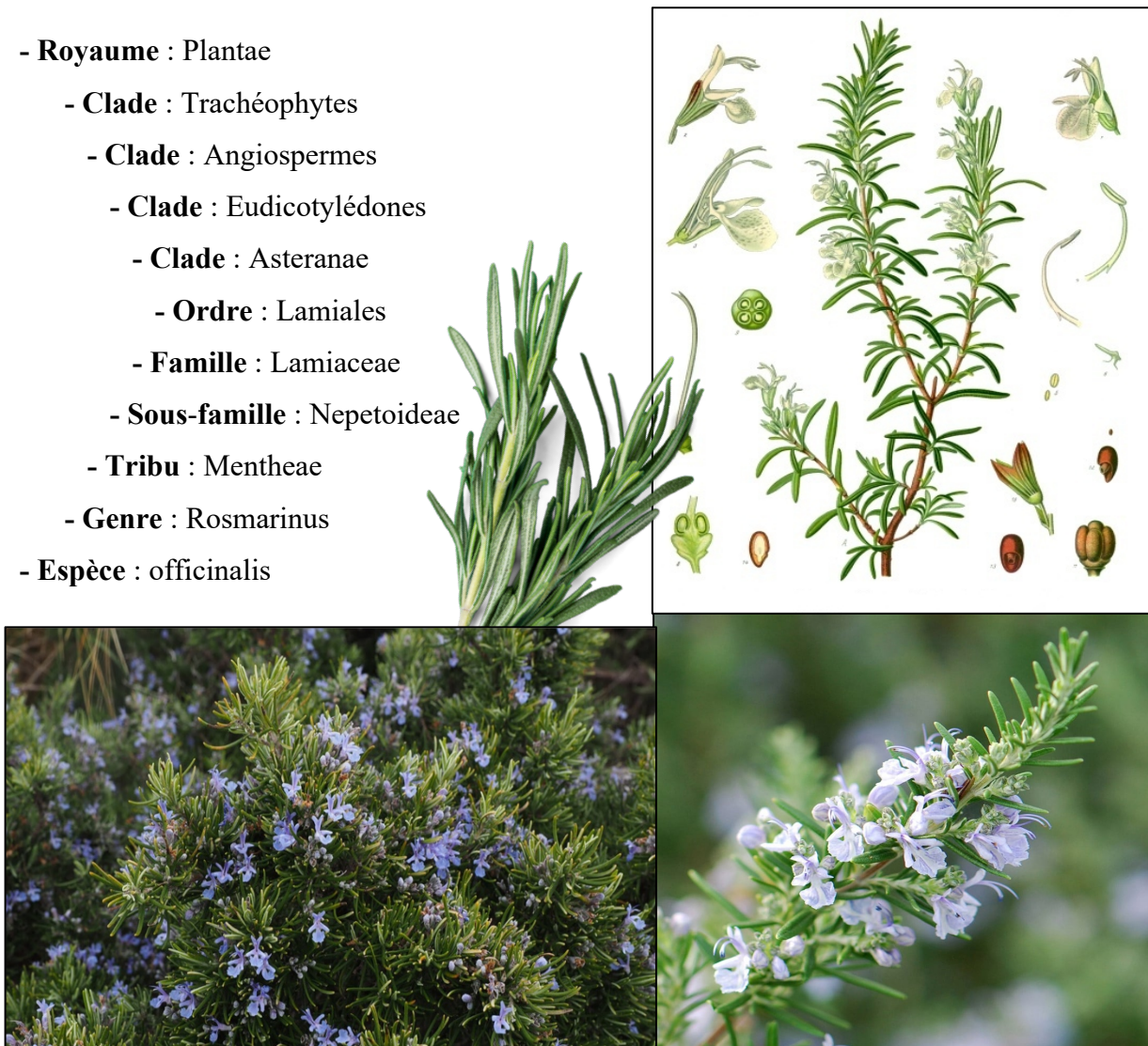


Figure 25 : Illustrations de la plante de romarin et schéma de ces différents composants (106-108)

b) Caractéristiques botaniques du Romarin : Le romarin est un arbuste à feuilles persistantes pouvant atteindre 1,8 mètre de haut, avec un port dressé ou couché. Les feuilles ne sont pas pétiolées et varient en taille de 10 à 41 mm de longueur et de 1 à 3 mm de largeur, avec des tailles variables au sein d'une même branche. Ils sont fortement recourbés et ont une forme linéaire ou lancéolée, la face supérieure étant verte et la face inférieure blanchâtre en raison de la présence de nombreux poils, dont des trichomes glandulaires (capités et peltés) et non glandulaires (111).

IV - Huile essentielle du romarin :

La plante du romarin est utilisée depuis des siècles en médecine traditionnelle pour ses nombreux bienfaits pour la santé, son huile essentielle est un ingrédient populaire en aromathérapie et en remèdes naturels. L'huile essentielle de romarin peut être extraite des feuilles de la plante par distillation à la vapeur. Cette huile possède un parfum frais et herbacé qui est vivifiant et stimulant. Elle est connue pour être un remède naturel polyvalent et puissant qui peut être utilisé selon diverses façons pour favoriser à la fois la santé et le bien-être (112).

IV.1 - Composition phytochimique du Romarin :

Le romarin est une herbe qui contient de nombreux composés bioactifs tels que le camphre, les terpènes et les phénols. Ces composés sont extraits de la plante en utilisant diverses méthodes telles que la macération, la décoction, l'hydrodistillation. Les molécules bioactives les plus abondantes trouvées dans le romarin sont répertoriées dans le **tableau 8**.

La composition des composés bioactifs peut varier en fonction de facteurs tels que la variété, l'origine et la méthode d'extraction. Les composés les plus répandus trouvés dans le romarin sont le camphre (27-35%), l' α -pinène (11-22%) et le 1,8-cinéole (12%). D'autres composés trouvés en plus petites quantités comprennent l'acide carnosique (12%), l'acide rosmarinique (27%) et l'acide ursolique (6%) (111).

Tableau 8 : Tableau démontrant les variables molécules bioactives présentes dans le romarin (111)

Principaux monoterpènes	1,8-cinéole (eucalyptol), Camphre, α -pinène, bornéol, β -pinène, Verbenone, Limonene y p-cymene, Sesquiterpènes
Principaux diterpènes	Acide carnosique, carnosol, rosmarol, épirosmanol, isorosmanol et rosmaridifénol
Principaux triterpènes	Acide oléanolique, acide ursolique, bétuline, α -amyrine et β -amyrine
Flavonoïdes	Lutéoline, apigénine, genkwanine, diosmétine, hispiduline, 5-hydroxi-7, cirsimaritrine
Acides phénoliques	Acide caféique, acide chlorogénique et acide rosmarinique

IV.2 - Composition de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* :

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés organiques volatils qui sont responsables de leur arôme caractéristique et de leurs propriétés thérapeutiques. La composition de ces composés volatils peut différer légèrement de celle de la plante elle-même, cette composition varie en fonction de facteurs tels que l'espèce végétale, les conditions de croissance et la méthode d'extraction. Parmi ces composés, on retrouve l' α -pinène, le camphène, le β -pinène, le β -myrcène, l' α -phellandrène, le limonène, le γ -terpinène, ainsi que des monoterpènes oxygénés tels que le 1,8-cinéole, le linalol, le (+)-camphre, l'isobornéol, le bornéol et l' α -terpinéol. On retrouve également des hydrocarbures sesquiterpéniques tels que le verbenone, le β -caryophyllène, le β -farnésène et le γ -muurolène, ainsi que des sesquiterpènes oxygénés tels que l'oxyde de caryophyllène (113).

IV.3 - Propriétés physiques de l'huile essentielle du romarin :

Pour caractériser les propriétés physiques de l'HER, il faut mesurer plusieurs paramètres. Ces paramètres peuvent varier en fonction de la composition de l'HE. Il peut exister en effet plusieurs chémotypes de romarin, qui se distinguent par leur teneur en différents constituants. Le tableau ci-dessous présente les caractéristiques physiques de l'HERO (114):

Tableau 9 : Tableau démontrant les différentes caractéristiques physiques de l'huile du romarin

Propriété	Valeur
Apparence	Liquide clair, incolore à jaune pâle ou jaune verdâtre
Odeur	Balsamique et camphré
Point de fusion/congélation	< -20 °C
Plage d'ébullition	158-210 °C à 1034 hPa
Plage de densité	0.892 to 0.920
Pression de vapeur	225,23 Pa à 25°C
Plage de solubilité dans l'eau	0.54 - 1767.3 mg/L à 25°C
Point d'auto-inflammation	265 °C à 98925-100666 Pa

IV.4 - Utilisations et applications de l'huile de romarin :

Rosmarinus officinalis, est une herbe à feuilles persistantes polyvalente utilisée depuis des siècles dans la médecine traditionnelle et les arts culinaires. L'huile de romarin, extraite des feuilles de cette herbe, a beaucoup attiré l'attention ces dernières années en raison de ses diverses propriétés thérapeutiques. De l'aromathérapie aux soins de la peau, les utilisations de l'huile de romarin sont nombreuses et diverses. Dans cette partie-là, nous allons explorer les différentes applications de l'huile de Romarin :

- **Soin des cheveux :** La perte de cheveux peut être causée par divers facteurs tels que les infections, l'âge, les changements hormonaux. Des études suggèrent que le romarin peut inverser certaines des formes les plus courantes de perte de cheveux. La calvitie masculine qui est due à la DHT, un sous-produit de la testostérone qui attaque les follicules pileux. L'huile de romarin peut empêcher la DHT de se lier aux récepteurs hormonaux, ce qui peut entraîner la repousse des cheveux. Une étude de **2015** a révélé que l'HERO favorisait la croissance des cheveux et provoquait moins de démangeaisons du cuir chevelu que le minoxidil (115).
- **Pesticide :** Dans une étude, l'huile de romarin s'est avérée avoir l'effet répulsif le plus long sur les moustiques *Aedes aegypti*, qui propagent le virus **Zika**, et une dilution de 12,5 % d'huile de romarin a repoussé 100 % des moustiques pendant 90 minutes (116). De plus, un spray contenant 10% d'huile de romarin était aussi efficace que l'insecticide chimique **bifenthrine** pour contrôler la propagation des tiques à pattes noires qui hébergent la maladie de Lyme dans les zones infestées de tiques du nord-est des États-Unis (117).
- **Pour diminuer le stress :** Dans une étude menée auprès d'étudiants en soins infirmiers, ceux qui ont inhalé de l'huile de romarin à partir d'un inhalateur avant et pendant leurs examens ont vu leur pouls diminuer d'environ 9 % par rapport à ceux qui n'ont pas utilisé d'huile de romarin (118). Le pouls réduit est une indication des niveaux de stress réduits. De plus, une autre étude a révélé que les jeunes adultes qui reniflaient de l'huile de romarin pendant 5 minutes avaient des niveaux inférieurs de cortisol, une hormone du stress, par rapport à ceux qui sentaient un composé non aromatique (5).

IV.5 - Activités thérapeutiques de l'huile essentielle du romarin :

Le romarin, l'herbe parfumée originaire de la région méditerranéenne est utilisée depuis des siècles dans la médecine traditionnelle et les pratiques culinaires. L'huile essentielle de romarin, extraite des feuilles de la plante, a gagné en popularité ces dernières années pour ses bienfaits thérapeutiques potentiels. Parmi les activités thérapeutiques les plus prometteuses de cette huile essentielle, on évoquera :

a) L'activité antioxydante : L'huile essentielle de romarin est connue pour sa puissante activité antioxydante, qui est principalement attribuée à ses principaux constituants chimiques, le carnosol, l'acide carnosique, l'acide ursolique, l'acide rosmarinique et l'acide caféique. Ces composés présentent une activité de piégeage des radicaux libres significative et ont donc le potentiel de protéger les cellules contre le stress oxydatif et les dommages causés par les radicaux libres. Les propriétés antioxydantes de l'huile ont été démontrées dans diverses études, y compris des modèles *in vitro* et *in vivo* (119).

b) L'activité anti-inflammatoire : L'huile essentielle du romarin est traditionnellement utilisée pour ses propriétés anti-inflammatoires, et des recherches récentes ont fourni des preuves à l'appui de son efficacité. Les principaux monoterpènes présents dans l'HE du romarin diminuent l'activité du facteur de transcription $\text{NK-}\kappa\text{B}$, entraînant une diminution de la synthèse des médiateurs pro-inflammatoires, tels que le $\text{TNF-}\alpha$ et l' $\text{IL-1}\beta$. La normalisation des paramètres de l'huile, l'utilisation de nano émulsions pour améliorer la biodisponibilité pourraient optimiser l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle (120).

Dans une étude menée par **Borges et al (2019) (120)**, il a été démontré que le 1,8-cinéol et l' α -pinène bloquent l'action du 5-LOX, empêchant la formation de cytokines pro-inflammatoires, tandis que le 1,8-cinéol seul ou en association avec le myrcène agit sur le blocage de la COX-1 et COX-2. Il est proposé que le camphre interagisse avec PGI₂ et COX-2, bien qu'il ait un nombre élevé d'interactions possibles. Dans l'ensemble, ces composés ont le potentiel de moduler la voie de cascade de l'acide arachidonique et de réduire l'inflammation.

c) **L'activité antimicrobienne et antifongique** : L'un des principaux bénéfices du romarin est ses deux activités antimicrobienne et antifongiques, qui sont attribuées à l'huile essentielle extraite de ses feuilles. L'huile essentielle de romarin contient divers composés qui ont des effets différents sur différents micro-organismes. Certains des composés les plus importants sont (121):

- ***a-pinène*** : C'est un monoterpène qui a un arôme de pin. Il peut représenter 2 à 25% de la composition de l'huile de romarin, selon la variété de plante et les conditions de croissance. Il a été démontré qu'il a une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives, telles que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, et une activité antifongique contre *Candida albicans*.

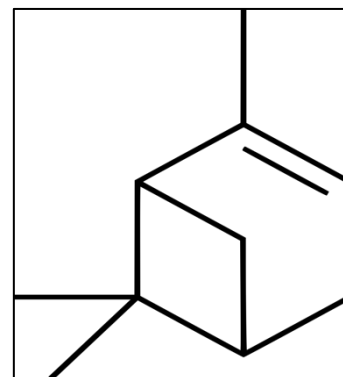


Figure 26 : Structure chimique de de l'a-pinène (200)

- ***Camphre*** : C'est une cétone qui a une odeur forte et pénétrante. Il peut constituer 2 à 14% de la composition de l'huile de romarin. On a découvert qu'il avait une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

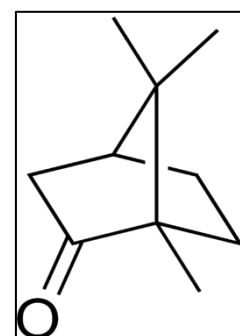


Figure 27 : Structure chimique du camphre (202)

- ***1,8-cinéole*** : C'est un oxyde qui a un arôme frais. Il peut constituer 3 à 89% de la composition de l'huile de romarin. Il a été démontré qu'il a une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, telles que *Staphylococcus aureus*, et *Escherichia coli*, et une activité antifongique contre *Candida albicans*.

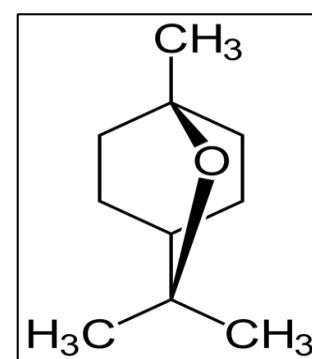


Figure 28 : Structure chimique du 1,8-cinéole (203)

d) Activité analgésique : L'huile essentielle de romarin s'est avérée posséder des propriétés analgésiques à action centrale, selon des études menées par **A. Raskovic et al (2015)** à l'aide d'un essai sur plaque chauffante, ces résultats suggèrent que l'huile de romarin peut être utile dans la gestion de la douleur. De plus, l'étude indique que la combinaison de l'HE avec des médicaments analgésiques peut améliorer son potentiel thérapeutique. Il est important de noter que de nombreux monoterpènes présentent une relation dose-réponse non linéaire, de sorte que la dose appropriée de l'HE doit être déterminée pour obtenir des effets thérapeutiques optimaux tout en évitant tout effet indésirable dû aux interactions (126).

e) Activité anti tumoral : Des études récentes ont exploré ses effets anticancéreux potentiels, en particulier ses principaux polyphénols, l'acide carnosique et l'acide rosmarinique. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'extrait de romarin et ses polyphénols possèdent de puissants effets anticancéreux contre divers types de cancer tels que le cancer du sein et du côlon. L'acide carnosique et l'acide rosmarinique peuvent cibler des voies spécifiques conduisant à l'induction de l'apoptose et à une diminution de la survie cellulaire, ce qui en fait des produits chimiques potentiels pour des traitements ciblés contre le cancer pour améliorer les effets des chimiothérapies actuelles. Bien que les études existantes fournissent des preuves à l'appui de l'utilisation de ces composés, des études animales plus systématiques sont nécessaires avant que des études humaines puissent être lancées pour déterminer les doses appropriées, les voies d'administration, les taux plasmatiques, les voies de signalisation et les éventuels effets toxiques associés à l'administration chronique (127).

L'huile essentielle de romarin est connue pour ses nombreuses propriétés bénéfiques pour la santé. Elle est utilisée depuis des siècles en aromathérapie pour soulager diverses affections. Les indications de l'huile essentielle de romarin sont nombreuses et variées, allant des troubles respiratoires aux douleurs musculaires, en passant par les problèmes de peau tels que l'eczéma et le psoriasis aux troubles digestifs (128). Cette huile essentielle est également reconnue pour son effet stimulant sur la circulation sanguine et le système nerveux (129). De plus, elle est souvent utilisée comme ingrédient dans les cosmétiques et les produits de soins personnels pour ses propriétés nourrissantes et raffermissantes pour la peau.

PARTIE EXPERIMENTAL

Introduction :

L'objectif de cette section de cette thèse est de décrire la méthodologie utilisée pour encapsuler l'huile essentielle du romarin dans les nanoparticules de chitosan et d'alginate associé à son copolymère. Cette technique d'encapsulation est une méthode efficace pour améliorer la stabilité et la biodisponibilité des HE et la libération contrôlée de ces molécules actives. Dans cette étude, nous avons utilisé le chitosan et l'alginate comme polymère d'encapsulation en raison de leurs propriétés biomédicales, telles que leurs biocompatibilité, leurs non-toxicité et leurs capacité à protéger les molécules actives. La caractérisation des propriétés physico-chimiques des nanoparticules telle que la taille, la morphologie, la charge de surface, la stabilité et la libération de l'huile essentielle, a été effectuée par différentes techniques analytiques, elles ont été effectuées afin d'évaluer l'efficacité de l'encapsulation. Cette section fournira une description détaillée de la méthodologie utilisée pour synthétiser les nanoparticules encapsulant l'huile de romarin, caractériser leurs propriétés physico-chimiques, tout en évaluant leurs différentes activités pharmacologiques, ainsi que celle de l'huile de romarin seul.

Démarche expérimentale : La démarche expérimentale de notre travail portant sur la nanoencapsulation de l'huile essentielle de romarin sera résumée dans le schéma ci-dessous, Ce schéma met en évidence les différentes étapes clés de notre recherche :

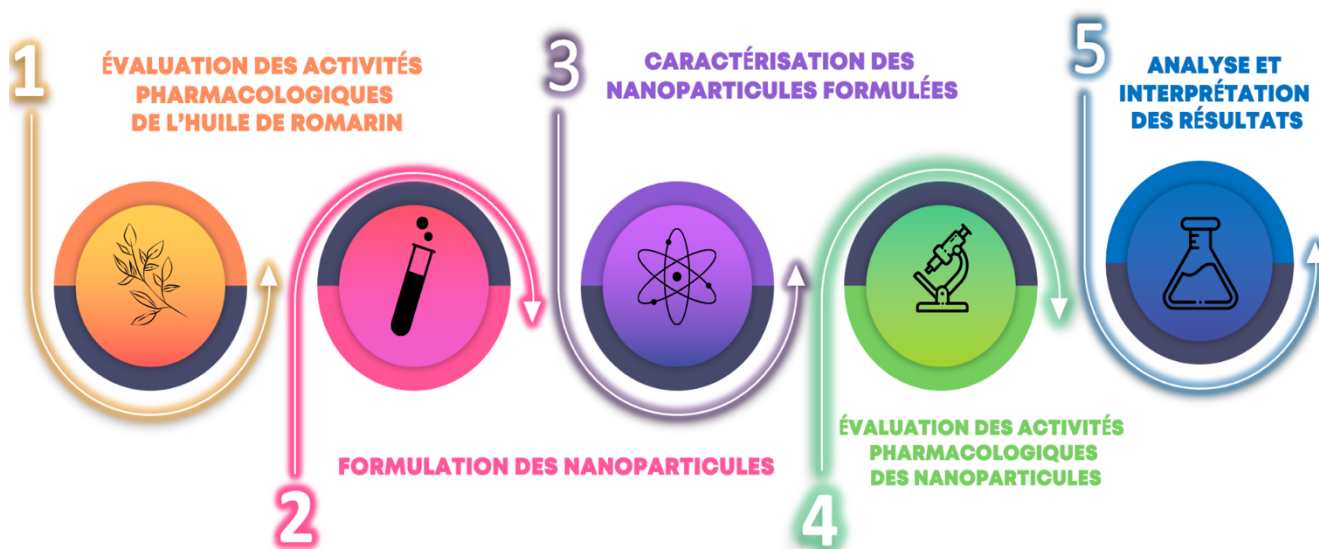
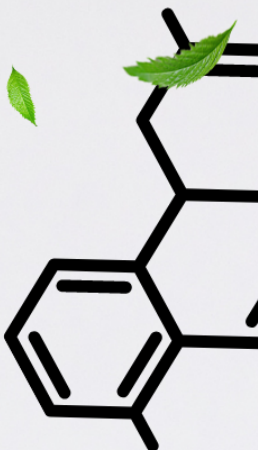
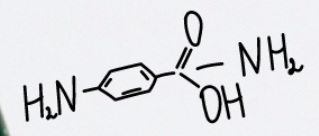
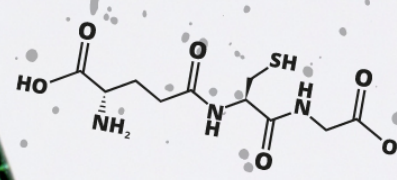
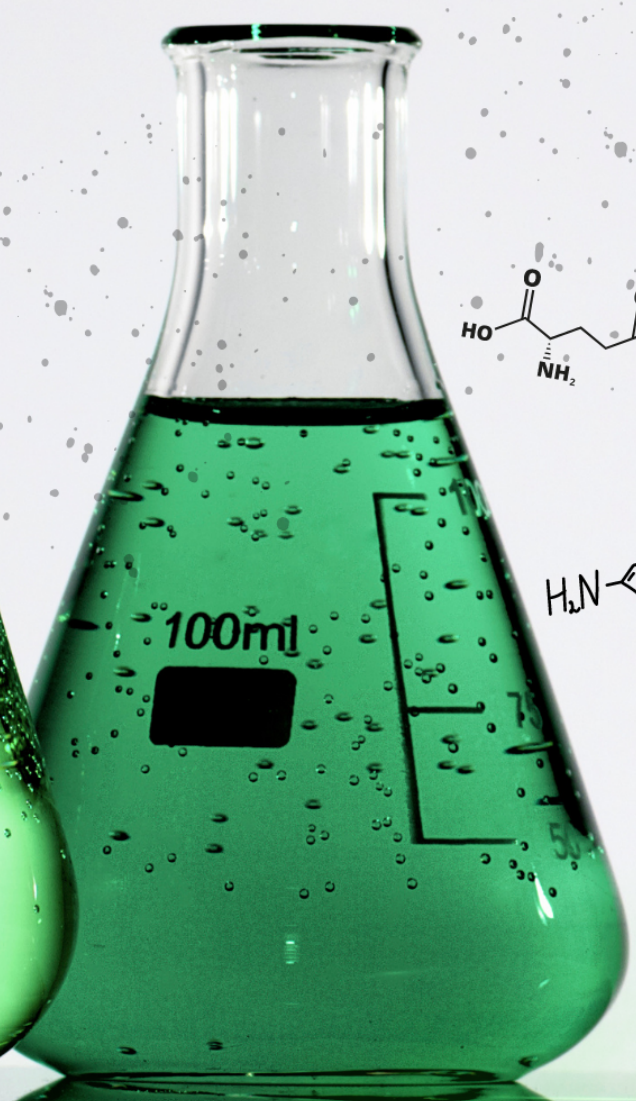


Figure 29 : Schéma représentant les différentes étapes de la démarche expérimentale



CHAPITRE 01

MATÉRIELS ET MÉTHODES



I - Matériel :

I.1 - Matériel végétale :

Dans cette étude, l'huile essentielle de romarin a été fournie par la société Bio extrapamal d'Oued Alleug. Cette huile a été obtenue par hydrodistillation des parties feuilles et rameaux de la plante *Rosmarinus officinalis*, à une température de 100°C et une pression de 0 bar. La plante a été récoltée dans les montagnes de "Djebel Nador" de la région de Tipaza, vers le 14 mars 2023. Le mode de culture de la plante est sauvage, ce qui signifie qu'elle n'a pas été cultivée de manière intentionnelle. L'huile essentielle de romarin obtenue à partir de cette plante est de qualité 100% pure, ce qui signifie qu'elle ne contient aucun additif ni conservateur. La qualité de l'huile essentielle de romarin dépend en grande partie des conditions de culture et de la méthode d'extraction utilisée qui dans ce cas ont été soigneusement contrôlées pour garantir la qualité de l'huile utilisée dans cette étude.



Figure 30 : Fiche technique de l'huile essentielle du romarin

Figure 31 : L'huile essentielle de romarin étudiée

I.2 - Matières premières et réactifs :

- **Alginate de sodium** : L'alginate de sodium est un polymère naturel extrait des algues brunes. Il a de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétique et médicale. Il peut former des gels, des films, des fibres et des sphères en présence de certains cations comme le calcium ou le magnésium. Il est utilisé comme épaississant, stabilisant, émulsifiant, agent de texture et de libération contrôlée. Il se présente sous la forme d'une poudre blanche ou jaunâtre, soluble dans l'eau (67).

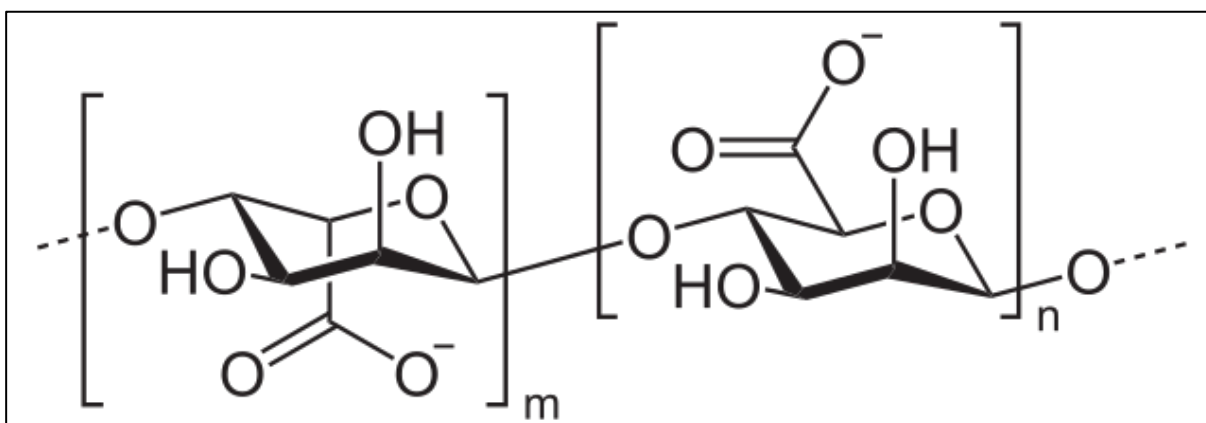


Figure 32 : Structure chimique de l'alginate de sodium (69)

Tableau 10 : Propriétés physicochimiques de l'alginate de sodium

Propriété	Valeur
Formule chimique	$(C_6H_7O_6Na)_n$
Aspect	Poudre ou granules blanc ou jaune pâle
Solubilité	Soluble dans l'eau
pH de dissolution	4-5
Viscosité	Élevée, forme des solutions visqueuses
Densité	1,5 g/cm ³
Fournisseur	Sigma Aldrich

• **Chitosane** : Le chitosane est un polyaminosaccharide, un polymère de N-glucosamine, lié par des liaisons β -1,4-glycosidiques, linéaire naturel qui est produit par la désacétylation alcaline de la chitine qui est le principal constituant des cuticules protectrices présentes chez divers crustacés tels que les crabes, les crevettes, ainsi que dans les parois cellulaires de certains champignons comme l'aspergillus et le mucor. Le chitosan est une substance peu coûteuse, biodégradable et non toxique pour les mammifères, ce qui le rend utilisable comme additif dans l'industrie alimentaire. De plus, il est utilisé comme agent hydratant dans les cosmétiques, agent pharmaceutique pour la préparation de la biomédecine. Bien qu'étant une base faible, le chitosane est insoluble dans l'eau et les solvants organiques (130).

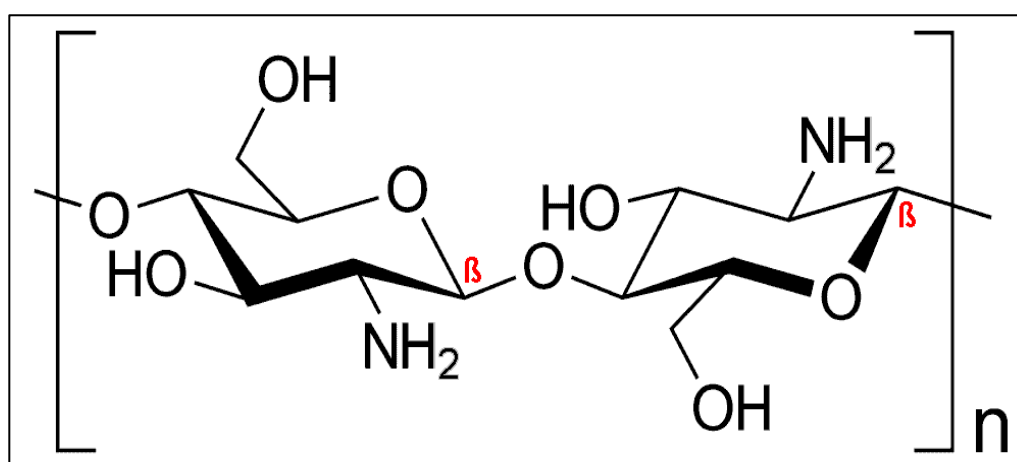


Figure 33 : Structure chimique du chitosane (126)

Tableau 11 : Propriétés physicochimiques du chitosane

Propriété	Valeur
Formule chimique	$(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$
Aspect	Solide blanc ou légèrement coloré
Solubilité	Insoluble dans l'eau, soluble dans les acides et les solvants organiques
Masse moléculaire	Élevée, généralement entre 100 000 et 1 000 000 Da
Point de fusion	Entre 200-250°C
Biocompatibilité	Non toxique et biodégradable
Fournisseur	Sigma Aldrich

• **Tween 80** : Le Tween® 80 est un type de détergent non ionique capable de dissoudre efficacement les protéines membranaires lors du processus d'isolement des complexes membrane-protéine, ce qui en fait un choix idéal dans notre thèse. Également connu sous le nom de polysorbate 80 ou monooléate de polyoxyéthylène sorbitan, il contient de faibles niveaux d'impuretés, notamment des sels, des peroxydes, des aldéhydes et des composés carbonylés. Avec un poids moléculaire de 1,31 kDa, il s'agit d'un ester de polyéthylène sorbitol qui peut fonctionner comme émulsifiant et stabilisant dans divers produits tels que les produits pharmaceutiques, les cosmétiques et les aliments. Le Tween 80 est soluble dans l'alcool (131).

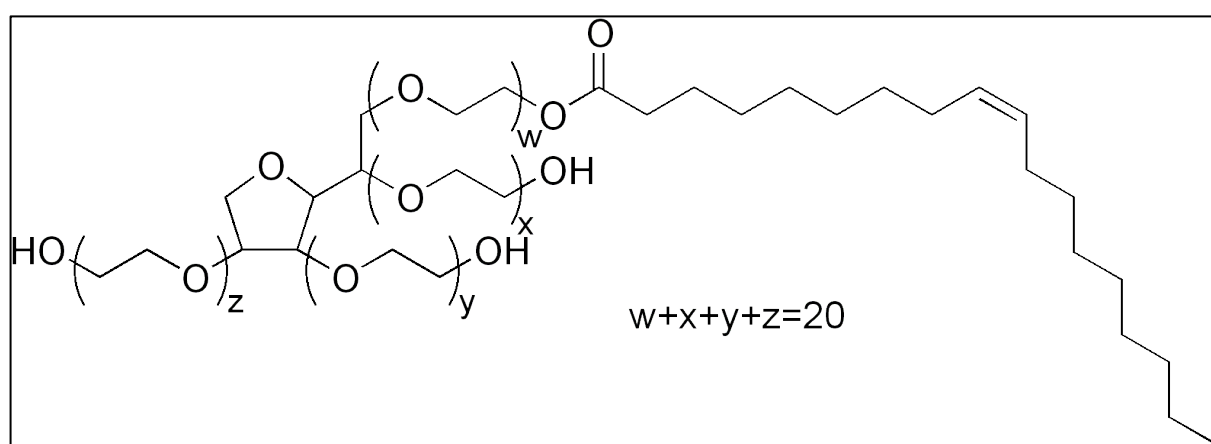


Figure 34 : Structure chimique du Tween® 80 (128)

Tableau 12 : Propriétés physicochimiques du Tween 80 (Polysorbate 80)

Propriété	Valeur
Formule chimique	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆
Aspect	Liquide huileux transparent
Solubilité	Soluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques
Masse molaire	1310 g/mol
Point de fusion	-2 °C
Densité	1.06 g/cm ³

• **Tripolyphosphate de sodium (STPP)** : Le tripolyphosphate de sodium est un composé inorganique blanc, qui se présente sous forme de cristaux ou de poudre ayant de multiples applications industrielles, notamment comme additif alimentaire pour améliorer la texture et la conservation des aliments, ainsi que dans l'industrie des détergents comme agent de chélation pour réduire la dureté de l'eau. Il est classé comme étant généralement considéré comme sûr ce qui indique qu'il ne présente aucun risque connu pour la santé sur la base d'une utilisation antérieure. Sa formule chimique est $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, ce qui indique qu'il est constitué de cinq ions sodium et de trois ions phosphate. Le tripolyphosphate de sodium est un agent réticulant largement utilisé dans la préparation de nanoparticules, en particulier pour l'encapsulation de divers agents thérapeutiques (133).

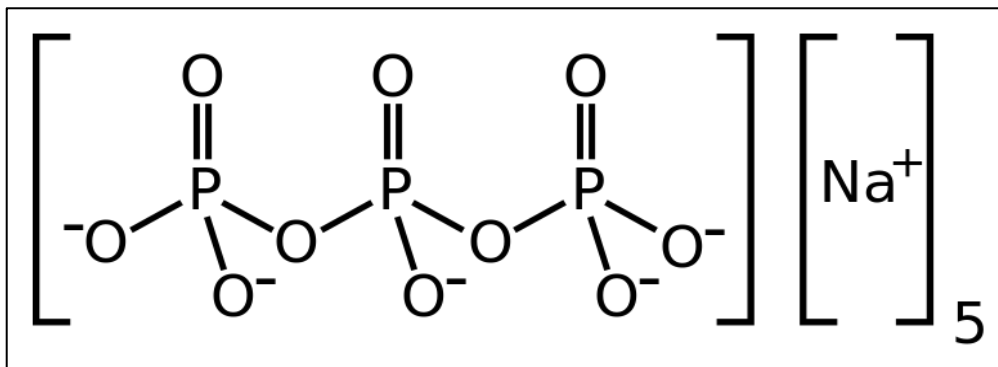


Figure 35 : Structure chimique du Tripolyphosphate de sodium (130)

Tableau 13 : Propriétés physicochimiques du Tripolyphosphate de sodium

Propriété	Valeur
Formule chimique	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$
Aspect	Poudre blanche
Solubilité	Soluble dans l'eau
Masse molaire	367,86 g/mol
Point de fusion	622°C
Densité	2,52 g/cm ³
Fournisseur	Entreprise belge

- **Carbonate de calcium** : Le carbonate de calcium, également appelé calcite, aragonite ou craie, est un composé chimique de formule moléculaire CaCO_3 . C'est une poudre microcristalline blanche, inodore et insipide. Le carbonate de calcium se trouve en abondance dans la nature et constitue des roches telles que le calcaire et la craie. C'est également un constituant sédimentaire répandu dans les océans modernes et anciens, comprenant environ 10% des sédiments (135).

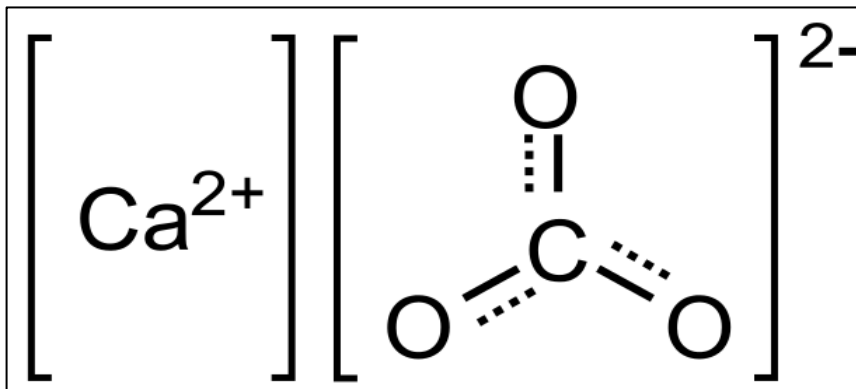


Figure 36 : Structure chimique du carbonate de calcium (132)

Tableau 14 : Propriétés physicochimiques du carbonate de calcium

Propriété	Valeur
Formule chimique	CaCO_3
Aspect	Poudre fine, blanche à blanc cassé
Solubilité	Faiblement soluble dans l'eau
Masse molaire	100,09 g/mol
Point de fusion	825 °C
Densité	2,71 g/cm ³

- **DPPH** : Le DPPH, abréviation de 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle, est un puissant radical libre capable d'accepter l'hydrogène des antioxydants. Il est largement utilisé dans les tests DPPH pour mesurer l'activité antioxydante de diverses substances biologiques, y compris les plantes médicinales. Ce test est un outil précieux pour évaluer l'efficacité des antioxydants dans le piégeage des radicaux libres et la protection contre les dommages oxydatifs (137).

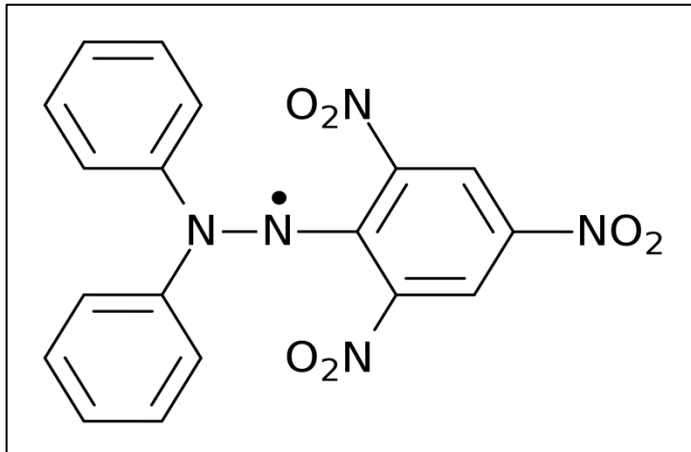


Figure 37 : Structure chimique du DPPH (136)

- **Carraghénine** : Le carraghénine (CGN) est un polysaccharide de haut poids moléculaire obtenu à partir d'algues rouges. Il est composé de résidus de D-galactose qui sont liés entre eux par des liaisons β -1,4 et α -1,3 galactose-galactose. Ce composé naturel est largement utilisé dans l'industrie alimentaire comme additif alimentaire. Le CGN est également largement utilisé dans des modèles in vitro et animaux comme agent inflammatoire et adjuvant pour étudier les processus immunitaires et évaluer l'efficacité des médicaments anti-inflammatoires. Il peut activer les voies immunitaires innées, affecter la composition du microbiote intestinal et avoir un impact sur l'épaisseur de la barrière muqueuse (138).

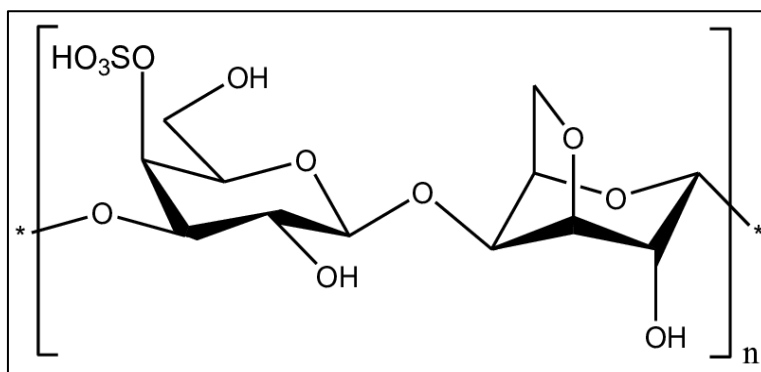


Figure 38 : Structure chimique du κ -carraghénane (135)

La liste des réactifs employés durant cette étude a été résumée dans le ci-dessous :

Tableau 15 : Liste des réactifs employés dans notre étude



Réactif	Formulation chimique
Éthanol	Considérée comme solvant
Méthanol	Employée comme solvant
Eau distillé	Eau de haute pureté
Eau physiologique	Solution stérile isotonique
Solution tampon phosphate	Maintenir un pH stable
Bromure de potassium KBR	Réactif utilisé dans l'analyse par FTIR
Acide acétique	Utilisé comme solvant

1.3 - Matériel biologique :

a) Matériel microbiologique :

- **Antibiotique** : Le choix du contrôle positif utilisé lors de notre étude s'est porté sur l'antibiotique la gentamicine 10 mg en raison de son large spectre d'activité antibactérienne.
- **Milieux de culture** : Les milieux de cultures utilisés lors de ce mémoire comprennent le milieu de gélose nutritive (GN), le milieu Mueur Hunton (MH) et le milieu Saboraud associé à chloramphénicol, ainsi que le milieu BHIB (Bouillon cœur-cerveille). Ces milieux ont été choisis pour leur capacité à soutenir la croissance et la survie des micro-organismes étudiés, chaque milieu a été choisi en fonction de la méthode employée.

Tableau 16 : Tableau représentant les différents milieux de cultures utilisés dans notre

Milieu de culture	Fournisseur	Modèle
Mueur Hunton	Institut pasteur d'Algérie	
Saboraud associé à chloramphénicol	Institut pasteur d'Algérie	
Gélose nutritive	Institut pasteur d'Algérie	
Bouillon cœur-cervelle	Institut pasteur d'Algérie	

- **Souches microbiennes :**

Les souches microbiennes utilisées dans notre étude ont été gentiment fournies par le laboratoire de biologie, unités de microbiologie et de sérologie au sein de l'Établissement Hospitalier Spécialisé en Transplantation d'Organe et Tissus (EHS TOT) Blida. Pour notre étude, nous avons cherché à tester un grand nombre de souches microbiennes.

Le tableau ci-dessous présente la liste d'organismes pathogènes rencontrés durant notre étude, leurs caractéristiques et les types d'infections qu'ils peuvent causer :

Tableau 17 : Tableau représentant les souches bactériennes et fongiques étudiés

Microorganisme	Description	Référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Issue de la souche de référence ATCC 25923. C'est une bactérie gram positive pathogène responsable d'infections de la peau et des tissus mous chez l'homme. Elle peut également causer des infections graves	(141)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Issue de la souche de référence ATCC 29212. Bactérie gram positive , se trouve couramment dans le GIT humain. Bien qu'elle soit normalement considérée comme une bactérie commensale, elle peut provoquer des infections graves, en particulier chez les patients immunodéprimés	(142)
<i>Escherichia coli</i>	Issue de la souche de référence ATCC 25922. C'est une bactérie intestinale. Certaines souches d'E. coli sont pathogènes et peuvent causer des infections gastro-intestinale	(143)
<i>Salmonella enteritidis</i>	Pathogène isolé à partir de selles. Une bactérie pathogène transmise par les aliments. Elle provoque des infections gastro-intestinales, y compris la salmonellose	(144)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Issue de la souche de référence ATCC 27853. Bactérie opportuniste qui peut provoquer des infections chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli	(145)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pathogène. Bactérie gram négative présente dans l'intestin humain. Elle peut causer des infections opportunistes en particulier chez les patients hospitalisés	(146)
<i>Serratia marcescens</i>	Pathogène isolé à partir des urines. Bactérie gram négative qui peut être trouvée dans divers environnements. Elle est souvent associée aux infections nosocomiales	(147)

<i>Candida albicans</i>	Pathogène isolé à partir de cathéter centrale. C'est un champignon pathogène courant qui peut provoquer des infections opportunistes chez les personnes immunodéprimées	(148)
<i>Candida kefyr</i>	Pathogène isolé à partir des urines. Une levure qui a été isolée pour la première fois à partir du kéfir. Bien que rarement associée à des infections chez l'homme, elle peut provoquer des infections opportunistes	(149)
<i>Candida glabrata</i>	Pathogène isolé à partir des urines. C'est une levure pathogène qui peut provoquer des infections superficielles et systémiques chez les personnes immunodéprimées. Elle est souvent résistante aux médicaments antifongiques couramment utilisés	(150)

b) Matériel animal :

Dans notre étude, nous avons utilisé un total de 23 souris qui ont été obtenues auprès de l'Institut Pasteur, une institution renommée dans le domaine de la recherche biomédicale. Les souris avaient un poids moyen correspondant à $23 \text{ g} \pm 2$, garantissant une homogénéité relative au sein de chaque lot.

Elles ont été logées dans des cages appropriées offrant un environnement diurne selon les conditions naturelles. Les souris avaient un accès libre à une alimentation standardisée et à de l'eau potable afin de répondre à leurs besoins nutritionnels. Ces conditions ont été maintenues tout au long de l'expérience pour assurer le bien-être des animaux et minimiser les variables potentielles pouvant influencer les résultats de l'étude.



Figure 39 : Ensemble des lots de souris qui ont subi les expérimentations



Figure 40 : Illustration de l'un des lots de souris

I.4 - Équipement et matériels utilisés :**Tableau 18 : Récapitulatif des appareils employés lors de ce travail**

Appareil	Intérêt
Agitateur magnétique	Mélanger des solutions ou des échantillons
Analgesy-Meter (Ugo basile)	Mesurer le potentiel analgésique
Balance analytique	Mesurer avec précision la masse d'un objet
Bec bensen	Protéger l'environnement de travail contre les contaminations
Centrifugeuse	Séparer les composants d'un mélange
Densimètre (Densichек)	Mesurer la densité d'un liquide
DLS (Hobero)	Mesurer la taille des particules
Étuve (Memmert)	Chauffer et sécher des échantillons
Microscope optique	Observer et étudier des échantillons
MEB (Quanta 650)	Observe la structure et la morphologie des échantillons
Presses de laboratoire pour FT-IR	Réaliser des pastilles en KBR
pH mètre (Hanna instruments)	Mesurer le pH d'une solution
Réfrigérateur	Conserver des échantillons à basse température
Spectrophotomètre UV-VIS (Jenway)	Mesurer l'absorbance ou la transmittance des échantillons dans le spectre UV-VIS
FTIR – 8900 (Shimadzu)	Analyse les vibrations moléculaires des échantillons
Vortex agitateur	Mélanger vigoureusement des échantillons

II – Mode opératoire :

II.1 - Étude des activités microbiologiques de l'huile de romarin:

II.1.1 - Étude de l'activité antibactérienne in vitro de l'huile de romarin :

On entame notre première partie de ce travail réalisé au niveau du laboratoire de biologie, unité de microbiologie, au sein de l'Établissement Hospitalier spécialisé en Transplantation d'Organe et Tissus (EHS TOT) Blida, par l'évaluation de l'activité antibactérienne in vitro de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* sur sept souches bactériennes différentes cités dans le **Tableau 17**.

Pour cela, nous avons utilisé, le principe de l'aromatogramme qui fut mise au point la première fois par *Schroeder et Messing* en 1949 (151), ce principe partage presque les mêmes similarités que l'antibiogramme, à l'exception que lors de l'aromatogramme on utilise l'HE à la place des antibiotiques. L'aromatogramme est basé deux méthodes: la méthode de puits et la méthode de diffusion sur milieu solide (152).

a) Principe de la technique : Méthode de puits : La technique de la méthode de puits qui a été décrite par *Nathan & al* en 2018 (153) consiste à creuser des puits dans un milieu de culture solide inoculé avec une souche bactérienne. On dépose ensuite dans chaque puits une goutte correspondant à un volume connu d'huile à tester. L'HE diffuse dans le milieu de culture et crée une zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour du puits. La taille de cette zone permet d'évaluer l'activité antibactérienne de l'HE (153).

b) Principe de la technique : Diffusion sur milieu solide : La technique de disques vierges est une méthode qualitative qui a été décrite la première fois par *Kirby et Bauer* en 1966 (154), Elle consiste à déposer des disques stériles imprégnés d'une quantité déterminée d'HE sur la surface d'une gélose ensemencée. L'HE après incubation, diffuse dans la gélose et crée une zone d'inhibition autour du disque (155).

II.1.2 - Protocole expérimental pour évaluer l'activité antimicrobienne:

Lors de la réalisation de ce travail, plusieurs précautions ont été prises pour garantir la sécurité et la fiabilité des résultats obtenus :

- Porter une blouse, des gants en latex pour assurer la sécurité et l'hygiène.
- Travailler sous le bec, nettoyer et désinfecter tous les instruments avant et après chaque utilisation afin d'éviter toute contamination croisée.
- Désinfecter régulièrement les surfaces de travail avec un désinfectant.

a) Ré isolement des souches bactériennes (ATCC/Pathogène) : Afin de réisoler les souches bactériennes d'ATCC/Pathogène dans le milieu GN, on doit suivre les étapes suivantes :

- Prélever grâce à une anse de platine stérile quelques colonies bien isolés de la souche bactérienne des 7 souches bactériennes à étudier et effectuer par la suite un ensemencement en stries sur la surface du milieu GN solide, on répète l'opération pour chaque boîte de Pétri, on incube ensuite les boîtes à 37°C dans une étuve pendant 18 à 24 heures.

- On identifie les boîtes avec le nom, le code de la souche bactérienne.

Pour chaque inoculum on désigne :

A : *Staphylococcus aureus*

B : *Salmonella entiritidis*

C : *Enterococcus faecalis*

D : *Escherichia coli*

E : *Serratia marcescens*

F : *Klebsiella pneumoniae*

G : *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 41 : Exemple d'un ré isolement d'une souche bactérienne

b) Préparation de la suspension bactérienne : La préparation de la suspension bactérienne est une étape importante pour réaliser l'aromatogramme, voici les principales étapes à suivre :

- A partir de cultures jeunes (18 heures) sur les milieux de Géloses nutritives (GN), on prélève 3 à 5 colonies bien isolées et identiques qu'on transfère dans 5 ml d'eau physiologique stérile.

- On agite ensuite au vortex pendant quelques secondes pour homogénéiser chaque suspension pour chaque germe étudié. Ensuite, il est important de standardiser les suspensions à une densité optique de 0,5 à 0,6 McFarland à l'aide d'un densimètre.

- La suspension bactérienne est prête à être utilisée pour les tests d'activité antibactérienne en essayant d'éviter de dépasser 15 minutes après la préparation, car les bactéries peuvent continuer à se multiplier, ce qui faussera les résultats de l'expérience.

c) Ensemencement : L'ensemencement des souches bactériennes se fera un écouvillon sur milieu MH. On ensemence donc la totalité de la surface de la gélose MH par écouvillonnage dans trois directions, en effectuant une rotation d'environ 60 degrés à chaque fois en réalisant des stries serrées. Le même processus est répété pour chaque suspension bactérienne à tester .



Figure 42 : Illustration démontrant l'ensemencement d'une souche bactérienne

d) **Réalisation de l'aromatogramme** : L'aromatogramme est une technique qui permet de tester l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Pour ce faire, nous utiliserons deux méthodes, à savoir la méthode de diffusion sur milieu solide des disques vierges et la méthode de puits décrites précédemment, un disque de gentamycine 10 mg a été déposé dans chaque boîte considérée comme étant un contrôle positif le schéma ci-dessous explique les étapes de chaque méthode :

Aromatogramme

MÉTHODE DE DIFFUSION SUR GÉLOSE SOLIDE



MÉTHODE DE PUITS

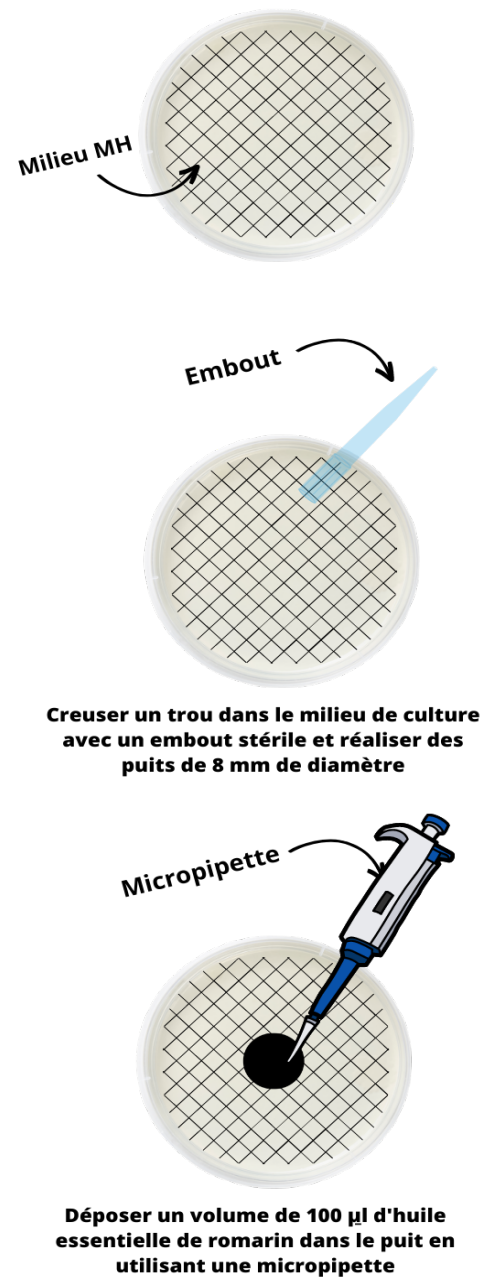


Figure 43 : Schéma représentant les différentes étapes de réalisation de l'aromatogramme

À la suite de l'incubation à 37°C pendant 18 à 24h, on procédera à la lecture des résultats, les résultats d'un aromatoگرامme peuvent être interprétés en mesurant la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour des disques ou des puits contenant l'HE, c'est-à-dire la zone où les micro-organismes ne se sont pas développés. Dans notre étude, nous avons adopté une approche basée sur les travaux de **Djeddi et al (2007)** qui ont classé la sensibilité des différentes souches bactériennes en fonction du diamètre de la zone d'inhibition (156).

Selon cette classification, une zone d'inhibition de diamètre inférieur à 8 mm correspond à une sensibilité nulle de la souche bactérienne testée. Si le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 9 et 14 mm, la souche bactérienne est considérée comme sensible. Pour les souches bactériennes ayant une zone d'inhibition de diamètre compris entre 15 et 19 mm, la sensibilité est qualifiée de très sensible. Enfin, si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 20 mm, la souche bactérienne est qualifiée d'extrêmement sensible (156).

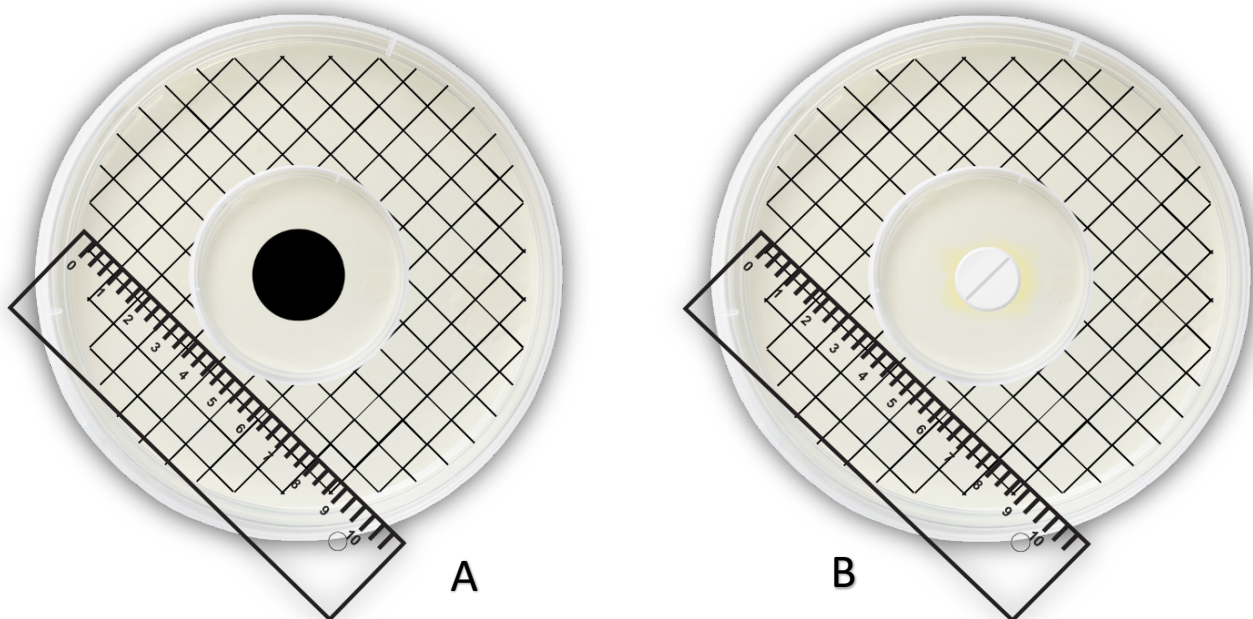


Figure 44 : Illustration de la lecture du résultat de l'aromatogramme. A : Méthode de puits, B : Méthode de disques

e) **Détermination de la CMI :** La CMI, ou concentration minimale inhibitrice, est la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber complètement la croissance d'un microorganisme particulier dans un milieu de culture défini (157). On se basera pour déterminer la CMI de l'HE vis-à-vis les souches bactériennes, sur la méthode de microdilution à l'aide de microplaques de 96 puits décrit par **Aoun et al (2013)** (158).

- **Protocole :** La méthode de microdilution sur 96 puits consiste à préparer des dilutions successives de l'HERO dans le milieu BHIB, puis à les répartir dans les puits de la plaque.

Ainsi, des concentrations d'HE allant de 40% à 0,08% ont été obtenues en mélangeant les dilutions avec un bouillon BHIB et tween 80 à 1% dans des tubes Eppendorf. en se servant d'une micropipette, on procède au dépôt de 10 µl de chaque concentration de dilution de l'huile essentielle dans chaque puits des microplaques en rajoutant 90 µl de la suspension bactérienne contenant environ 10^6 UFC/ml à chaque puit. De cette manière, les concentrations des huiles essentielles dans la microplaque sont comprises entre 4% et 0.008%.

On épargne un puit témoin ne contenant pas l'HE considéré comme contrôle négatif.

L'interprétation des résultats de la microplaque se fera en examinant la turbidité de la suspension bactérienne dans les puits après incubation à 37 C° pendant 18 à 24h . Si les bactéries ont été inhibées par l'huile essentielle, le liquide dans le puits restera clair et transparent. En revanche, si les bactéries ont continué à se développer malgré la présence de l'huile essentielle, le liquide dans le puits deviendra trouble et opaque. Tout en comparant la turbidité du liquide dans les puits témoins (sans huile essentielle) et les puits contenant les différentes concentrations d'huile essentielle pour déterminer si l'huile essentielle a eu un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne.

II.1.3 - Étude de l'activité antifongique in vitro de l'huile du romarin :

On continue notre travail par l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* sur les trois souches fongiques cités dans le **Tableau 17**, réalisé au niveau du laboratoire de biologie, unité de parasitologie, au sein de l'Établissement Hospitalier spécialisé en Transplantation d'Organe et Tissus (**EHS TOT**) Blida.

En vue de cela, nous allons utiliser le même principe que celui utilisé pour l'activité antibactérienne, mais avec quelques adaptations, en employant la méthode de puits et de diffusion sur milieu solide.

II.1.4 - Protocole expérimental pour évaluer l'activité antifongique :

Pour chaque inoculum on désigne :

A : *Candida albicans*

B : *Candida glabrata*

C : *Candida kefyr*

Après avoir réalisé l'aromatogramme pour chaque souche fongique en utilisant le milieu de culture Sabouraud + chloramphénicol et en standardisant les suspensions fongiques à une densité optique d'environ 2 McFarland, nous les avons transférées dans une étuve et incubées à 25 C° - 37 C° pendant 24h à 48h en fonction du type de champignon.

À la suite de l'incubation, les résultats ont été interprétés en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance fongique autour des puits contenant l'huile essentielle de romarin et des disques imprégnés par l'huile. Dans cette étude, nous avons adopté une classification similaire à celle utilisée pour l'activité antibactérienne. Une activité antifongique considérée comme bonne sera caractérisée par une zone d'inhibition allant de 11 à 18 mm, une forte activité correspondra à un diamètre compris entre 20 et 27 mm, tandis que la plus forte activité antifongique sera représentée par une zone de 28 à 30 mm (159).

a) Détermination de la CMI antifongique :

On se basera pour déterminer la CMI de l'huile essentielle de romarin vis-à-vis les souches fongiques, sur la même méthode de microdilution à l'aide de microplaques de 96 puits comme réalisé précédemment pour les souches bactériennes employant cette fois le milieu SC (158).

II.2 - Évaluation de l'activité antioxydante in vitro de l'huile de romarin :

Dans cette étude, nous avons évalué l'activité antioxydante de l'huile essentielle de romarin en utilisant le radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) comme méthode de test qui a été développé par **Blois (1958) (160)**. Le DPPH est couramment utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des composés naturels en raison de sa sensibilité aux antioxydants.

Lorsque le DPPH est réduit par un antioxydant, sa couleur violette caractéristique se transforme en une couleur jaune pâle. Cette réaction de décoloration est mesurée spectrophotométriquement, ce qui permet de quantifier l'activité antioxydante de l'échantillon testé (161). Les antioxydants possèdent la capacité d'interagir avec ce radical DPPH stable en fournissant un électron ou un atome d'hydrogène, entraînant sa réduction en 2,2-diphényl-1-hydrazine (DPPH-H) (162).

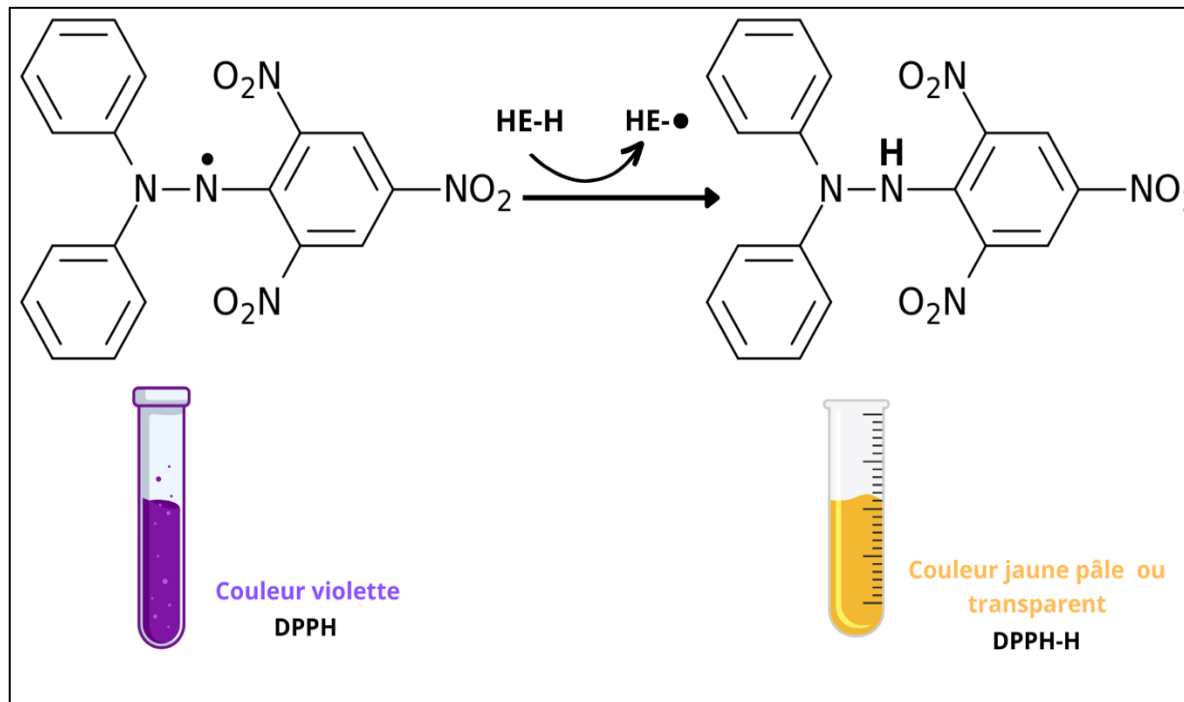


Figure 45 : Représentation schématique de l'activité antioxydante de l'HE avec le DPPH

II.2.1 - Protocole expérimental pour évaluer l'activité antioxydante :

Dans le prolongement de cette étude, nous avons entrepris d'évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de romarin en se basant la méthode de **Molyneux (2004) (163)** avec quelques modifications apportées . Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de biochimie de la Faculté de Médecine de Blida, à l'Université Saad Dahleb Blida. Le protocole expérimental détaillé est présenté ci-dessous, fournissant les directives nécessaires pour mener à bien cette évaluation :

a) Préparation de la solution méthanolique de DPPH :

Afin de préparer la solution de travail de DPPH, on ajoute 2 mg de DPPH à 50 ml méthanol à 99%. On obtiendra une concentration d'environ 4% (m/v). Il est essentiel de préparer cette solution juste avant son utilisation, car le DPPH est sensible à la lumière et à l'oxydation.

b) Préparation des dilutions d'huile essentielle dans le méthanol :

On prépare une série de solutions diluées d'huile essentielle de romarin dans le méthanol. Les dilutions varient à des concentrations de 1 mg/ml à 50 mg/ml.

c) Détermination de l'activité antioxydante :

On mélange 0,2 ml de chaque dilution préparée avec 1,8 ml de la solution méthanolique de DPPH. On agite bien ensuite avec le vortex pour assurer une bonne homogénéisation. Les solutions préparées sont incubées à température ambiante, sous obscurité à l'abri de la lumière pendant environ 30 minutes. Après incubation on mesure l'absorbance de chaque mélange grâce à un spectrophotomètre UV-Vis à une longueur d'onde spécifique de 515 nm, sachant que le blanc de réactif a été préparé de la même manière mais en remplaçant le volume de dilution par un même volume de méthanol (0,2 ml).

d) Calcul des pourcentages d'inhibition (PI) :

Nous avons utilisé l'équation suivante pour calculer le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante des échantillons testés. L'équation employée correspond au :

$$PI(\%) = \frac{(Absorbance\ du\ contrôle - Absorbance\ de\ l'échantillon)}{Absorbance\ du\ contrôle} \times 100$$

À l'aide de l'équation spécifiée précédemment, nous avons pu calculer les pourcentages d'inhibition de l'activité antioxydante pour chaque dilution de l'HE de romarin. Ces pourcentages d'inhibition sont une mesure de l'efficacité de l'HE à neutraliser le radical libre DPPH et à prévenir l'oxydation. Un pourcentage d'inhibition plus élevée indique une activité antioxydante plus forte.

e) Détermination du pourcentages d'inhibition 50 (PI 50) :

À partir des valeurs obtenus de PI(%), une courbe dose-réponse est tracée et le PI50 est déterminé comme la concentration de la substance qui provoque une inhibition de 50 % de l'activité du radical DPPH.



Figure 46 : Préparation de la solution méthanolique de DPPH

II.3 – Préparation des nanoparticules encapsulant l'huile de romarin :

Durant notre thèse de recherche portant sur la formulation des nanoparticules encapsulant l'HER, nous avons formulés 4 essais distincts pour atteindre nos objectifs. Le premier essai consiste à formuler des NPs à base d'alginate associé à son copolymère sur une approche basée par **Natrajan et ses collègues (2015)** avec nos propres modifications **(164)**. En le mélangeant avec le copolymère et notre HER, nous pouvons créer des NPs offrant une protection supplémentaire à l'HE, ainsi qu'une libération contrôlée des composés actifs. Les NPs formulés de chaque essai doivent avoir un pH compris entre 4 et 4,5.

Dans notre deuxième approche, nous avons opté pour des nanocapsules à base d'alginate de sodium associé à son copolymère faisant élever les concentrations de polymères.

La troisième essai que nous avons explorée était l'emploi du chitosane seul comme matrice d'encapsulation pour la formation de nanoparticules encapsulant l'HE. Nous avons utilisé la méthode développée par **Ahmadi et ses collègues (2015)** avec certaines modifications adaptées à notre formulation spécifique (165). En utilisant uniquement du chitosane, et en l'associant à un agent réticulant tel que le tripolyphosphate de sodium, nous aurons la possibilité d'étudier les effets de cette matrice spécifique sur l'efficacité d'encapsulation et les propriétés des nanoparticules résultantes.

Pour le quatrième essai, on a opté pour la variation de la concentration du chitosan à une concentration élevée afin de former les nanoparticules à base de chitosane encapsulant l'HER.

Les formulation ont été réalisées au niveau du laboratoire de biochimie, du département de pharmacie de la faculté de médecine, à l'université Saad Dahleb Blida.

Dans cette étude, des nominations ont été attribués à chaque type de nanoparticules formées :

- **Formulation 1** : pour les nanoparticules à base de d'alginate et de son copolymère encapsulant l'HER.
- **Formulation 2** : pour les nanoparticules à base de d'alginate et de son copolymère à une concentration variée de la formulation 1, encapsulant l'HER.
- **Formulation 3** : pour les nanoparticules à base de chitosan encapsulant l'HER.
- **Formulation 4** : pour les nanoparticules à base de chitosan à une concentration élevé de la formulation 3, encapsulant l'HER.



Figure 47 : Des images prises lors de la préparation de nos formulations de nanoparticules

III - Évaluation de l'activité anti inflammatoire et analgésique in vivo :

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de pharmacologie, département de Pharmacie, de la faculté de Médecine, à l'Université Saad Dahleb Blida

1. Évaluation de l'activité anti inflammatoire in vivo :

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi de nous appuyer sur la méthodologie décrite par **Winter et ses collègues en 1963** pour évaluer l'activité inflammatoire de la carraghénine sur la patte de souris.

L'objectif principal de notre étude était d'examiner l'effet de différentes formulations sur la réduction de l'inflammation induite par la carraghénine. Pour induire cette inflammation contrôlée, nous avons administré la carraghénine par injection directe dans la patte arrière droite de chaque souris, provoquant ainsi une réponse inflammatoire locale.

En premier lieu on prépare une solution de carraghénine à 1%, pour faciliter la manipulation et diminuer la viscosité de la solution de carraghénine, nous avons également ajouté quelques gouttes de tween 80 à la solution. L'ajout de tween 80 permet de réduire la viscosité de la solution, ce qui facilite son utilisation dans les expériences ultérieures.

Afin de garantir des conditions expérimentales reproductibles, nous avons pris plusieurs précautions. Tout d'abord, nous avons soumis les souris à un jeûne de 18 heures avant le début de l'expérience, afin de minimiser les variations liées à la digestion et à l'absorption des substances administrées. Ensuite, nous avons réparti les 19 souris utilisées dans notre étude en cinq lots distincts, en veillant à ce que le nombre de souris par groupe soit équilibré, avec un effectif variant de 4 souris par groupe, le lot témoin négatif comporte 3 souris. Nous avons consigné avec précision les doses administrées pour chaque lot qui sont divisés comme suit :

- **Lot 1 (Carraghénine + Formulation 1)** : Le lot 1 a été traité avec la formulation 1 des nanoparticules contenant 600 mg/kg d'HE. Les souris ont reçu 0,5 ml de cette formulation par gavage gastrique, suivi de l'injection de 0,0125 ml de carraghénine, qui a été injectée par voie SC sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite
- **Lot 2 (Carraghénine + Formulation 3)** : Chaque souris de ce lot a reçu une dose de 0,5 ml des NPs de la formulation 3 à une concentration de 800 mg/kg par gavage gastrique. Cette administration a été réalisée 30 minutes avant l'injection de 0,0125 ml de carraghénine, qui a été injectée par voie SC sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite.
- **Lot 3 (Carraghénine + Huile essentielle de romarin dilué)** : Les souris de ce lot reçoivent 0,5 ml de la dilution de l'HERO diluée à une concentration de 1000 mg/kg par gavage gastrique. À la suite de 30 minutes de cette administration par voie orale, on injecte de la carraghénine à 1 % par voie SC sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite.
- **Lot 4 (Carraghénine + Ibuprofène)** : Ce lot de souris reçoit une dose de 0,5 ml d'ibuprofène à une concentration de 3,2 mg/kg par gavage gastrique qui a été réalisée 30 minutes avant l'injection de la carraghénine, qui a été injectée par voie SC sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite. L'ibuprofène considérée comme contrôle positif.
- **Lot 5 (Carraghénine + Eau physiologique)** : Les souris ont reçu 0,5 ml d'eau physiologique par voie orale, 30 minutes après, ils reçoivent une injection sous-cutanée de carraghénine à une concentration de 1 %, directement sous le coussinet plantaire de la patte arrière droite de chaque souris. Le lot 5 a servi de témoin négatif.

Après une période de trois heures, les souris ont été sacrifiées en sectionnant délicatement leur nuque à l'arrière. Les pattes arrière droite et gauche ont été amputées et pesées individuellement pour évaluer leur masse. La patte arrière gauche de chaque souris a été désignée comme témoin. Ainsi, aucun traitement ou injection n'a été effectué sur cette patte. Elle sert de point de référence pour évaluer les changements et les effets induits par les différentes interventions sur la patte arrière droite.



Figure 48 : Administration de la solution de carraghénine à 1%

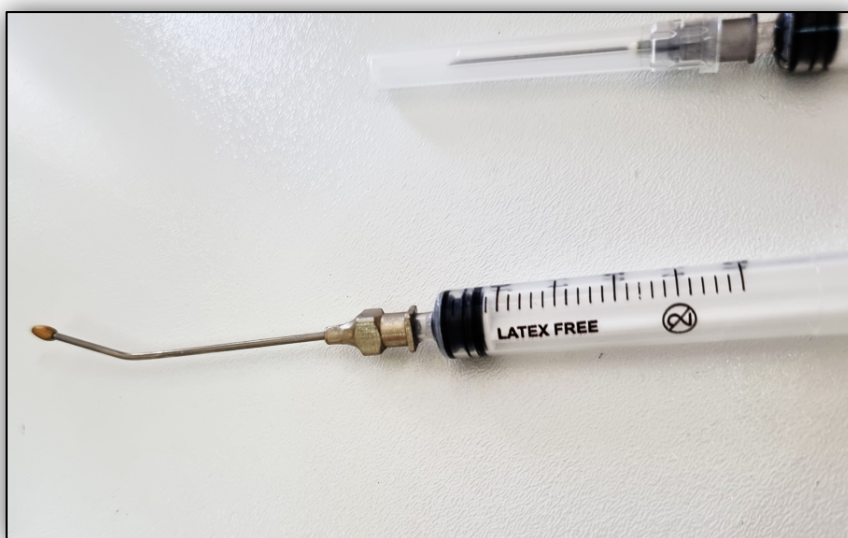


Figure 49 : La sonde de gavage employée par voie orale

L'importance de l'œdème a été évaluée en utilisant le pourcentage d'œdème. Ce calcul a été réalisé en mesurant le poids de la patte gauche et le poids de la patte droite, puis en appliquant la formule suivante :

$$PO(\%) = \frac{(PPG - PPD)}{PPG} \times 100$$

Où :

PO : Pourcentage d'œdème

PPG : Poids de la patte postérieure gauche

PPD : Poids de la patte postérieure droite

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en calculant le pourcentage d'inhibition ou de réduction de l'œdème. Le calcul de ce pourcentage a été réalisé en utilisant la formule suivante :

$$INH(\%) = \frac{(POT - POE)}{POT} \times 100$$

Où :

POT : Pourcentage d'œdème du témoin négatif

PPG : Pourcentage d'œdème de l'essai

Cette formule permet de comparer le niveau d'enflure dans le groupe de témoin négatif avec celui du groupe traité, reflétant ainsi l'efficacité de chaque traitement dans la réduction de l'œdème. Le pourcentage d'inhibition ou de réduction de l'œdème obtenu permet de quantifier et de comparer l'activité anti-inflammatoire des différentes formulations ou substances testées.

Une valeur élevée de %INH indique une forte réduction de l'œdème et donc une activité anti-inflammatoire plus prononcée.

2. Évaluation de l'activité analgésique in vivo :

L'évaluation de l'activité analgésique a été réalisée sur les mêmes 3 groupes de souris qui ont été utilisés pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire en utilisant un lot négatif autre que celui pour évaluer l'activité anti inflammatoire composé de 4 souris, recevant 0,0125 ml carraghénine à 1 % et 0,5 ml d'eau physiologique. L'objectif était de déterminer l'effet analgésique des différents traitements après 2 heures de l'administration de la carraghénine.

L'évaluation de l'activité analgésique a été effectuée à l'aide de l'appareil Algomètre, un instrument de mesure utilisé pour quantifier la sensibilité à la douleur chez les animaux. Le principe de fonctionnement de l'Algomètre repose sur l'application d'une force progressive sur la patte de la souris à l'aide de poids ajoutés sous forme de disques.



Figure 50 : Appareil d'Algomètre employé pour la mesure pourcentage d'analgésie

Au départ, la patte gauche de chaque souris a été placée dans l'appareil Algomètre, et un poids initial a été appliqué. Ensuite, des poids supplémentaires de 250g ont été ajoutés de manière progressive, augmentant ainsi la force exercée sur la patte de la souris. Lorsque la souris manifestait des signes de douleur tels que des cris ou des mouvements d'agitation, sa patte était immédiatement retirée de l'appareil.

La mesure réalisée à travers l'échelle de l'appareil Algomètre (Analgesy-meter) permet de quantifier la force exercée sur la patte de la souris nécessaire pour induire une réaction de douleur. Une plus forte force mesurée indique une réduction de la sensibilité à la douleur, ce qui est considéré comme un effet analgésique.

Pour quantifier l'effet analgésique, nous avons utilisé une formule comparative pour calculer le pourcentage d'analgésie en comparant les souris qui ont reçu les échantillons testés aux groupes témoins négatifs ayant uniquement reçu la carraghénine :

$$\% \text{ Analgésie} = \frac{(FPE - FPT)}{FPT} \times 100$$

Où :

FPE : Force exercée sur la patte enflammée laquelle la souris du lot d'essai a répondu

FPT : Force exercée sur la patte enflammée laquelle la souris du lot témoin a répondu

IV – Caractérisation par la diffusion dynamique de la lumière (DLS) et détermination du potentiel zêta et de l'indice de polydispersité :

La diffusion dynamique de la lumière (DLS), également connue sous le nom de spectroscopie de corrélation de photons (PCS) ou diffusion quasi-élastique de la lumière, est une technique précieuse utilisée dans notre étude pour caractériser les nanoparticules. La DLS permet la détermination de la taille des nanoparticules dans des suspensions colloïdales ou des solutions de polymères. En analysant la modulation de l'intensité de la lumière diffusée dans le temps lorsqu'un laser traverse la solution, la DLS mesure la taille hydrodynamique des particules. Cette taille est liée au mouvement brownien des particules, les particules plus petites diffusant plus rapidement que les plus grosses (166).

La DLS fournit des informations précieuses sur la taille des particules, l'indice de polydispersité sur la distribution de leur taille et leur stabilité colloïdale, et le potentiel zêta pour déterminer leurs propriétés électrostatiques.

- **Protocole** : La mesure se fait par introduction des suspensions de nanoparticules, dans une cuve transparente à travers l'appareil, en évitant la présence de toute bulle d'air pouvant interférer dans l'analyse. C'est une technique non destructive et rapide, qui ne nécessite qu'une faible quantité d'échantillon. Cela en fait une méthode pratique et efficace pour caractériser les nanoparticules à grande échelle :

Pour la caractérisation par DLS et la mesure du potentiel zêta et de l'IP, nous avons suivi une procédure spécifique. Quatre échantillons ont été préparés pour l'analyse. Les formulations 1 et 2 n'ont pas été dilués, tandis que les 3 et 4 ont été dilués en ajoutant 1 ml de l'échantillon à 100 ml d'eau distillée. Cette dilution a été effectuée afin d'obtenir des résultats plus précis et de minimiser les effets de la concentration élevée de particules dans l'échantillon.

Les échantillons ont ensuite été transférés dans les cuves appropriées pour l'analyse dans l'appareil de DLS. Nous avons utilisé un instrument de DLS de marque **Horiba** qui intègre aussi des options capables outre la taille des particules, de déterminer également le PZ ainsi que l'IP.

Une fois les échantillons placés dans les cuves respectives, nous avons effectué les mesures en utilisant les paramètres appropriés sur l'appareil de DLS. La technique de DLS utilise la diffusion de la lumière pour mesurer la taille des particules en suspension. Elle est basée sur l'analyse des fluctuations de la lumière diffusée par les particules en mouvement brownien.

En parallèle, l'appareil de DLS a également permis de mesurer le potentiel zêta des échantillons. Le potentiel zêta est une mesure de la charge électrique à la surface des particules qui peut fournir des informations sur leur stabilité colloïdale (167). Cette mesure a été réalisée en utilisant les cuves spéciales dédiées à la mesure du potentiel zêta. Pour l'IP c'est le même appareil qui réalise cette caractérisation sachant que c'est un paramètre important qui fournit des informations sur la largeur ou l'étalement de la distribution des tailles de particules (168).

V – Caractérisation par spectrophotométrie UV-Visible :

La spectroscopie UV-Vis est une technique analytique utilisée pour déterminer l'absorption ou la transmission de longueurs d'onde spécifiques de lumière UV ou visible par un échantillon par rapport à une référence. Cette technique fournit des informations sur la composition et la concentration de l'échantillon. Comprendre les propriétés de la lumière est fondamental pour comprendre la spectroscopie UV-Vis (169).

Dans la spectroscopie UV-Vis, la lumière est décrite par sa longueur d'onde, ce qui facilite l'analyse et l'identification des substances en localisant les longueurs d'onde spécifiques correspondant à l'absorbance maximale. Cette information est cruciale pour comprendre la loi de Beer-Lambert, qui décrit la relation entre l'absorbance de la lumière, la concentration des espèces absorbantes et la longueur du trajet de l'échantillon. La loi de Beer-Lambert est représentée par l'équation $A = \epsilon lc$, où A est l'absorbance, ϵ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) est l'absorptivité molaire (également appelée coefficient d'extinction molaire), l (cm) est la longueur du trajet de l'échantillon et c ($mol \cdot L^{-1}$) la concentration des espèces absorbantes (169).

V.1 – Détermination de l'efficacité d'encapsulation (EE) :

La spectrophotométrie UV-VIS a été utilisée pour évaluer l'efficacité d'encapsulation des nanoparticules encapsulant l'huile essentielle du romarin. Cette technique analytique repose sur la mesure de l'absorption de différentes longueurs d'onde de lumière UV ou visible par un échantillon. Cette technique offre une évaluation rapide, précise et non destructive de la quantité d'huile essentielle encapsulée dans les nanoparticules. En mesurant l'absorbance à une longueur d'onde spécifique correspondant à celle de l'huile essentielle, nous pouvons quantifier la concentration de l'huile essentielle encapsulée. La spectrophotométrie UV-VIS est basée sur la loi de Beer-Lambert, qui établit une corrélation entre l'absorbance de la lumière par un échantillon et sa concentration. Cette loi nous permet de quantifier la concentration d'huile essentielle encapsulée en utilisant une courbe d'étalonnage établie à partir de solutions d'huile essentielle de concentrations connues.

- **Protocole** : On expliquera par la suite les différentes étapes pour déterminer l'EE :

a) Détermination de la longueur d'onde de l'huile de romarin : Une étape préliminaire importante a été réalisée avant d'établir la courbe d'étalonnage. Tout d'abord, un balayage dans le spectrophotomètre UV-Vis a été effectué afin de déterminer la longueur d'onde à laquelle l'huile essentielle de romarin présente une absorbance maximale. Cette étape est cruciale car elle permet de choisir une longueur d'onde appropriée pour la suite des analyses.

b) Préparation des dilutions : Une fois la longueur d'onde optimale identifiée, des dilutions de différentes concentrations d'huile essentielle de romarin ont été préparées. Ces concentrations ont été soigneusement sélectionnées afin de couvrir une plage de valeurs appropriée pour l'établissement de la courbe d'étalonnage. Ces dilutions ont été préparées en utilisant un solvant approprié, l'éthanol, pour assurer une dissolution adéquate de l'huile.

c) Lecture des absorbances : Par la suite, les absorbances des échantillons des différentes concentrations ont été mesurées à la longueur d'onde préalablement déterminée. Ces données d'absorbance ont ensuite été utilisées pour construire la courbe d'étalonnage.

d) Réalisation de la courbe d'étalonnage : La courbe d'étalonnage est une relation mathématique entre les concentrations connues des dilutions connues de l'huile essentielle dans l'éthanol et de leurs absorbances correspondantes. Cette courbe permettra par la suite de déterminer l'efficacité d'encapsulation (EE) en analysant les échantillons contenant des nanoparticules et en mesurant l'absorbance pour estimer la quantité d'huile essentielle non encapsulée.

On s'est basé pour élaborer ce protocole sur la méthode de **Natarajan et al. (2015)** avec quelques modifications (164).

V.2 – Détermination du profil de libération in vitro :

Le profil de libération in vitro des nanoparticules chargées de l'huile essentielle de romarin a été étudié dans diverses conditions de pH, notamment un tampon pH de 2, et une solution tampon phosphate pH de 6. Nous avons décidé d'opter pour ces valeurs de pH, car elles correspondent à des intervalles où les nanoparticules peuvent être absorbées efficacement. Le pH de l'estomac varie généralement entre 1,5 et 3,5 (170), tandis que le pH de l'intestin grêle peut varier de 6 à 7,4 (171). Ces pH sont importants car ils influencent l'absorption des substances ingérées. En choisissant ces pH spécifiques, nous avons pu simuler les conditions auxquelles les nanoparticules seront exposées lorsqu'elles sont administrées par voie orale. Cela nous a permis d'évaluer la libération des nanoparticules et leur potentiel d'absorption dans les différentes parties du tractus gastro-intestinal. La méthode utilisée pour déterminer le profil de libération des nanoparticules encapsulant l'HE est basée sur l'étude menée par **Esmaeili et Asgari (2015)** avec quelques modifications de notre part (172).

- **Protocole** : On expliquera par la suite les différentes étapes de ce test in vitro :

Les nanoparticules encapsulant l'huile essentielle ont été isolées de la suspension aqueuse (750 µL) par centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes à 25°C. Les nanoparticules séparées ont ensuite été remises en suspension dans une solution tampon et incubées à 25°C sous agitation douce. À des intervalles de temps spécifiques, les échantillons ont été soumis à une centrifugation à 10 000 rpm pendant 5 minutes à 25 °C, un volume du surnageant a été collecté et mélangé avec de l'éthanol pour une analyse ultérieure. La quantité de l'huile essentielle de romarin libérée a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis, mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 287 nm.

Le pourcentage cumulatif de l'HE libérés par les NP a été calculé à l'aide de l'équation fournie :

$$\text{Pourcentage cumulatif de libération} = \sum_{t=0}^t \frac{\text{Quantité de l'HE libérée}}{\text{Quantité totale de l'HE}} \times 100$$

VI - Caractérisation par Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier FTIR :

La spectroscopie FTIR, abréviation de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, est une technique largement utilisée pour analyser les structures moléculaires. Elle fonctionne sur le principe que lorsque le rayonnement infrarouge traverse un échantillon, certaines longueurs d'onde du rayonnement sont absorbées, tandis que d'autres passent à travers. En analysant le spectre résultant, qui est unique à chaque molécule, la spectroscopie FTIR permet l'identification et la différenciation de divers composés (173).

Les avantages de la spectroscopie FTIR proviennent de sa nature non destructive, un temps d'analyse plus rapide par rapport aux méthodes plus anciennes, et une sensibilité et une précision améliorées. Ces avantages sont obtenus grâce à l'utilisation d'un interféromètre comme source infrarouge et à l'application des mathématiques de la transformée de Fourier. L'interféromètre génère un interférogramme, qui est une représentation graphique des données, et la transformée de Fourier convertit cet interférogramme en spectre de spectroscopie infrarouge reconnaissable (173).

Le principe de fonctionnement de la spectroscopie FTIR réside dans l'absorption sélective de longueurs d'onde spécifiques du rayonnement infrarouge par les liaisons covalentes au sein d'une molécule. Cette absorption modifie l'énergie vibratoire des liaisons. Chaque liaison et groupe fonctionnel absorbe des fréquences distinctes, ce qui donne un modèle de transmission unique pour différentes molécules (173).

La spectroscopie (FTIR) est devenue une technique analytique puissante pour la caractérisation des NP dans divers domaines de recherche. Dans cette autre partie de travail, nous aborderons la caractérisation par l'analyse FTIR des nanoparticules synthétisées encapsulant l'huile essentielle de romarin. L'utilisation de FTIR offre des avantages uniques pour élucider la composition structurelle, les groupes fonctionnels et les interactions moléculaires au sein des nanoparticules. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire d'analyse physicochimique du département de génie des procédés de la faculté de technologie à l'université Saad Dahleb à Blida.

- **Protocole** : On détaillera par la suite les différentes étapes de l'analyse FTIR :
- **Les échantillons solides** : Deux échantillons solides, le chitosane et l'alginate, ont été mélangé chacun séparément avec de la poudre de bromure de potassium (KBR) et broyé à l'aide d'un mortier. Après le mélange, les échantillons ont été pressés à l'aide d'une presse pour former des pastilles de KBR solides. Ces pastilles ont ensuite été utilisées pour l'analyse FTIR dans le spectromètre infrarouge.
- **Les échantillons liquides** : En ce qui concerne les échantillons liquides, tels que l'huile essentielle de romarin, les suspensions à base de nanoparticules de chitosane et les suspensions de nanoparticules à base d'alginate et de son copolymère encapsulant l'huile de romarin, ainsi que leurs contreparties de suspensions de nanoparticules de chitosane et d'alginate/copolymère blanc sans huile essentielle, des pastilles de KBR ont été préparées individuellement, sans mélange avec les échantillons. Une goutte de chaque échantillon liquide a été déposée ensuite sur une pastille de KBR préparée, puis cette dernière a été analysée à l'aide du spectromètre FTIR.

L'utilisation de pastilles de KBR permet d'obtenir des échantillons solides pour l'analyse FTIR, assurant ainsi une dispersion homogène des échantillons solides et liquides lors de la mesure. Les pastilles de KBR fournissent également un milieu transparent aux rayons IR et compatible avec le spectromètre infrarouge, permettant l'obtention de spectres de haute qualité.

VII - Observation au microscope optique :

Les nanoparticules ont été observées au microscope optique au niveau du laboratoire de pharmacie galénique de l'université Saad dahleb blida, à un grossissement de 40x afin d'analyser leur morphologie et leur taille. Avant l'observation, des précautions ont été prises pour préparer les lames. Tout d'abord, une goutte de suspension contenant les nanoparticules a été appliqué sur une lame de verre propre et stérilisée.

Ensuite, une goutte de l'huile d'immersion a été déposé sur la suspension, cette huile d'immersion a une propriété optique permettant d'obtenir une meilleure résolution et une focalisation plus précise des échantillons.

Une lamelle de verre est délicatement déposée, elle permet de maintenir l'échantillon en place et de le protéger pendant l'observation, tout en permettant à la lumière de passer à travers pour une focalisation précise des échantillons.

VIII - Observation sous microscope électronique à balayage MEB :

Nous avons procédé à l'observation des nanoparticules formées en utilisant un microscope électronique à balayage (MEB), c'est un instrument très polyvalent utilisé pour examiner et analyser la microstructure, la morphologie et la composition chimique des matériaux (174). Nous avons choisi d'utiliser cette technique d'imagerie car elle offre une résolution élevée et une capacité d'observation en trois dimensions, ce qui nous permet d'examiner les détails fins et les caractéristiques des nanoparticules formées.

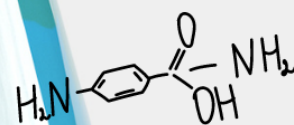
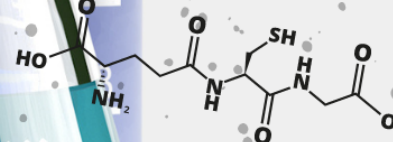
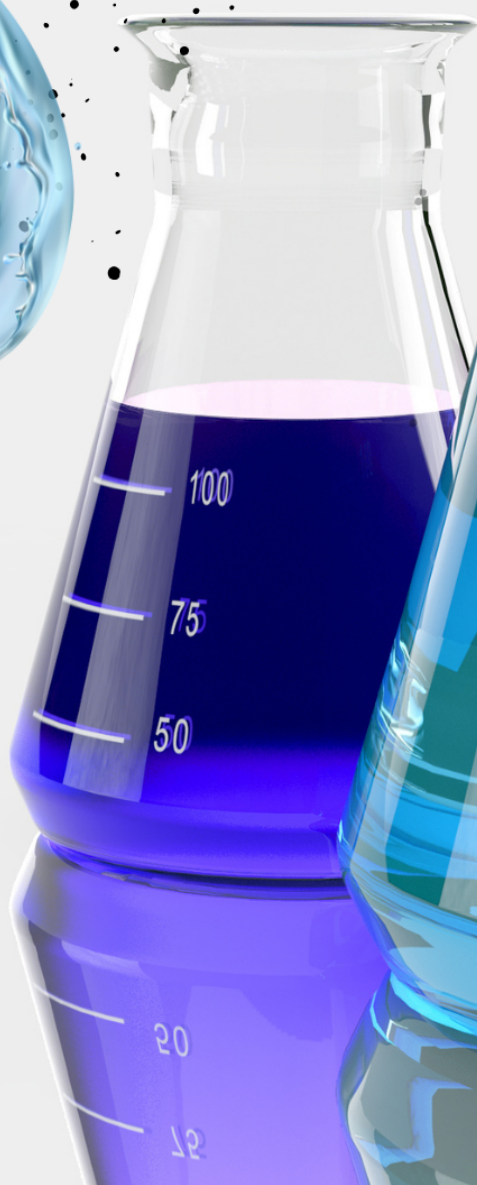
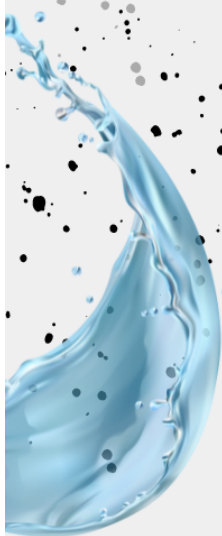
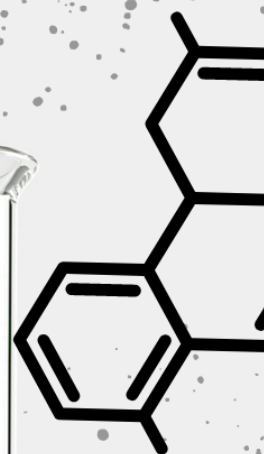
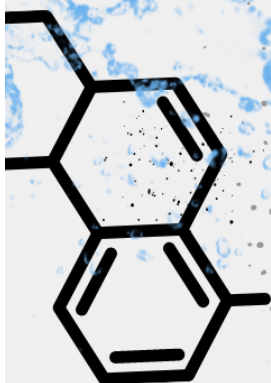
Pour établir la procédure d'observation au MEB, Nous avons déposé des gouttes de suspensions nanoparticulaires sur des substrats spécifiques, des plaquettes de carbone, pour assurer une meilleure adhésion des particules. Les échantillons ainsi préparés ont été placés dans le MEB, où un faisceau d'électrons a été dirigé vers la surface de l'échantillon. Lorsque les électrons interagissent avec les particules, des signaux sont générés, tels que des électrons rétrodiffusés ou des électrons émis par effet de champ. Ces signaux sont ensuite détectés et convertis en une image en haute résolution de la surface des NPs.

Cette procédure nous a permis d'obtenir des images détaillées des NPs formées, nous permettant ainsi d'évaluer leur taille, leur forme et leur distribution. De plus, l'utilisation de gouttes de suspensions nanoparticulaires nous a permis d'observer directement les particules en suspension, ce qui est important pour comprendre leur comportement en milieu liquide.

CHAPITRE 02

RÉSULTATS

ET DISCUSSIONS



I – Évaluation de l'activité antibactérienne in vitro :

L'évaluation des résultats de l'analyse bactérienne par l'huile essentielle du romarin a été réalisée pour les 7 souches bactériennes mentionnées précédemment. Les diamètres d'inhibition mesurés en millimètres ont été utilisés comme critère pour évaluer l'activité antimicrobienne des substances testées. Afin de garantir une évaluation complète et fiable de l'effet inhibiteur de l'huile du romarin, voici les résultats :

* Le diamètre du disque vierge de 6 mm et du puit de 8 mm est inclus dans le diamètre d'inhibition

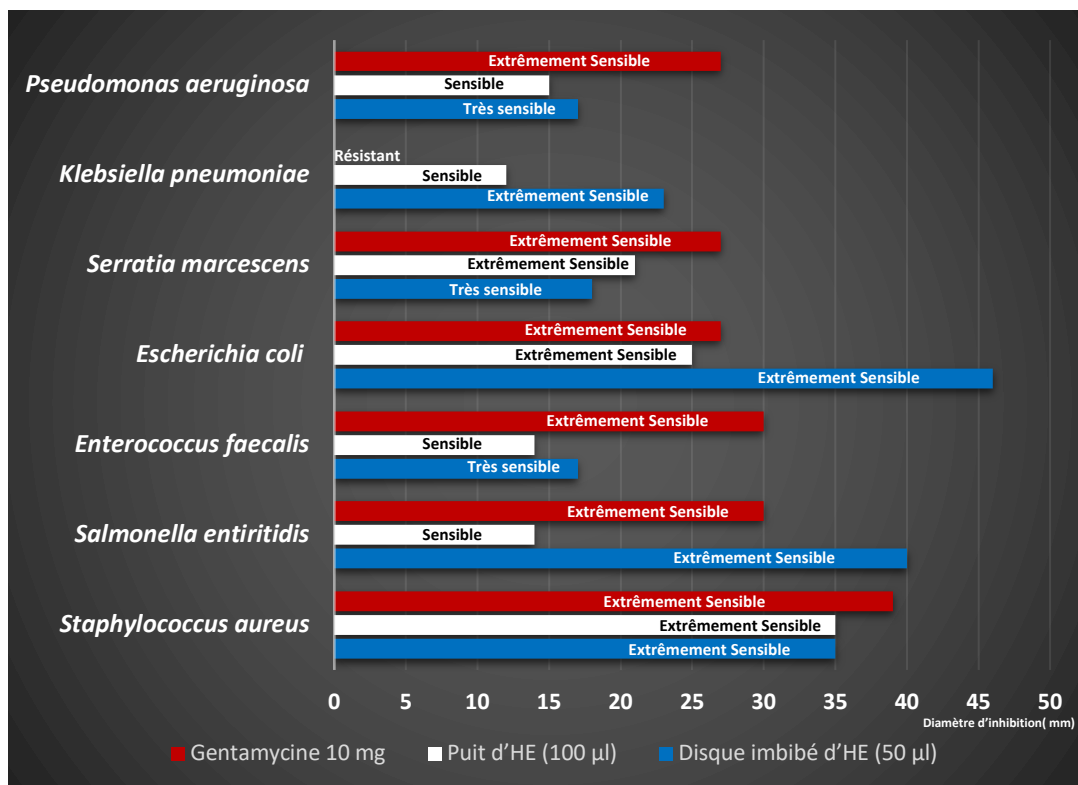


Figure 51 : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antibactérienne

- **Expression des résultats :**

- Extrêmement sensible (+++): >20 mm
- Très sensible (++) : 15-19 mm
- Sensible (+): 8-14 mm
- Résistant (-): <8 mm



Figure 52 : L'activité de l'HE contre *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 53 : L'activité de l'HE contre *Staphylococcus aureus*

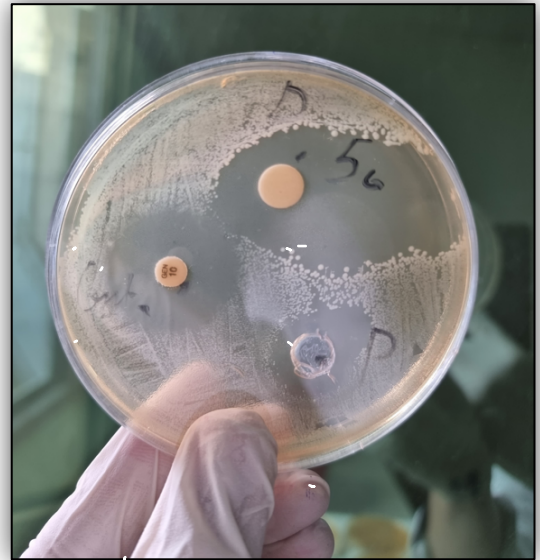


Figure 56 : L'activité de l'HE contre *Escherichia coli*

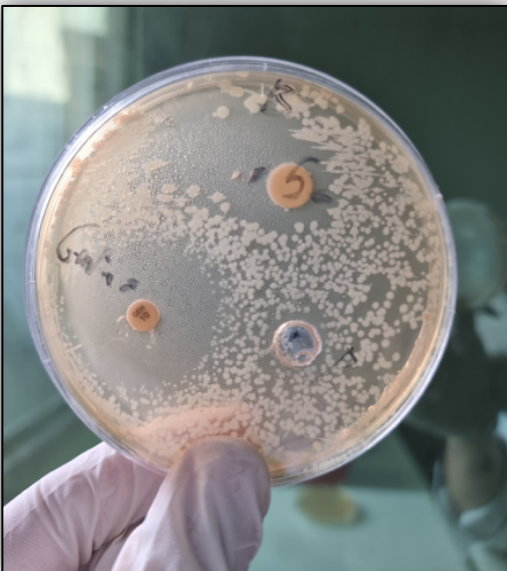


Figure 54 : L'activité de l'HE contre *Salmonella enteritidis*

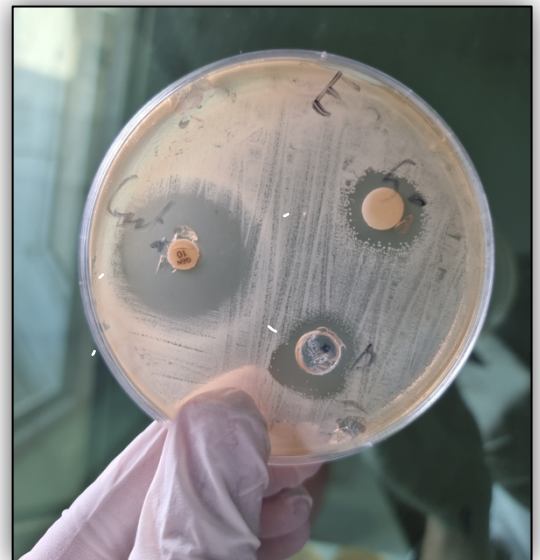


Figure 57 : L'activité de l'HE contre *Serratia marcescens*

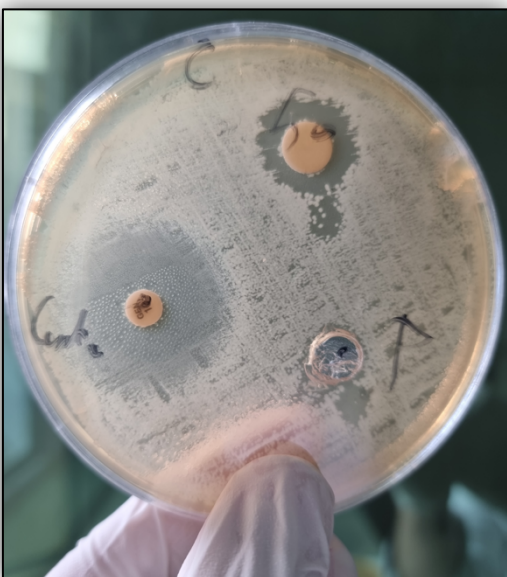


Figure 55 : L'activité de l'HE contre *Enterococcus faecalis*



Figure 58 : L'activité de l'HE contre *Klebsiella pneumoniae*

L'analyse des diamètres d'inhibition des différentes souches bactériennes exposées à l'huile de romarin révèle des résultats prometteurs quant à son activité antimicrobienne. Les zones d'inhibition observées sont très significatives, notamment pour les souches de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enteritidis* pathogène, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Serratia marcescens* pathogène. Ces souches ont manifesté une sensibilité élevée à l'huile de romarin, indiquant son potentiel en tant qu'agent inhibiteur efficace contre ces microorganismes pathogènes. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par d'autres auteurs qui ont montré que l'huile de romarin a une action bactéricide sur les bactéries à Gram+ et à Gram- **Hussain et al. (2010)** et **Stojiljkovic et al. (2018)** respectivement (175, 176). L'activité antibactérienne de l'huile de romarin peut être attribuée à sa composition chimique riche en pinènes, camphre et 1,8 cinéole comme étudié par les chercheurs **Bajalan et al. (2017)** (177). Ces composés ont des effets synergiques qui perturbent la membrane bactérienne et inhibent la synthèse des protéines (121). L'HERO peut donc être considérée comme une source potentielle d'agents antimicrobiens naturels pour le traitement des infections bactériennes.

Il est intéressant de noter que la sensibilité des souches bactériennes peut varier en fonction de la méthode d'application de l'huile de romarin. Les disques imbibés d'huile essentielle ont généré des zones d'inhibition plus larges par rapport aux puits contenant l'huile suggérant une diffusion plus étendue des composés actifs dans le milieu de culture, et cela malgré une faible concentration pour la première. Bien que les deux méthodes aient démontré l'activité antimicrobienne de l'huile de romarin, des différences subtiles dans les résultats peuvent être observées en raison de la diffusion variable des composés actifs dans le milieu, Il convient donc de prendre en compte ce facteur lors de l'interprétation des résultats et de considérer les deux méthodes comme complémentaires dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile de romarin.

La lecture des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a été réalisée en observant la présence ou l'absence de croissance bactérienne dans les puits contenant différentes concentrations d'huile de romarin. La CMI a été déterminée comme la plus basse concentration de l'huile qui inhibe complètement la croissance visible des bactéries, Les résultats obtenus sont présentés dans le figure ci-dessous :

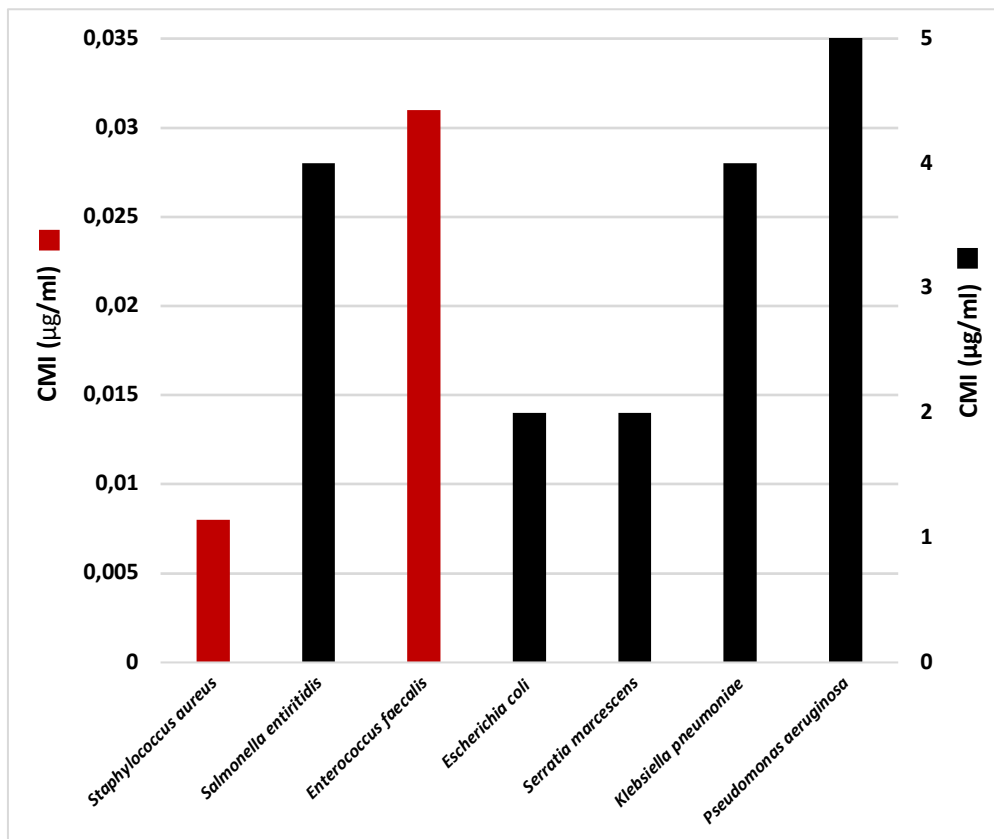


Figure 59 : Résultat de la CMI anti bactérienne

Les résultats ont révélé des valeurs de CMI variables pour les différentes souches testées. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a montré une CMI très basse inférieure à 0,01µg/ml , ce qui indique une très forte sensibilité de cette souche vis-à-vis l'huile de romarin. De même, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 une bactérie opportuniste pouvant causer des infections urinaires ou endocardites, a présenté une CMI aussi basse, témoignant également d'une haute sensibilité. *Escherichia coli* et *Serratia marcescens*, deux souches pathogènes, ont affiché des valeurs de CMI aux alentours de 2 µg/ml indiquant une sensibilité modérée à l'HER.

En revanche, *Salmonella enteritidis* et *Klebsiella pneumoniae* ont montré des CMI élevée alors que *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 une CMI > 4 µg/ml, ce qui indique qu'il faudra des concentrations élevés de l'huile essentielle de romarin afin d'inhiber leurs croissances. Cependant, il est important de noter que malgré une CMI plus élevée, l'huile de romarin a toujours démontré une certaine capacité inhibitrice contre ces bactéries, ce qui souligne son potentiel comme agent antimicrobien.

Selon une étude menée par **Abolfazl Jafari Sales et al. (2020) (178)**, les auteurs ont rapporté des valeurs de CMI différentes de celles obtenues dans notre étude pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Ils ont trouvé que la CMI de l'huile de romarin était de 1,25 µg/ml pour *E. coli* et de 0,625 µg/ml pour *S. aureus* par rapport à nos résultats. Il convient de souligner que les différences dans les valeurs de CMI peuvent être attribuées à plusieurs facteurs, notamment les conditions expérimentales, les méthodes utilisées et les différentes sources d'huile de romarin utilisées dans les études. Bien qu'il existe une légère différence entre nos résultats et ceux de **Abolfazl Jafari Sales et al.**, on suggère qu'il y'a une certaine corrélation entre les deux études. Cependant, il convient de noter qu'il n'a pas été possible de trouver dans la littérature scientifique des résultats comparables pour les autres souches en ce qui concerne la CMI de l'huile de romarin. Cette absence de données comparatives rend difficile une évaluation directe de nos autres résultats par rapport à d'autres études.



Figure 60 : Microplaque utilisé lors de la détermination de la CMI

III – Évaluation de l'activité antifongique in vitro :

Les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle de romarin ont été examinés pour les trois souches de champignons de candidas précédemment mentionnées.

De manière similaire à l'évaluation de l'activité antibactérienne, deux méthodes complémentaires ont été utilisées pour garantir une évaluation exhaustive de l'effet inhibiteur de l'huile essentielle de romarin. La méthode de puits a été employée, permettant de déterminer la capacité de l'huile à inhiber la croissance fongique en observant les zones d'inhibition autour des puits contenant l'huile de romarin. De plus, la méthode de diffusion sur milieu solide a été mise en œuvre, où des disques imbibés d'huile de romarin ont été placés sur des géloses fongiques pour évaluer leur capacité à induire une inhibition de la croissance fongique. L'utilisation de ces deux méthodes complémentaires assure une évaluation robuste de l'activité antifongique de l'huile. Les résultats de ces évaluations sont présentés ci-dessous :

* Le diamètre du disque vierge de 6 mm et du puit de 8 mm est inclut dans le diamètre d'inhibition.

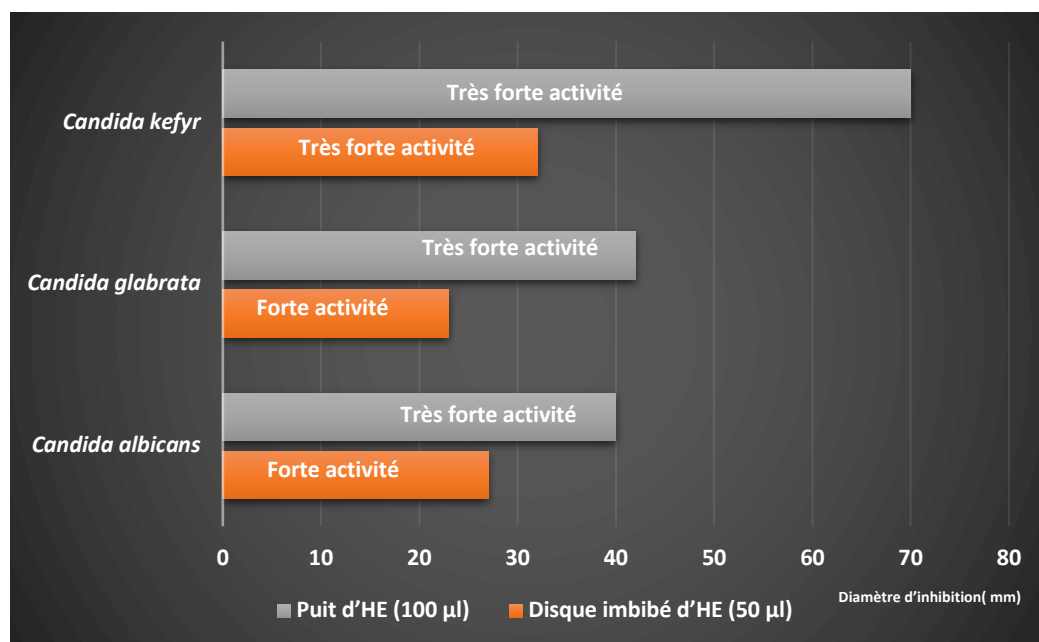


Figure 61 : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) démontrant l'activité antifongique



Figure 62 : Résultat de l'activité de l'huile essentielle contre *Candida albicans*

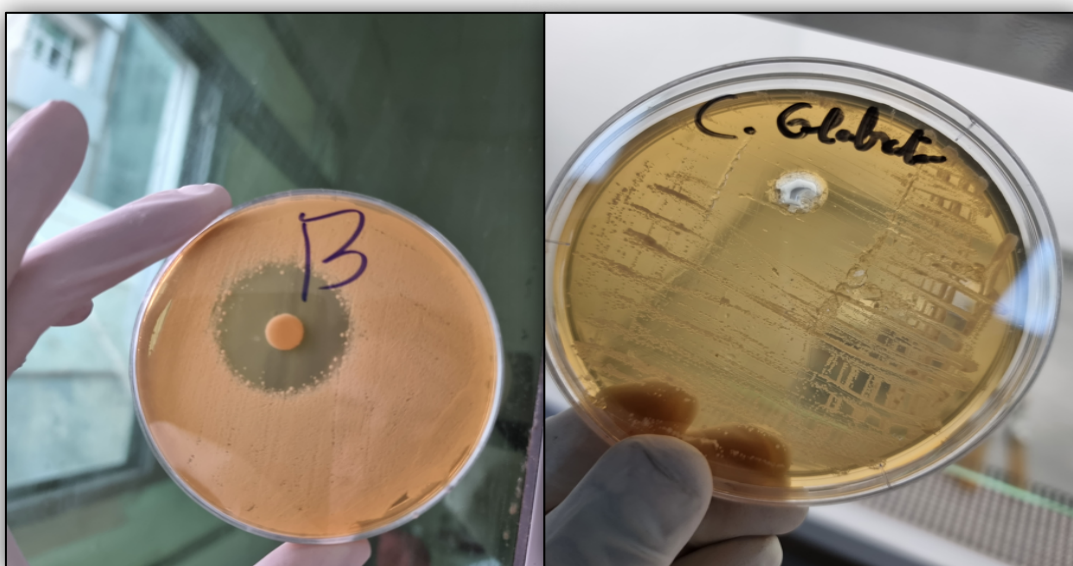


Figure 63 : Résultat de l'activité de l'huile essentielle contre *Candida glabrata*

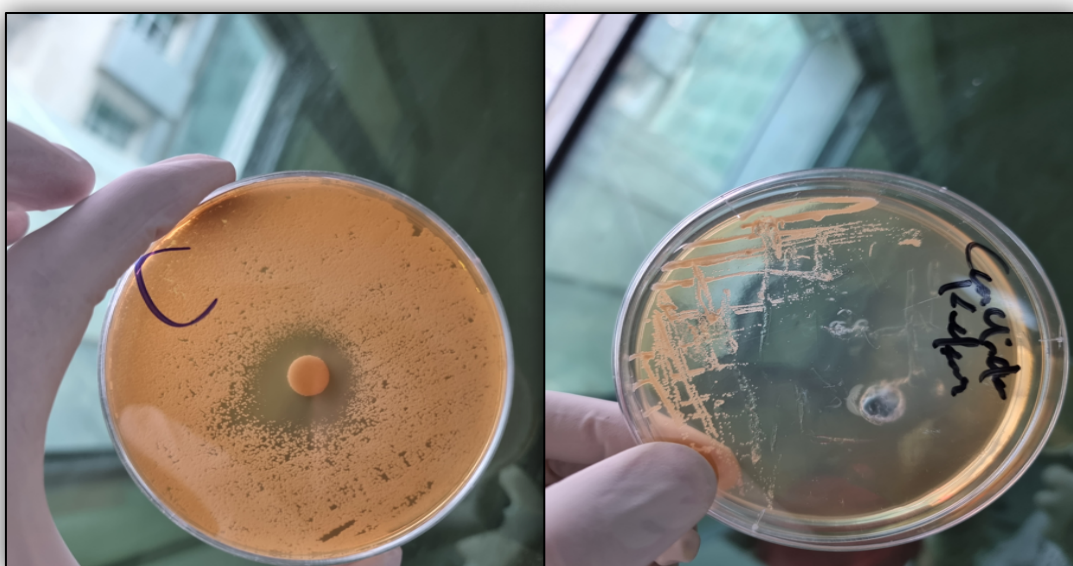


Figure 64 : Résultat de l'activité de l'huile essentielle contre *Candida kefyr*

Les résultats obtenus à partir des deux méthodes d'analyse, à savoir le disque imbibé d'huile essentielle et le puits d'huile essentielle, ont révélé des diamètres d'inhibition significatifs.

Pour *Candida albicans*, nous avons observé une forte activité pour le disque imbibé d'huile essentielle et une très forte activité pour le puits d'huile essentielle. Dans une étude précédente menée par **Gauch et al. (2014)** (179), l'activité antifongique de l'huile essentielle de romarin a été évaluée contre *Candida albicans*, et un diamètre d'inhibition de 45 mm a été rapporté. La comparaison de ces résultats révèle une concordance dans les effets inhibiteurs de l'huile essentielle de romarin contre *Candida albicans*. Bien que la valeur exacte des diamètres d'inhibition puisse varier légèrement entre les études en raison de facteurs tels que les méthodes expérimentales, les souches de *Candida* utilisées et les conditions de culture, la présence d'une activité antifongique significative de l'huile essentielle de romarin est évidente. Cette concordance entre nos résultats et ceux de **Gauch et al. (2014)** renforce la crédibilité de l'activité antifongique de l'HE de romarin contre *Candida albicans*.

De même, pour *C.glabrata*, nous avons obtenu un diamètre d'inhibition inférieur à 25 mm avec le disque imbibé d'HE et plus de 40 mm avec le puits d'HE. Dans une étude récente menée par **Ben Jemaa et al. (2021)** (180), l'évaluation de l'activité antifongique de l'HERO contre *C.glabrata* a révélé un diamètre d'inhibition de 27,33 mm. Ces résultats concordent étroitement avec nos propres observations, ce qui renforce la crédibilité de l'huile essentielle de romarin en tant qu'agent potentiel dans le traitement des infections causées par cette espèce de *Candida*.

En ce qui concerne *Candida kefyr*, nous avons obtenu des résultats particulièrement encourageants. L'activité antifongique a été évaluée forte employant le disque imbibé d'HE et très forte employant la méthode de puit. Ces résultats témoignent d'une activité antifongique puissante de l'HERO contre cette souche de *Candida* pathogène. La large zone d'inhibition observée dans le puits d'HE pour les trois souches de *Candida* peut être attribuée à une meilleure exposition de la souche à une concentration plus élevée d'HE, permettant ainsi une plus grande inhibition de la croissance fongique.

L'HE du romarin contient plusieurs composés phytochimiques, tels que le camphre, le cinéol, les flavonoïdes et les terpènes qui ont montré des propriétés antifongiques dans différentes études (181).

La détermination de la (CMI) pour l'activité antifongique a été effectuée en suivant une méthode similaire à celle utilisée pour la détermination de la CMI antibactérienne. Les résultats obtenus ont été enregistrés et sont présentés dans l'histogramme suivant :

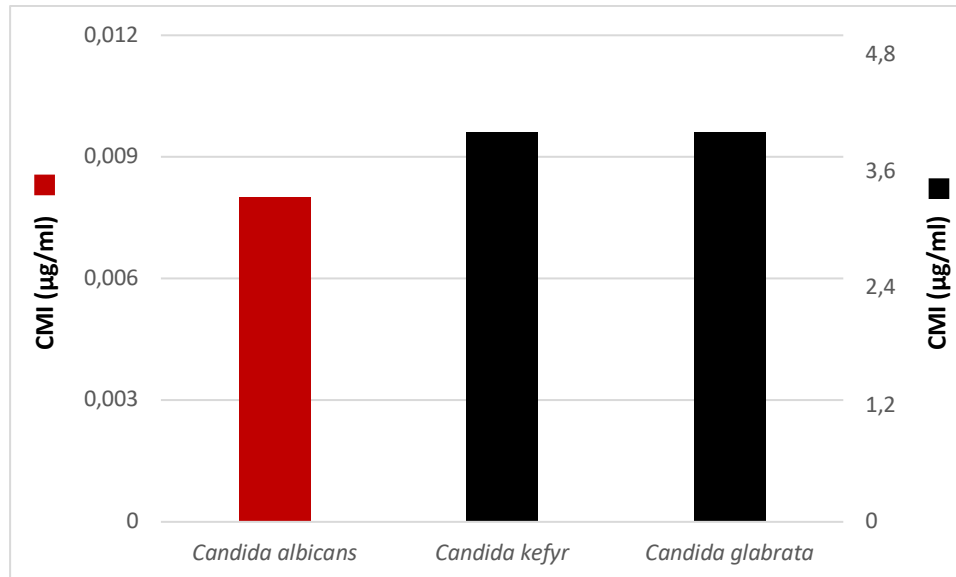


Figure 65 : Résultat de la CMI anti fongique

Les résultats présentés dans le tableau montrent la CMI des différents champignons testés avec l'huile de romarin. On peut observer que *Candida albicans* est très sensible à l'HE, avec une CMI très basse ce qui signifie qu'une très faible concentration suffit à inhiber sa croissance. *Candida glabrata* et *Candida kefyr* sont en revanche très résistants, avec une CMI élevée. Ces deux espèces sont connues pour avoir des mécanismes de résistance aux antifongiques, notamment par modification de la cible ou par efflux actif (182).

Les différences de résultats observées entre les souches de *Candida* peuvent être attribuées à plusieurs facteurs. Tout d'abord, chaque souche de *Candida* possède des caractéristiques génétiques et des mécanismes de défense qui lui sont propres, ce qui peut influencer sa sensibilité à l'huile de romarin. Certaines souches peuvent avoir développé des mécanismes de résistance spécifiques, tels que des altérations au niveau de leur membrane cellulaire ou l'expression de protéines de détoxification, leur permettant de survivre et de se multiplier en présence d'agents antifongiques (183).

En comparant nos résultats à ceux obtenus par **Neves et al. (2019)** (184), nous observons une corrélation significative pour *C.albicans*, mais une légère divergence pour *C.glabrata* en termes de CMI de l'huile de romarin.

Malgré cette légère divergence pour le *Candida glabrata*, nos résultats soutiennent les conclusions de **Neves et al.** quant à l'activité antifongique de l'huile de romarin contre *Candida albicans* et *Candida glabrata*. Les deux études démontrent l'efficacité de l'HERO en inhibant la croissance de ces pathogènes fongiques.

III – Évaluation de l'activité antioxydante de l'HE in vitro :

Les résultats obtenus quant aux PI des différentes dilutions d'HE avec le DPPH, ont été représentés graphiquement dans la **Figure 66** suivante en fonction des concentrations d'HE. La méthode de calcul des pourcentages d'inhibition a été appliquée conformément à la description précédente, sachant que l'absorbance du blanc a été évaluée à 1,296 nm :

À partir de la courbe de pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante et de l'équation associée $y = 1,174x + 15,613$ (avec un $R^2 = 0,9603$), nous avons déterminé le pourcentage d'inhibition 50, qui s'est avéré être de 29,29 mg/ml.

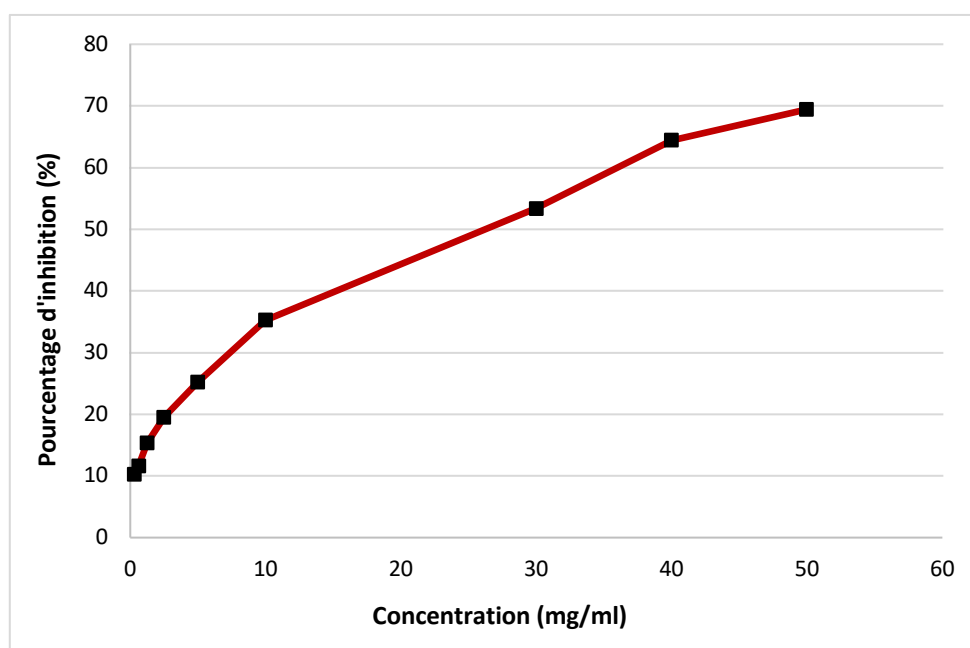


Figure 66 : Courbe du pourcentage d'inhibition de l'activité anti oxydante

L'activité antioxydante de l'huile de romarin est attribuée à certains composés chimiques spécifiques qui la composent. Une étude antérieure menée par **Wang et al. (2008)** (185) a confirmé que l'huile essentielle de romarin contient des composés tels que le 1-8 cinéole, l'alpha pinène et le bêta pinène, qui ont démontré une activité antioxydante significative. Ces composés peuvent agir en tant qu'antioxydants en neutralisant les radicaux libres et en prévenant les dommages oxydatifs.

L'obtention d'un PI 50 de 29,29 mg/ml indique que l'huile essentielle de romarin présente une activité antioxydante considérable. Cela suggère que cette huile essentielle peut avoir un potentiel pour lutter contre les effets néfastes des radicaux libres et aider à prévenir les dommages oxydatifs dans un contexte biologique.

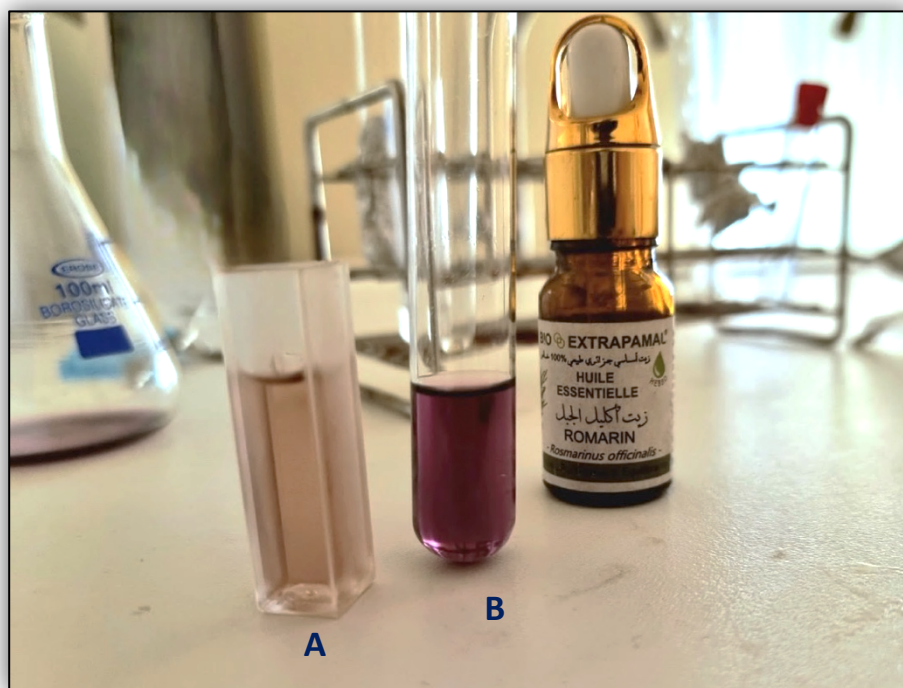


Figure 67 : Virage de la couleur violette du DPPH (B) à jaune clair (A) après neutralisation

IV – Évaluation de l'activité anti inflammatoire in vivo :

L'analyse des résultats présentés dans la **Figure 68** a permis d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de romarin administrée par voie orale, à la fois sous forme pure et encapsulée dans des nanoparticules

L'administration de l'huile essentielle pure diluée par voie orale a donné un pourcentage d'activité anti-inflammatoire inférieur à 5 %. Cependant, lorsque l'huile essentielle de romarin a été encapsulée dans les nanoparticules, le pourcentage d'activité anti-inflammatoire a considérablement augmenté concernant les formulations 1 et 3 respectivement.

L'interprétation de ces résultats suggère que l'encapsulation de l'huile essentielle de romarin dans les nanoparticules améliore significativement son activité anti-inflammatoire par rapport à son administration seule. Cette amélioration peut être attribuée à plusieurs facteurs, tels que la protection de l'huile essentielle contre la dégradation, une libération contrôlée des composés actifs et une meilleure biodisponibilité.

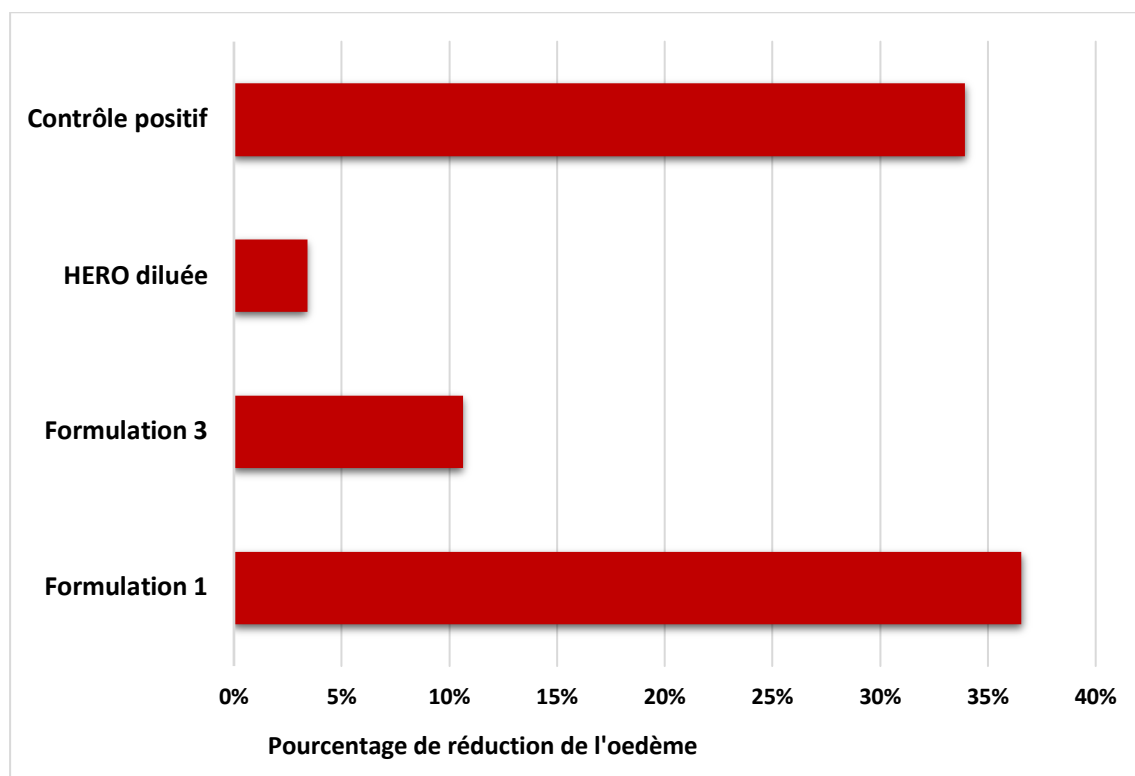


Figure 68 : Évaluation du pourcentage de réduction de l'œdème

Ces résultats sont remarquables étant donné que la dose d'huile essentielle encapsulée était inférieure à celle de l'huile essentielle pure administrée seule. En outre, il convient de souligner que le contrôle positif avec l'ibuprofène a également montré un pourcentage d'activité anti-inflammatoire élevé supérieur à 30 %.

L'huile essentielle de romarin contient une gamme variée de terpènes. L'un des composés les plus abondants était le 1,8-cinéole, également connu sous le nom d'eucalyptol. Des études antérieures, telles que **Santos et Rao (2000) (186)** ont démontré les effets anti-inflammatoires et antinociceptifs du 1,8-cinéole. De plus, il a été démontré que des concentrations thérapeutiques de cinéole inhibent efficacement la production de diverses cytokines, notamment le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-8, tant dans les lymphocytes que dans les monocytes **Juergens et al. (2004) (187)**. Ces résultats mettent en évidence les avantages thérapeutiques potentiels du 1,8-cinéole en tant que composant clé de l'huile essentielle de romarin dans la modulation des réponses inflammatoires et de la production de cytokines.



Figure 69 : Patte de souris ayant reçu la carraghénine (à gauche) Patte témoin (à droite)

V – Évaluation de l'activité analgésique in vivo :

Les résultats de notre étude mettent en évidence une relation dose-réponse dans l'activité analgésique évaluée. L'huile essentielle de romarin diluée a démontré une activité analgésique exceptionnelle, avec un pourcentage très élevé de réduction de la douleur observé chez les souris. Cette observation confirme les propriétés analgésiques bien établies du romarin. L'activité analgésique de l'huile essentielle de romarin est attribuée à ses composés actifs, tels que le camphre et le 1,8-cinéole, qui ont démontré des propriétés analgésiques comme l'a démontré **Raskovic et al (126) (2015)** dans une étude antérieure.

Dans le cas de la formulation 3, avec une concentration de 800 mg/kg, les nanoparticules à base de chitosane ont montré un bon pourcentage d'activité analgésique. Bien que ce pourcentage soit légèrement inférieur à celui de l'HE diluée, dû à la faible concentration, tout de même, la formulation 3 indique toujours une certaine efficacité dans la réduction de la douleur.

Les nanoparticules encapsulant l'HE dans la formulation 1, à une concentration de 600 mg/kg, ont montré le pourcentage le plus bas d'activité analgésique. Ces résultats suggèrent que cette formulation spécifique à cette concentration a une efficacité limitée dans la réduction de la douleur, Cela peut être dû à une concentration moins élevée de l'huile de romarin encapsulée dans les nanoparticules, ce qui pourrait réduire son efficacité analgésique. De plus, la composition des nanoparticules, en combinant l'alginate et son copolymère, et la cinétique de libération peuvent également affecter l'activité analgésique.

Ce qu'on peut en tirer, c'est que les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence l'efficacité des nanoparticules dans l'encapsulation de l'HERO. Les NPs à base d'alginate/copolymère et à base de chitosane ont montré des pourcentages d'activité analgésique significatifs, bien que légèrement inférieurs à celui de l'HE dilué. Cela suggère que les NPs ont réussi à encapsuler efficacement l'HE, permettant ainsi une libération contrôlée et prolongée de ses composés actifs. Ces résultats sont encourageants et soutiennent le potentiel des nanoparticules comme plateforme de délivrance pour les composés thérapeutiques, tels que les huiles essentielles.

VI – Détermination de la taille du potentiel zêta et de l'indice de polydispersité par la DLS :

a) Détermination de la taille des nanoparticules :

Les résultats obtenus par la DLS pour déterminer la taille des NPs dans les quatre formulations présentent des variations significatives, ce qui soulève des questions intéressantes concernant l'influence des différents paramètres de formulation sur la taille des particules.

La formulation 1 a donné une taille moyenne de nanoparticules inférieure à 100 nm, avec une valeur qui est relativement élevée par rapport aux autres formulations. Cela est dû aux concentrations d'alginate/copolymère assez élevées. Une quantité importante de polymères donne des nanocapsules de grande taille selon **Guinebrière et al (2002) (188)**. Il est possible que l'alginate et son copolymère forment des interactions électrostatiques entre eux, ce qui augmente la stabilité et la taille des nanoparticules.

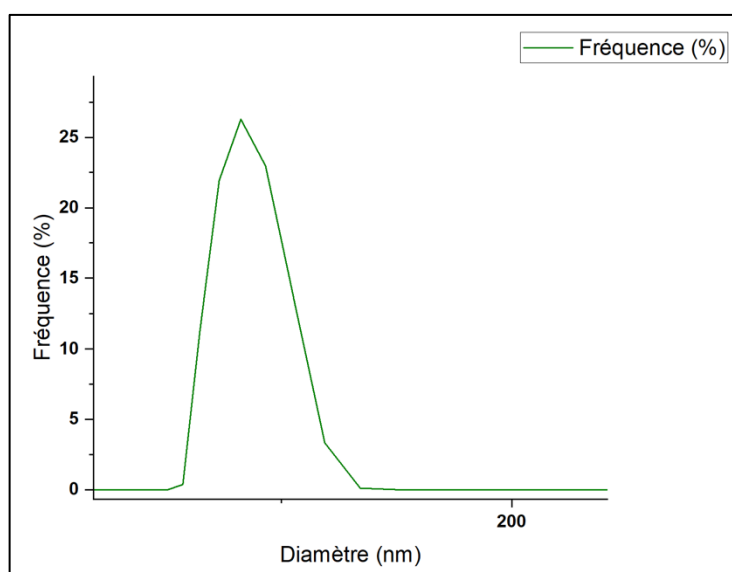


Figure 70 : Mesure de la taille des nanoparticules de la formulation 1

En revanche, la formulation 2 avec un rapport alginate/copolymère inférieur par rapport à la formulation 1 a montré une réduction marquée de la taille des NP, avec une valeur inférieure à 70 nm. Cette diminution peut être attribuée à la réduction de la quantité de polymères présents dans la matrice des nanoparticules. Une diminution des interactions électrostatiques entre l'alginate et son copolymère peut entraîner une diminution de la taille des nanoparticules.

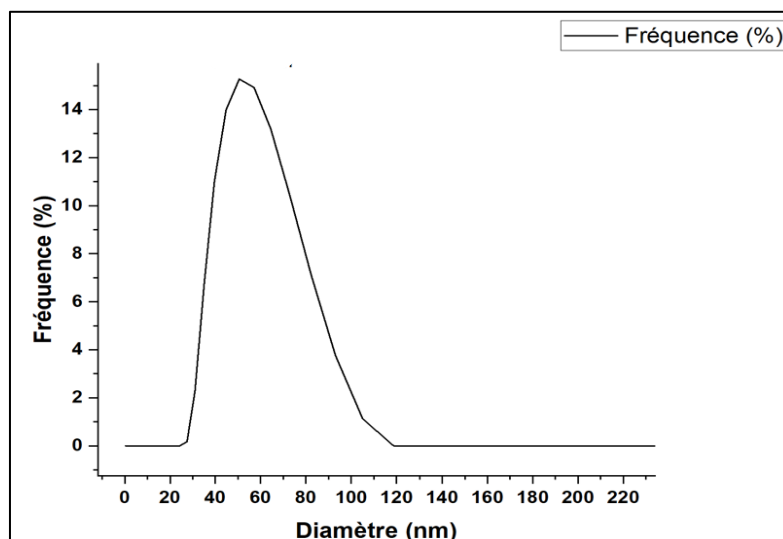


Figure 71 : Mesure de la taille des nanoparticules de la formulation 2

La troisième formulation a enregistré une taille avoisinant 50 nm, ce qui est légèrement supérieur à la deuxième formulation. Quant à la quatrième formulation a présenté une taille légèrement plus élevée supérieur à 70 nm, ce qui est proche de la première formulation. Cela peut s'expliquer par le fait que cette formulation contient une concentration plus élevée de chitosan par rapport à la troisième formulation. Il est possible que le chitosan forme d'avantage d'interactions électrostatiques avec l'huile essentielle de romarin, ce qui augmente la taille des nanoparticules.

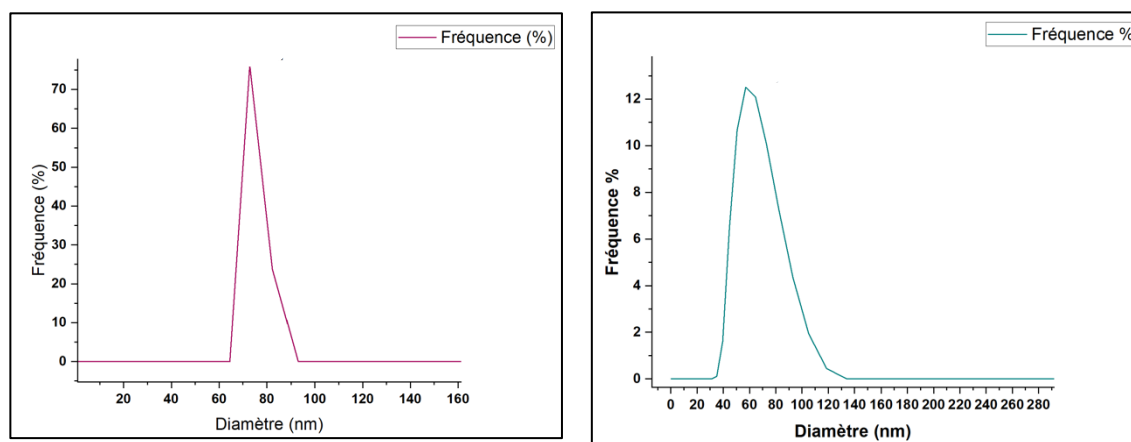


Figure 72 : Mesure de la taille des nanoparticules de la formulation 3 (à droite) et 4 (à gauche)

Une analyse comparative avec les résultats de **Natrajan et al.** révèle des différences notables. Ils ont obtenu pour leur formulation de nanoparticules une taille d'environ 226 nm, ce qui est considérablement plus élevé que notre résultat.

En ce qui concerne la comparaison avec les résultats **d'Ahmadi et al.**, nos troisième et quatrième formulations présentent des tailles de nanoparticules inférieures à celles obtenues dans leur étude (140 nm).

Nous avons réussi à synthétiser des nanoparticules de haute qualité avec une taille contrôlée dans la gamme de 1 à 100 nm. Cette taille est optimale pour les applications que nous visons, car elle permet d'exploiter les propriétés spécifiques des nanoparticules, comme la grande surface spécifique, la forte réactivité ou la luminescence. Comparativement aux études antérieures menées par d'autres chercheurs, nos résultats de taille des nanoparticules sont considérés comme excellents.

b) Détermination du potentiel zêta des nanoparticules :

Les résultats du potentiel zêta mesurent la charge électrique de surface des nanoparticules et fournissent des informations sur leur stabilité en solution. Un potentiel zêta élevé (positif ou négatif) indique une forte repulsion électrostatique entre les particules, ce qui favorise leur dispersion et leur stabilité en évitant leur agrégation.

Pour la première formulation avec un potentiel zêta de charge négative élevée. Cela indique une forte repulsion électrostatique entre les nanoparticules, ce qui favorise leur dispersion et leur stabilité en solution.

La deuxième formulation présente un potentiel zêta négatif plus élevée par rapport à la formulation 1. Ceci suggère une bonne stabilité des nanoparticules dans cette formulation, avec une forte repulsion électrostatique entre les particules.

La troisième formulation montre un potentiel zêta d'une charge positive. Cela peut être le résultat de l'interaction entre le chitosan et l'huile essentielle de romarin, conduisant à une charge positive de surface. Cette charge positive peut également contribuer à la stabilité des nanoparticules, en favorisant la repulsion électrostatique entre elles. La quatrième formulation présente un potentiel zêta de charge positif, presque similaire à la troisième formulation. Cette valeur indique une charge positive de surface, suggérant une bonne stabilité des nanoparticules.

Dans l'ensemble, les résultats du potentiel zêta indiquent une bonne stabilité des nanoparticules dans toutes les formulations étudiées. Les charges électriques de surface élevées, qu'elles soient négatives ou positives, favorisent la repulsion électrostatique entre les particules, empêchant ainsi leur agglomération et leur précipitation. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Keawchoon et al. (2011) (189)**. Dans notre étude, nous avons également observé des valeurs de potentiel zêta négatives, inférieurs à -28 mV, pour nos formulations 1 et 2. Ces valeurs sont comparables à celles rapportées par **Keawchoon et al.**, qui ont obtenu des valeurs de potentiel zêta négatives comprises entre -19 mV et -23 mV. Ainsi, nos résultats sont en cohérence avec les leurs, démontrant une charge négative de surface des nanocapsules dans les deux études. Cette similitude dans les résultats suggère une stabilité similaire des nanocapsules et une forte repulsion électrostatique entre les particules, contribuant à leur dispersion et à leur maintien en suspension. Ces observations renforcent la validité de nos résultats et soutiennent l'idée d'une bonne stabilité des formulations étudiées.

La présence d'une charge positive dans les nanoparticules à base de chitosane peut être attribuée aux groupements amines présents dans la structure chimique du chitosane (190).

c) Détermination de l'indice de polydispersité des nanoparticules :

L'indice de polydispersité (PDI) est une mesure de l'uniformité de la distribution de taille des nanoparticules. Plus la valeur du PDI est proche de zéro, plus la distribution est étroite et homogène. Une valeur élevée du PDI indique une distribution plus large et hétérogène des tailles de particules (168).

Pour la formulation 1 avec un PDI très proche de zéro, on peut observer une distribution relativement étroite des tailles de particules. Cela suggère que les NPs dans cette formulation ont une taille plus uniforme et sont relativement bien dispersées.

La formulation 2 présente un PDI proche de zéro mais un petit peu élevée que la formulation 1, ça qui indique une distribution légèrement plus large que la première formulation. Cela suggère une certaine hétérogénéité dans les tailles des nanoparticules, avec la présence de quelques particules de taille différente.

La formulation 3 montre un PDI, similaire à celui de la première formulation. Cela indique également une distribution relativement étroite et uniforme des tailles de nanoparticules, suggérant une bonne stabilité de la formulation.

En revanche, la formulation 4 présente un PDI très élevée. Cette valeur élevée suggère une distribution très large et hétérogène des tailles de particules. Il y a probablement une grande variabilité dans la taille des NPs, avec la présence de particules de tailles très différentes.

Nos résultats d'indice de polydispersité présentent une cohérence significative avec ceux obtenus par **Cai et al (2022) (191)**. Dans nos trois premières formulations, nous avons obtenu des valeurs d'indice de polydispersité qui sont comparables à celles rapportées par **Cai et al.**, qui ont obtenu des valeurs d'indice de polydispersité comprises entre 0,222 et 0,425. Ainsi, nos résultats sont en quasi-concordance avec les leurs, indiquant une distribution des tailles des nanoparticules relativement étroite dans les trois formulations. Une faible valeur d'indice de polydispersité suggère une homogénéité de taille des nanoparticules, ce qui est important pour assurer une stabilité et une efficacité optimales des systèmes de libération contrôlée. Ces résultats renforcent la fiabilité de nos mesures et la qualité de nos formulations en termes de distribution des tailles des nanoparticules.

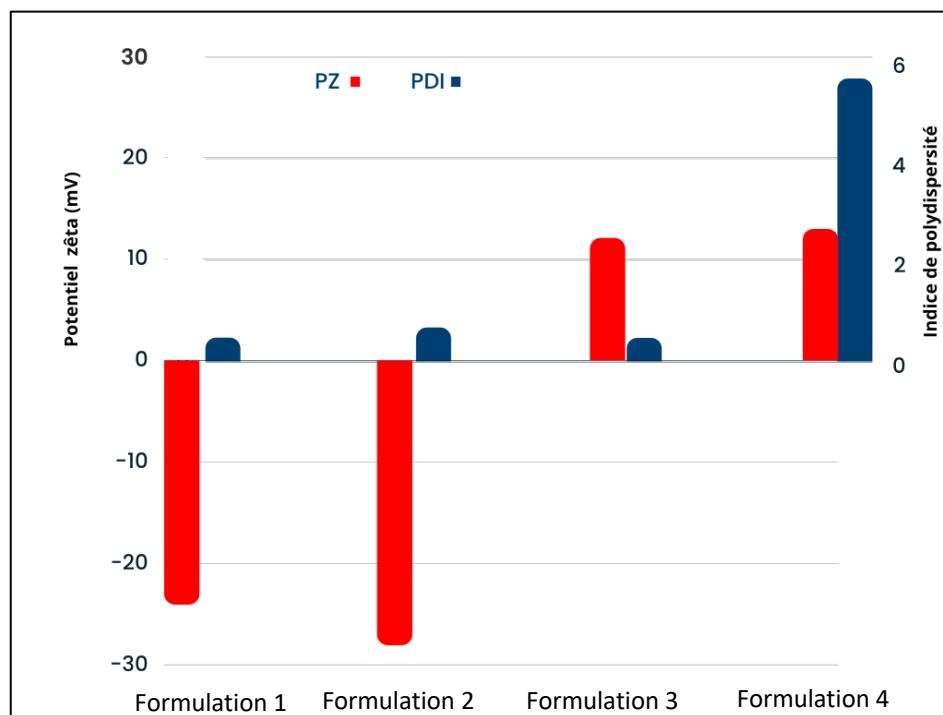


Figure 73 : Résultats de la mesure du potentiel zêta et du PDI des nanoparticules formulés

VII – Détermination du spectre de balayage de l'huile essentielle :

En réalisant des dilutions de l'huile essentielle de romarin dans de l'éthanol, nous avons pu obtenir le spectre de balayage UV-Vis de l'une des concentrations de dilutions. L'analyse du spectre nous a permis de quantifier la longueur d'onde à laquelle l'huile essentielle de romarin présente une absorption maximale, qui a été déterminée à 287 nm. Cette longueur d'onde spécifique correspond au point où l'huile de romarin absorbe le plus de lumière dans le spectre UV-Vis. En utilisant cette information, nous pouvons désormais effectuer des mesures précises de l'absorbance à 287 nm pour quantifier la concentration d'huile essentielle de romarin dans nos échantillons. La détermination précise de la longueur d'onde d'absorption maximale est essentielle pour une analyse précise et fiable de l'huile de romarin, permettant ainsi une évaluation précise de ses propriétés et de ses composants actifs.

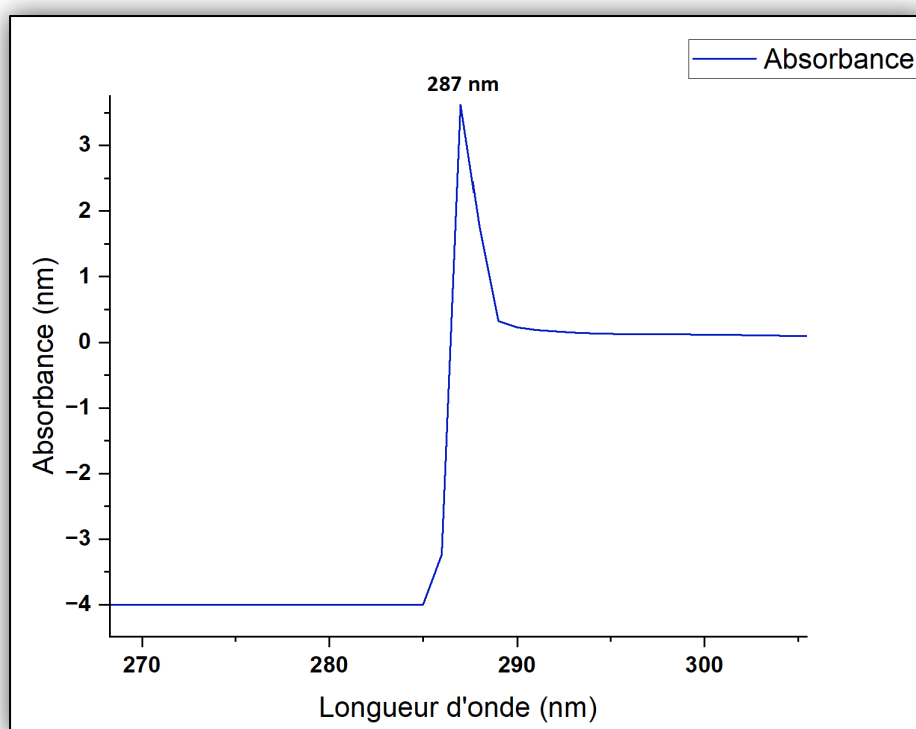


Figure 74 : Spectre de balayage de l'huile essentielle du romarin

VIII – Résultat de la détermination de l'efficacité d'encapsulation (EE) :

a) L'EE des nanoparticules à base de chitosane/alginate encapsulant l'HE de romarin :

• L'efficacité d'encapsulation de la formulation 1 :

Après lecture du surnageant par le spectrophotomètre UV-Vis, on a obtenu une absorbance de qui lors de l'extrapolation dans la courbe d'étalonnage, nous a permis d'obtenir la concentration de l'huile essentielle non encapsulée par la relation suivante :

$$y = 0,3411x - 0,0308$$

Où :

y : L'absorbance en nm

x : La concentration d'HE en mg/ml

Afin de convertir cette concentration en masse, nous avons utilisé la formule suivante :

$$C = \frac{m}{V}$$

Où :

C : La concentration de l'huile essentielle non encapsulée

V : Le volume du surnageant

$$m = C.V$$

Où :

m : La quantité de l'huile essentielle libre non encapsulée (mg)

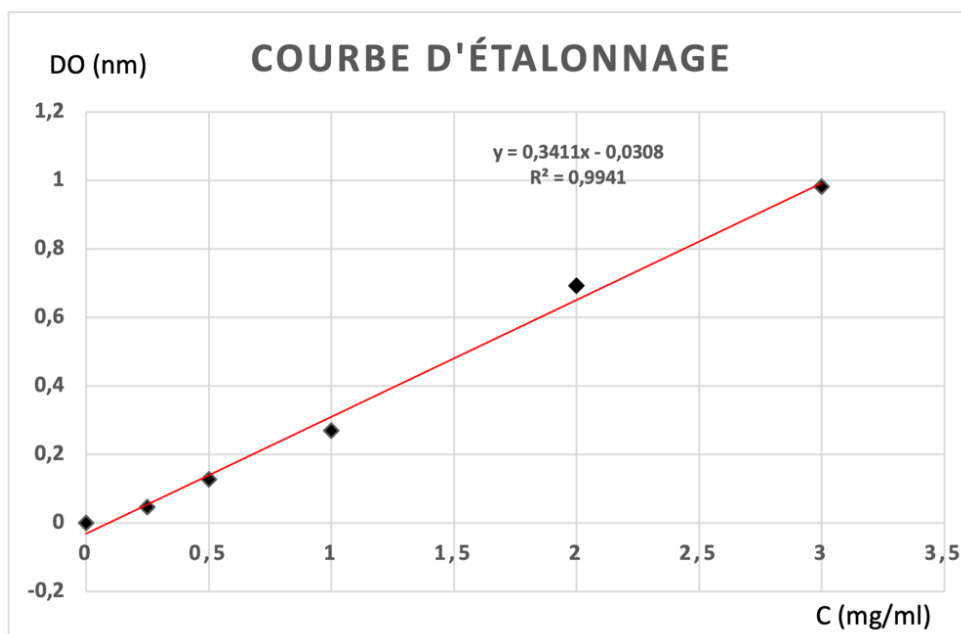


Figure 75 : Courbe d'étalonnage de l'huile essentielle du romarin

Après on calcule :

$$m_1 = C1(mg/ml).V (ml)$$

Où :

m_1 : La masse de l'huile essentielle non encapsulée lors de la formulation 1

$C1$: La concentration de l'huile essentielle non encapsulée lors de la formulation 1

En appliquant cette formule, nous avons pu calculer la quantité de l'huile essentielle qui a été non encapsulée. On détermine maintenant par la méthode suivante le taux d'EE :

$$EE_1(\%) = \frac{(Quantité\ totale\ d'HE - Quantité\ libre\ d'HE)}{Quantité\ totale\ d'HE} \times 100$$

Où :

EE_1 : Le taux d'encapsulation des NPs dans la formulation 1

Les résultats obtenus pour le taux d'encapsulation des formulation 1 sont très prometteurs, avec un taux d'encapsulation excellent. Ce pourcentage élevé indique que la majorité de l'HE du romarin a été encapsulée avec succès à l'intérieur des nanoparticules de la formulation 1.

Une encapsulation aussi efficace est bénéfique car elle garantit une concentration élevée de l'HE dans les nanoparticules, cela signifie qu'une plus grande quantité de l'huile est préservée et protégée de la dégradation. De plus, une encapsulation efficace permet de réduire les pertes et les fuites de l'huile essentielle, ce qui peut contribuer à une libération contrôlée et prolongée de ses composants actifs.

Il convient de noter que cette valeur d'encapsulation élevée est significativement supérieure à celle rapportée par **Natrajan et al.** dans leur étude similaire. **Natrajan et al.** ont obtenu un taux d'encapsulation de 86,9% en utilisant un procédé similaire, mais sans les modifications apportées dans notre étude.

- **L'efficacité d'encapsulation des NPs dans la formulation 2 :**

En utilisant une méthode d'extrapolation de l'absorbance obtenu sur la courbe d'étalonnage en employant l'équation de la courbe on a pu obtenir la concentration de l'huile essentielle libre dans le supernagent.

Pour calculer la masse on multiplie la concentration par le volume de surnageant :

$$m_2 = C_2 (mg/ml) \cdot V (ml)$$

Où :

m_2 : La masse de l'huile essentielle non encapsulée lors de la formulation 2

C_2 : La concentration de l'huile essentielle non encapsulée lors de la formulation 2

On calcule maintenant le taux $EE_2(\%)$ qui est le taux d'encapsulation des NPs de la formulation 2.

Les résultats obtenus ont démontré un taux d'encapsulation aussi très élevé. Cette efficacité d'encapsulation élevée indique que la modification de la concentration des polymères dans la formulation n'a pas compromis la capacité des nanoparticules à encapsuler l'huile de romarin. La comparaison des résultats entre les deux formulations 1 et 2 montre une similarité frappante.

- **L'efficacité d'encapsulation des NPs dans la formulation 3 :**

En utilisant une méthode d'extrapolation de l'absorbance obtenu sur la courbe d'étalonnage en employant l'équation de la courbe on a pu obtenir la concentration de l'huile essentielle libre dans le supernagent.

Pour calculer la masse on multiplie la concentration par le volume de surnageant :

$$m_3 = C3 (mg/ml).V (ml)$$

Où :

m_3 : La masse de l'huile essentielle non encapsulée lors de la formulation 3

$C3$: La concentration de l'huile essentielle non encapsulée lors de la formulation 3

On calcule maintenant le taux EE_3 (%) qui est le taux d'encapsulation des NPs de la formulation 3.

Nos résultats sont en accord avec ceux de l'étude menée par **Ahmadi et al.** Bien que des modifications aient été apportées à notre procédé, nous avons obtenu un taux d'encapsulation qui était plus élevée par rapport aux formulations 1 et 2, qui était de même plus élevé que ceux d'Ahmadi et al. Qui ont obtenu un taux d'encapsulation de 92,49% en utilisant un procédé similaire. Ces résultats concordants renforcent la validité de notre approche et confirment l'efficacité de notre méthodologie dans l'encapsulation de l'huile essentielle de romarin dans les nanoparticules de chitosane. La similarité des résultats entre les deux études suggère la reproductibilité et la robustesse de notre procédé amélioré. Ce taux d'encapsulation assez élevé suggère que le processus de formation des nanoparticules de chitosane a été efficace pour piéger et retenir l'huile essentielle de romarin à l'intérieur de la matrice de chitosane.

- **L'efficacité d'encapsulation des NPs dans la formulation 4 :**

En utilisant une méthode d'extrapolation de l'absorbance obtenu sur la courbe d'étalonnage en employant l'équation de la courbe on a pu obtenir la concentration de l'huile essentielle libre dans le surnageant.

Pour calculer la masse on multiplie la concentration par le volume de surnageant :

$$m_4 = C_4 (mg/ml) \cdot V (ml)$$

Où :

m_4 : La masse de l'huile essentielle non encapsulée lors de la formulation 4

C_4 : La concentration de l'huile essentielle non encapsulée lors de la formulation 4

On calcule maintenant le taux EE_4 (%) qui est le taux d'encapsulation des NPs de la formulation 4.

En comparant nos résultats à ceux de notre première formulation, nous constatons une amélioration légère mais significative du taux d'encapsulation avec une concentration de chitosane plus élevée. Cette observation suggère que l'augmentation de la concentration de chitosane peut avoir un impact positif sur l'efficacité d'encapsulation. Cela démontre la capacité de notre méthode à fournir une encapsulation efficace de l'huile essentielle de romarin, quel que soit le niveau de concentration de chitosane utilisé.

IX – Résultats de la détermination in vitro du profil de libération :

La libération de médicaments ou d'huile à partir de nanoparticules peut se produire par divers mécanismes, notamment par l'érosion de surface qui implique la dégradation progressive de la couche externe de la particule, conduisant à la libération de la substance encapsulée. La désintégration fait référence à la décomposition physique de la structure des particules, permettant la libération. La diffusion implique le mouvement progressif des molécules à travers la matrice des particules et dans le milieu environnant. La désorption se produit lorsque les molécules se détachent de la surface des particules et pénètrent dans le milieu environnant. Ces mécanismes jouent un rôle crucial dans le contrôle de la libération de médicaments ou d'huiles à partir de particules, permettant des profils de libération sur mesure et des systèmes d'administration optimisés (192).

Les résultats obtenus ont montré des variations significatives dans les pourcentages de libération cumulative après 4 heures pour chaque formulation et chaque pH :

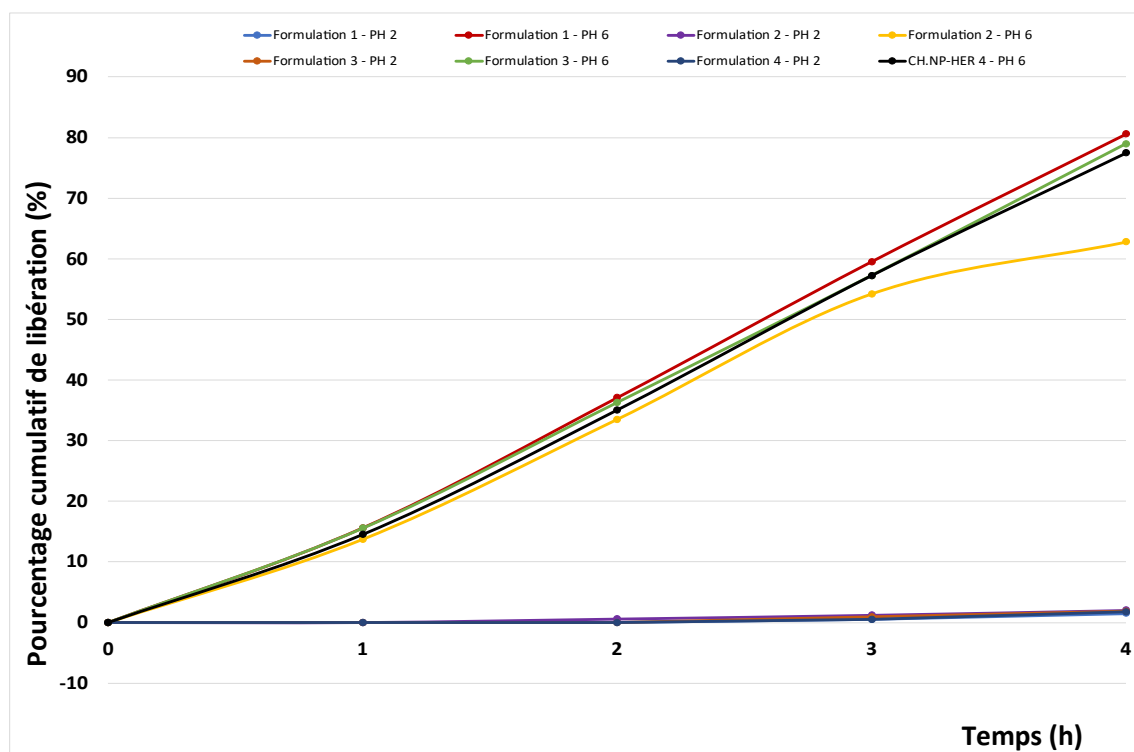


Figure 76 : Profil de libération in vitro des nanoparticules formulés dans le milieu acide et basique

La faible libération de l'huile par les nanoparticules à pH 2 dans formulations 3 et 4 peut être due à la charge positive des groupes amino protonés présents sur le chitosane pouvant favoriser l'interaction et la rétention de l'huile essentielle au sein des nanoparticules (172). Autre théorie qu'à pH acide, l'environnement est riche en ions H^+ (protons). Les groupes amine protonés du chitosane peuvent interagir avec les ions H^+ par des interactions ioniques, ce qui renforce les interactions entre les particules et peut réduire la libération de l'huile essentielle.

Pour la formulation 1 et 2 c'est peut être due aussi à des interactions électrostatiques entre les groupes ioniques du copolymère et les composants de l'huile essentielle ainsi qu'avec les groupements carboxylates de l'alginate pouvant renforcer la structure des nanoparticules, empêchant ainsi une libération significative de l'HE.

Toutefois ces résultats renforcent le fait que les nanoparticules formulés, peuvent résister à l'environnement acide de l'estomac et maintenir une libération contrôlée de l'huile essentielle. Cela peut être avantageux car cela permet de protéger l'huile essentielle de la dégradation ou de la libération prématurée dans l'estomac, et de la transporter jusqu'au site d'action souhaité, comme l'intestin grêle dans sa partie supérieur où se produit l'absorption.

À pH 6, la libération initiale de l'huile en rafale dans les quatre formulations était due au fait que les molécules adsorbées à la surface des particules de l'HE qui était piégée près de la surface des particules, lorsque les nanoparticules étaient en contact avec le milieu de dissolution, la vitesse de dissolution élevée du polymère près de la surface a conduit à la libération rapide de ces molécules adsorbées de l'huile piégée dans cette région. Cela a entraîné la libération initiale d'une quantité importante d'HE, ce qui a entraîné le phénomène de libération par éclatement observé (Burst release) (193).

Dans une solution légèrement alcaline, la déprotonation des groupes amines du chitosane provoque une modification de l'équilibre de charge, affaiblissant l'interaction ionique et conduisant potentiellement à la déstabilisation ou à la désintégration des particules ce qui affaiblit les interactions ioniques entre le chitosane cationique et les anions présents dans l'environnement notamment ceux du TPP, d'où libération de l'huile essentielle (172).

La libération accrue de l'huile essentielle dans un milieu (pH 6) suggère que les nanoparticules formulés peuvent être efficacement décomposées dans l'intestin grêle, permettant ainsi une absorption améliorée de l'huile essentielle ce qui confirme bien nos ambitions.

Ces résultats suggèrent que les nanoparticules à base de chitosane ou bien de copolymère/alginate sont capables de moduler la libération de l'huile essentielle en fonction du pH de l'environnement. Cela peut être bénéfique dans le contexte de la délivrance ciblée d'agents thérapeutiques, prouvant que les nanoparticules peuvent être conçues pour libérer leur contenu de manière contrôlée dans des zones spécifiques du tractus gastro-intestinal.

X – Analyse des résultats obtenus par FTIR de nos échantillons :

Nous présenterons en détail lors de cette partie, les différents résultats obtenus à la suite de l'analyse FTIR des différents échantillons . Nous interpréterons également les pics observés afin de mieux comprendre la composition et les interactions moléculaires de chaque échantillon. L'analyse FTIR est une technique puissante qui permet d'identifier les groupes fonctionnels présents dans les échantillons et de détecter d'éventuelles modifications chimiques. En examinant les spectres obtenus, nous pourrions tirer des conclusions sur la présence et l'intégrité des composants actifs, ainsi que sur les interactions entre les différentes matrices et les ingrédients actifs encapsulés.

- **Détermination des résultats de l'analyse FTIR de l'huile essentielle :**

L'analyse par FTIR de l'HE de romarin a révélé un pic distinct à une position de 3452 cm^{-1} dans le spectre infrarouge. Ce pic est attribué à la vibration d'étirement de liaison **O-H** (hydroxyle). La présence de ce pic indique la présence de groupes hydroxyle dans l'HE de romarin, suggérant la présence de composés contenant des alcools ou des phénols. Un autre pic caractéristique a été observé à une position de 2950 cm^{-1} dans le spectre IR. Ce pic est attribué à la vibration d'étirement de liaison **C-H** (alkyle) des groupes méthyle et méthylène présents dans l'HE. La présence de ce pic indique la présence d'hydrocarbures aliphatiques dans l'huile de romarin, tels que les terpènes, qui sont des composés volatils couramment trouvés dans les huiles essentielles. Un pic distinct a été observé à une position de 1743 cm^{-1} dans le spectre infrarouge. Ce pic est attribué à la vibration d'étirement de la liaison **C=O** (carbonyle), suggérant la présence de composés carbonylés dans l'HE de romarin. Les composés carbonylés généralement trouvés dans les huiles essentielles de plantes comprennent les cétones, les aldéhydes, les esters et les acides carboxyliques. Une petite bande a été observé à une position de 1635 cm^{-1} dans le spectre infrarouge. Ce pic est attribué à la vibration d'étirement de la liaison **C=C** (double liaison carbone-carbone), ce qui suggère la présence de composés insaturés tels que les terpènes. Deux petits pics ont été observés à des positions de 1458 cm^{-1} et 1369 cm^{-1} dans le spectre infrarouge. Ces pics sont attribués à la vibration d'étirement de la liaison **C-H** (alkyl) dans l'huile essentielle. Comme on a constaté aussi un pic à 981 cm^{-1} , la présence de liaisons **C-H** caractéristiques des groupes alkyle dans l'HE.

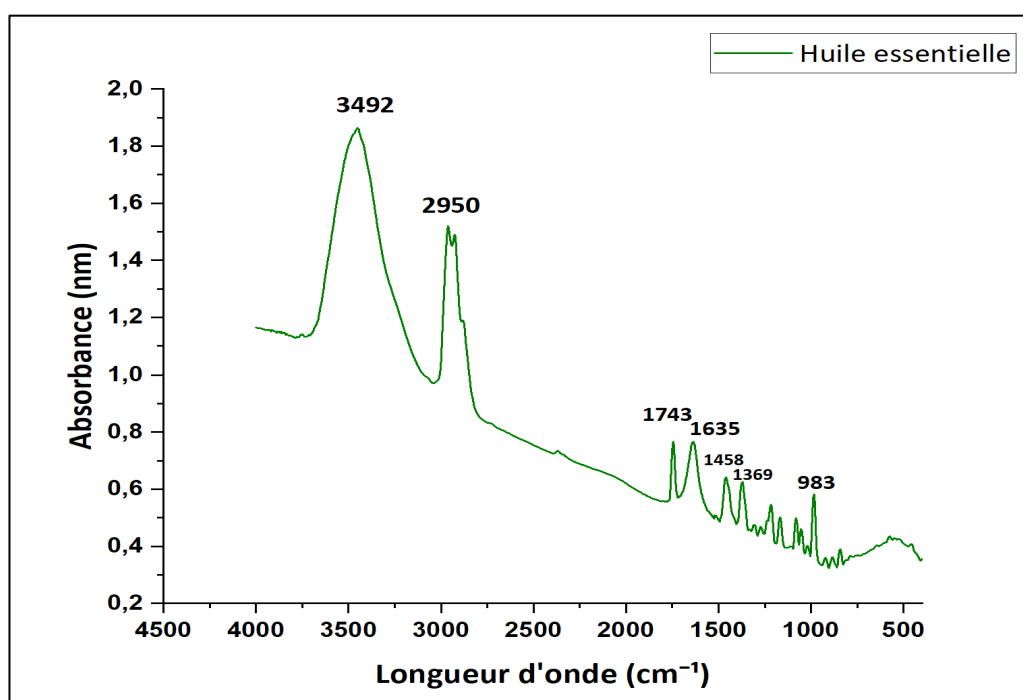


Figure 77 : Spectre FTIR de l'analyse de l'huile essentielle

▪ **Détermination des résultats de l'analyse FTIR des nanoparticules d'alginate/copolymère :**

Après analyse des nanoparticules de copolymère/alginate blanc sans huile essentielle, nous avons constaté que le pic est resté à 3502 cm^{-1} ce qui suggère que les groupements **OH** n'ont pas interagit lors de la formation des nanoparticules. Cependant en comparant ce résultat avec l'analyse du spectre infrarouge des nanoparticules encapsulant l'huile de romarin **Figure 78**, on s'est aperçu que le pic a été déplacé vers 3407 cm^{-1} ce qui suggère qu'il y'ait eu une interaction faible entre les groupements OH/amines de l'huile de romarin avec ceux de l'alginate et du copolymère par formation de liaisons hydrogènes. Un autre pic a été observé à 1742 cm^{-1} dans le spectre FTIR des nanocapsules de copolymère/alginate encapsulant l'huile essentielle qui suggère peut être l'implication de groupes carbonyles (**C=O**), caractéristiques aux composés cétones, aldéhydes présents dans l'huile essentielle ce qui confirme effectivement la présence de notre huile au sein des nanocapsules. Ainsi qu'un autre pic proéminent à 1460 cm^{-1} dans le même spectre, qui peut être attribué à la vibration d'étirement des groupes alkyle caractérisé aux composés de l'huile de romarin (terpènes), autre preuve que l'HE est effectivement présente au sein de notre formulation de nanocapsules. La présence d'un pic à 1635 cm^{-1} dans le spectre du blanc des nanoparticules indique la présence de groupement carboxyle (**-C(O)OH**) de l'alginate associé avec celui du copolymère (164).

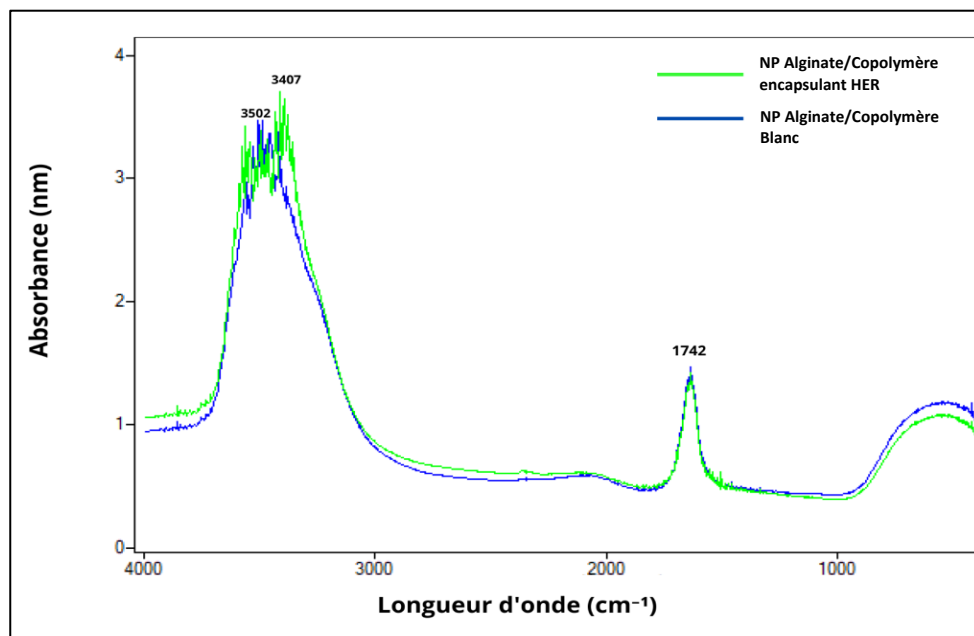


Figure 78 : Spectre FITR de l'analyse de nanoparticules d'Alginate/Copolymère encapsulant l'HERO et leurs NPs blancs

▪ **Détermination des résultats de l'analyse FTIR des nanoparticules à base de chitosane :**

L'analyse FTIR des nanoparticules à base de chitosane encapsulant l'huile essentielle de romarin a révélé un pic proéminent à 3402 cm^{-1} dans le spectre. Ce pic peut être attribué à la vibration d'étirement des groupes hydroxyle (-OH). Cela suggère que les groupes hydroxyles du chitosane interagissent probablement avec les groupes hydroxyle ou d'autres groupes fonctionnels présents dans l'huile essentielle, qui prouve que notre huile essentielle de romarin a été encapsulée avec succès. Lors de l'analyse du même spectre et du spectre d'infrarouge de nanoparticules à base de chitosane blanc, une bande s'est formé à la longueur d'onde 1510 cm^{-1} (**amide II**) démontrant une interaction et association électrostatique entre le groupement PO_4^{3-} du Tripolyphosphate de sodium et du groupe NH_3^+ de chitosane (194).

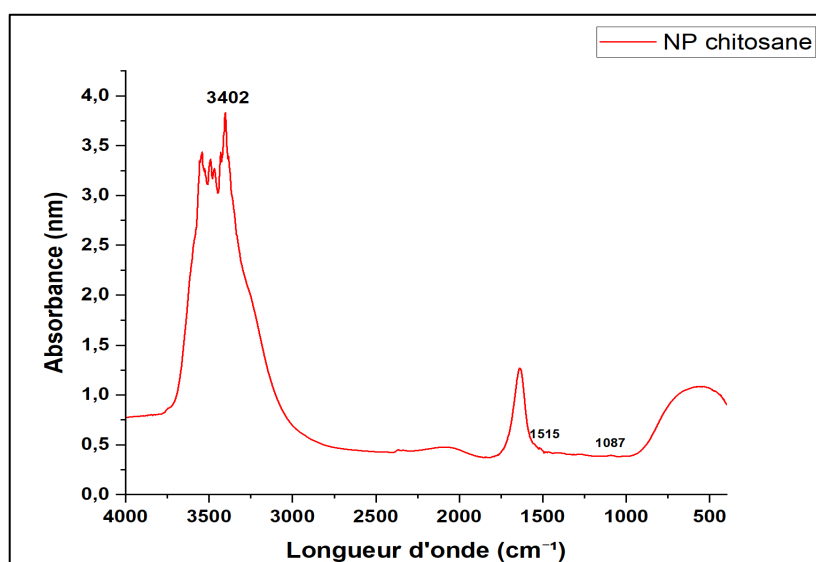


Figure 79 : Spectre FTIR de l'analyse de nanoparticules de chitosane

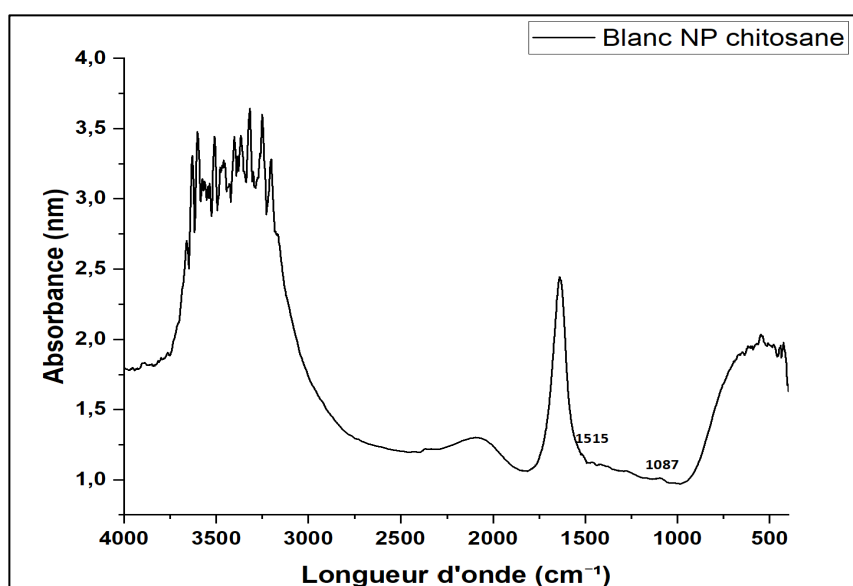


Figure 80 : Spectre FTIR de l'analyse du blanc de nanoparticules de chitosane

La présence d'un pic à 1635 cm^{-1} dans le spectre infrarouge du chitosane suggère l'implication de la bande amide I, qui est principalement associée à la vibration d'étirement de la liaison C=O dans le groupe amide (195).

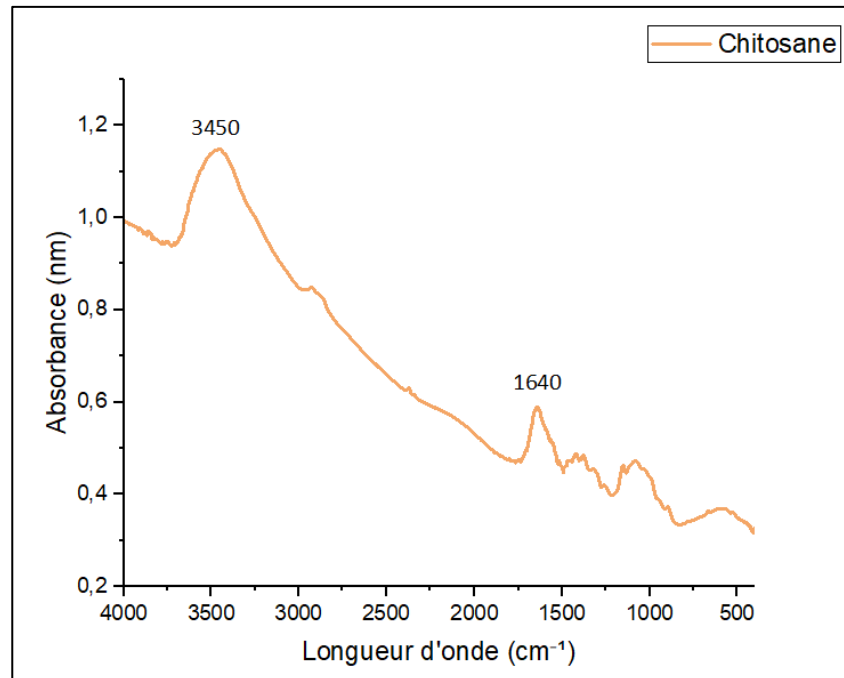


Figure 81 : Spectre FITR de l'analyse du polymère de chitosane

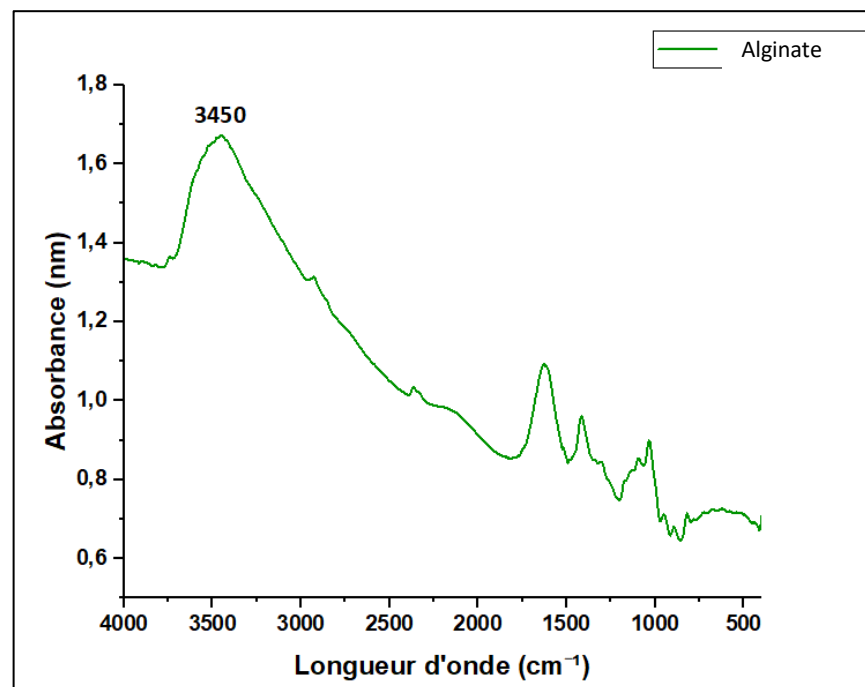


Figure 82 : Spectre FITR de l'analyse du polymère de d'alginate de sodium

XI – Résultat de l'observation sous microscope optique :

Les résultats obtenus grâce à l'observation des nanoparticules au microscope optique sont significatifs et offrent des informations importantes sur leurs morphologie. La présence de particules avec une forme bien sphérique avec une surface dense suggère une bonne uniformité et une stabilité des nanoparticules synthétisées. La visualisation de l'huile essentielle encapsulée à travers les nanoparticules confirme le succès de la méthode d'encapsulation utilisé.

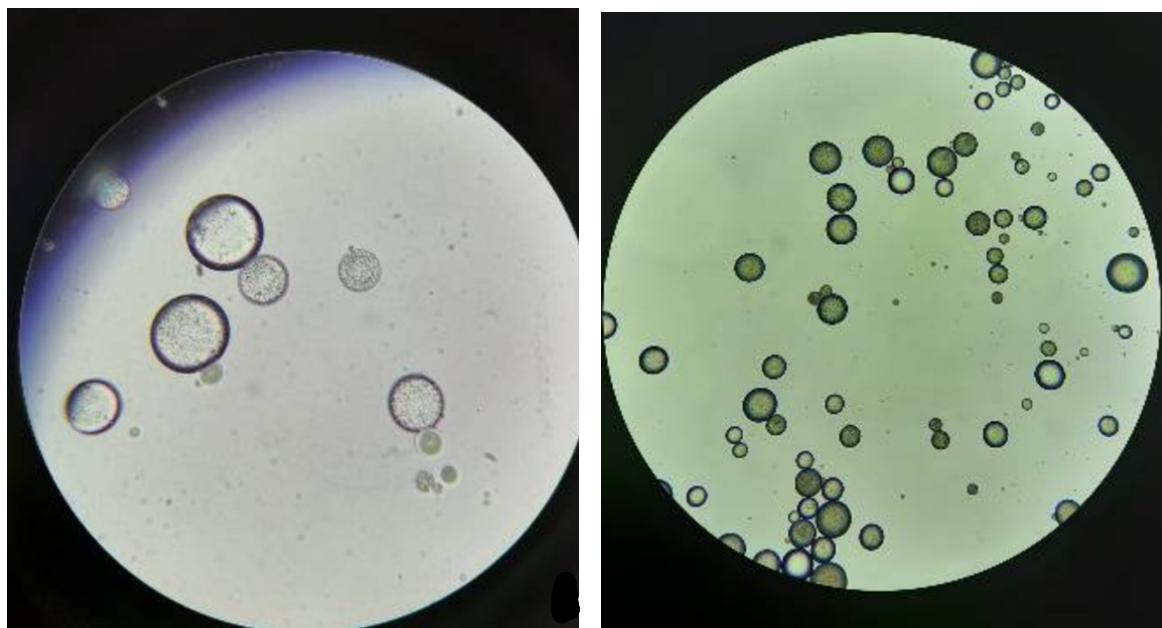


Figure 83 : Nanoparticules observés au microscope optique à l'objectif (40 X)

Il convient de noter tout de même que l'observation au microscope optique fournit une vue d'ensemble des nanoparticules, mais ne permet pas une analyse détaillée de leur taille exacte, de leur distribution et de leur structure.

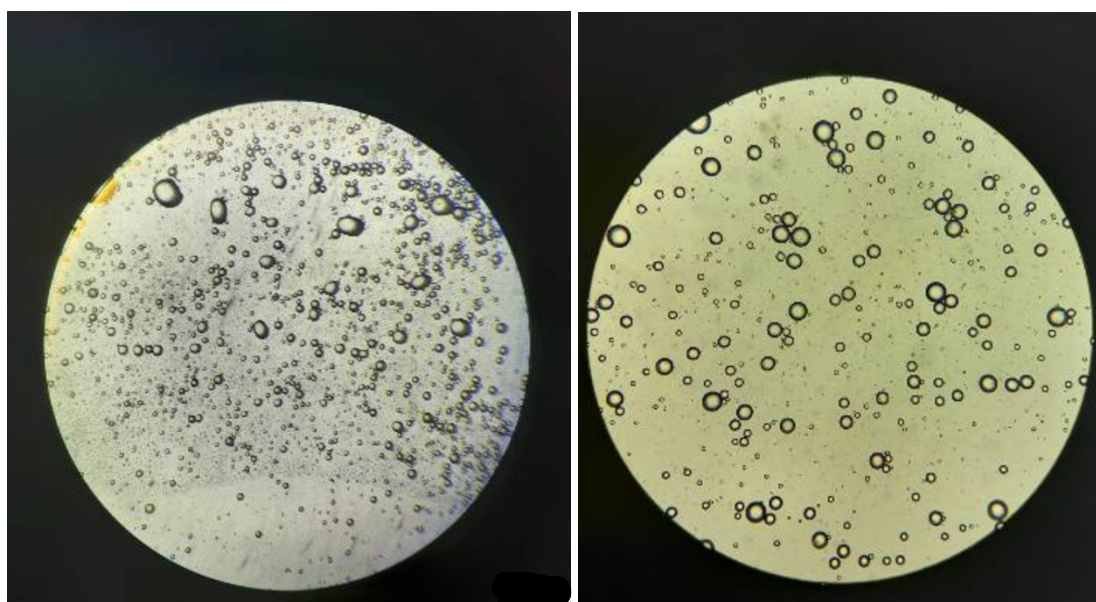


Figure 84 : Observation d'une dispersion de nanoparticules à l'objectif (40 X)

XII - Résultat de l'observation sous microscope électronique à balayage :

Les résultats de la microscopie électronique à balayage (MEB) sont présentés dans les figures suivantes. Ces images fournissent une visualisation plus ou moins détaillée des nanoparticules étudiées, permettant d'observer leur morphologie, leur taille et leur structure.

Nous avons utilisé la technique du high vacuum pour l'observation des échantillons au MEB, permettant ainsi une meilleure résolution et une meilleure visualisation des détails des NP :

- **Observation sous MEB des nanoparticules à base d'alginate/copolymère encapsulant PHE :**

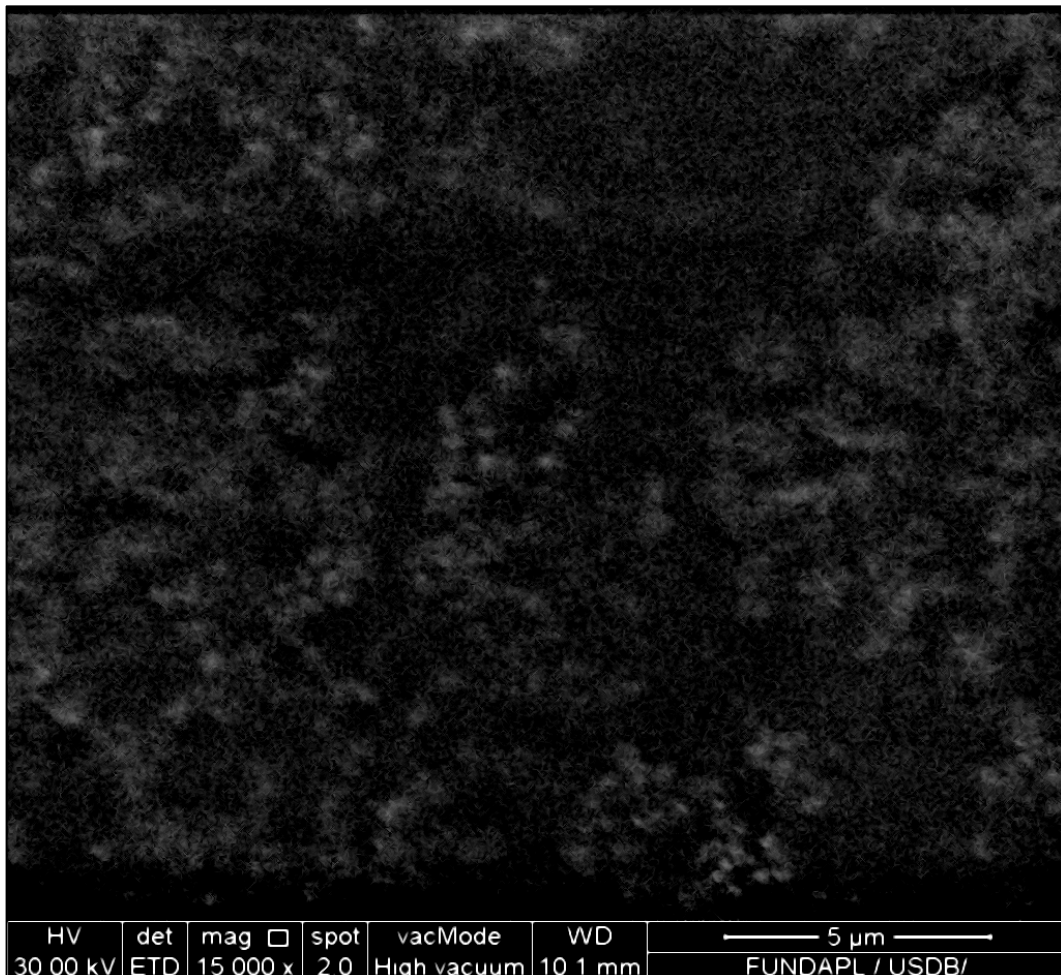


Figure 85 : Formulation 1 observé par le MEB à l'objectif (15000 X)

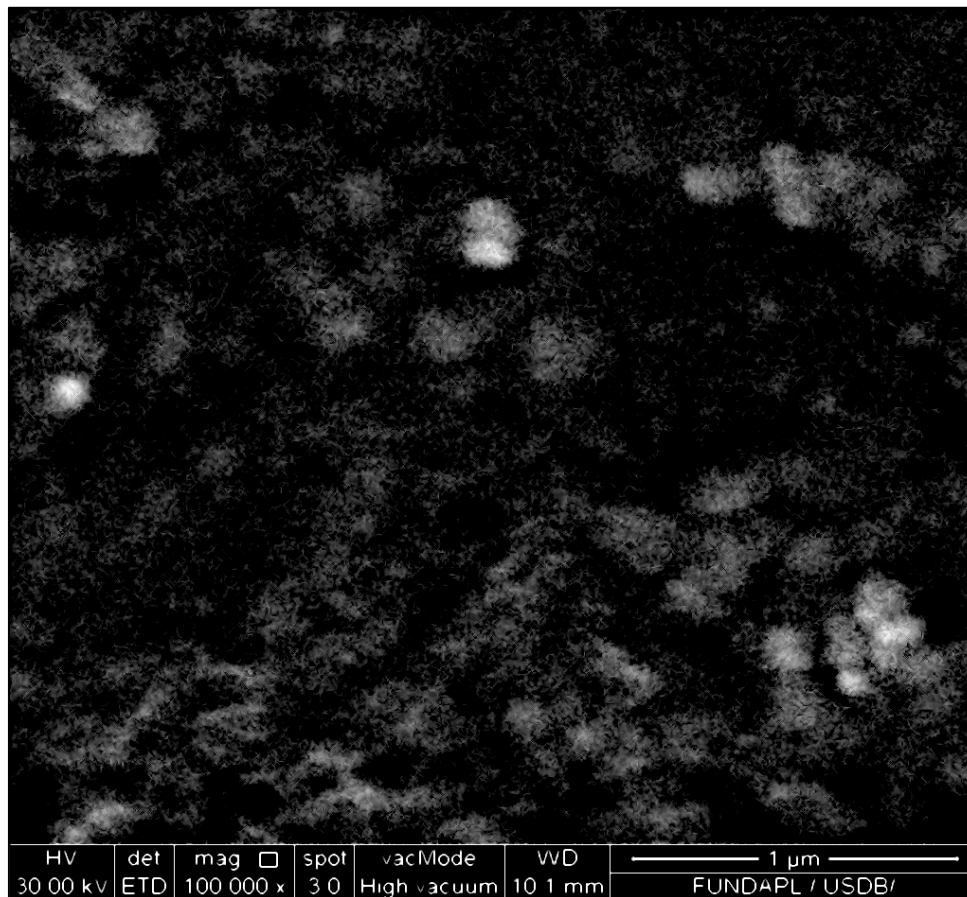


Figure 86 : Formulation 1 observé par le MEB à l'objectif (100000 X)

- **Observation sous MEB des nanoparticules à base de chitosane encapsulant l'HE :**

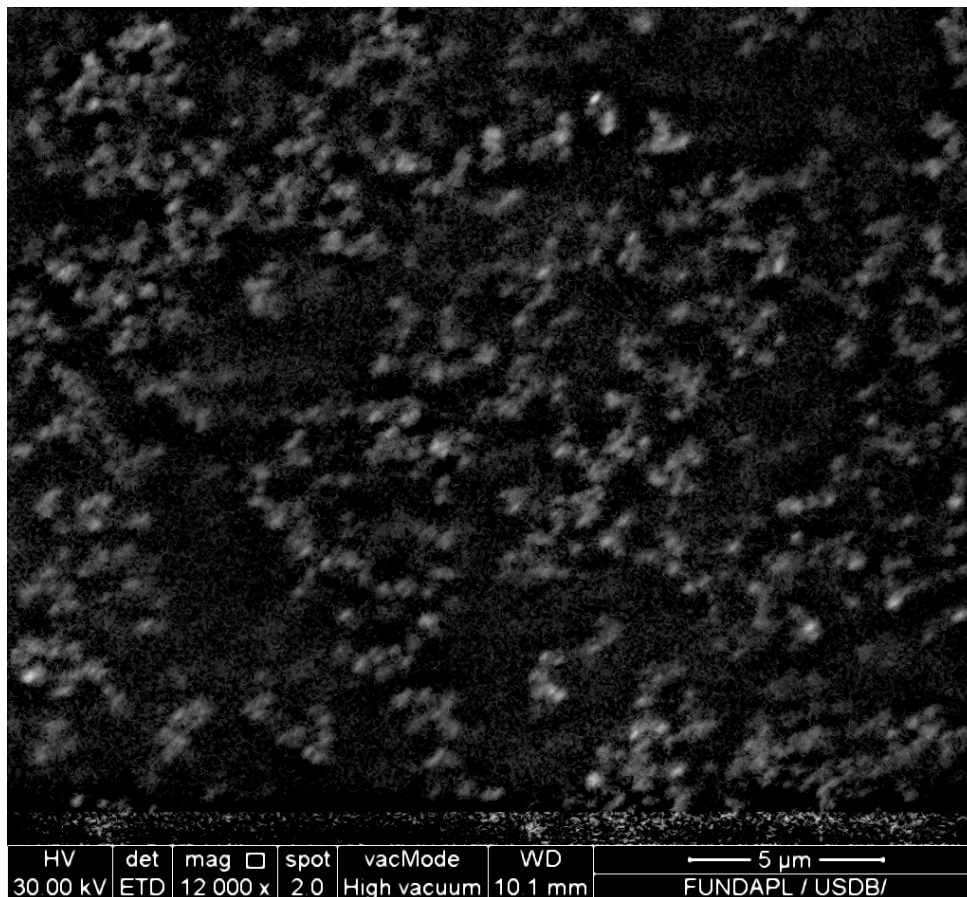


Figure 87 : Formulation 3 observé par le MEB à l'objectif (12000 X)

Lors de l'observation des nanoparticules dans le microscope électronique à balayage (MEB), nous avons obtenu des résultats prometteurs. Bien que la structure et la forme précises des nanoparticules n'aient pas été clairement discernées, nous avons pu observer leur présence dans les échantillons. Il convient de noter que les nanoparticules étaient en suspension avant l'observation, ce qui peut représenter un défi à surmonter lors de l'observation au MEB. Malgré cela, nous avons pu visualiser un agglomérat de différentes nanoparticules présentant une structure homogène dans les deux formulations étudiées.

En utilisant l'échelle disponible dans le logiciel du MEB, nous avons pu estimer approximativement la taille des nanoparticules. Les nanoparticules de chitosane/alginate ainsi que les nanoparticules de chitosane dans les formulations 1, 2, 3 et 4 présentaient des tailles inférieures à 100 nm. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues par diffusion de la lumière dynamique (DLS). Il convient de souligner que le MEB n'est pas la méthode standard pour mesurer précisément la taille des nanoparticules, mais plutôt pour apprécier leur présence et observer leur forme et leur structure.

Bien que les résultats de l'observation au MEB aient permis de confirmer la présence des nanoparticules, la caractérisation plus détaillée de leur structure et de leur forme nécessiterait d'autres méthodes complémentaires. Néanmoins, l'utilisation du MEB s'est avérée précieuse pour apprécier la morphologie générale des nanoparticules et confirmer leur présence dans les échantillons étudiés.

CONCLUSION

L'étude menée sur l'encapsulation de l'huile de romarin dans des nanoparticules à base de chitosane et à base de l'alginate et de son copolymère a été une entreprise passionnante et prometteuse. À travers cette recherche, nous avons exploré les différentes activités pharmacologiques de l'huile, ainsi que les avantages potentiels de son encapsulation dans des nanoparticules fournissant une base solide pour l'exploration de nouvelles voies thérapeutiques.

L'huile de romarin a démontré son efficacité notable en tant qu'agent antibactérien, notamment contre des souches de *Staphylococcus aureus* et *Salmonella*, connus pour être des agents pathogènes couramment impliqués dans des infections fréquentes. De plus, son activité antifongique contre des souches de *Candida*, y compris *Candida albicans*, a été très marquée. L'activité antioxydante de l'huile de romarin a également été confirmée par le test sur le radical libre DPPH, avec un PI50 de 29,29, ce qui indique une forte capacité à neutraliser les radicaux libres et à protéger contre les dommages oxydatifs.

La formulation des nanoparticules encapsulant l'huile essentielle de romarin a été menée avec succès, mettant en évidence notre capacité à créer des particules bien définies et efficaces. Les différentes méthodes de caractérisation utilisées ont confirmé la qualité et les caractéristiques des NPs formulées. Les résultats obtenus par la DLS ont révélé des tailles de particules inférieures à 100 nm, témoignant de notre réussite à formuler des nanoparticules à l'échelle nanométrique. De plus, l'analyse du potentiel zêta a démontré une bonne stabilité des particules. Tandis que l'indice de polydispersité a permis de souligner que les nanoparticules formulés étaient bien homogènes sauf pour la formulation 4 étant très hétérogène. L'utilisation du FTIR a permis de déterminer les interactions chimiques et les composés présents au sein des nanoparticules, renforçant ainsi la confirmation de la réussite de la formulation.

Grâce à l'utilisation de la spectroscopie UV-vis, nous avons pu évaluer l'efficacité de l'encapsulation de l'HERO dans les NPs formulées. Les résultats obtenus ont confirmé que l'HE a été parfaitement encapsulée, avec un taux de encapsulation supérieur à 98 % dans la majorité des formulations. Cette encapsulation efficace garantit la stabilité et la préservation des propriétés de l'HER, tout en assurant une libération contrôlée au moment approprié.

De plus, le profil de libération in vitro a démontré que les NPs résisteraient à l'environnement gastrique et libéreraient l'huile essentielle dans l'intestin grêle pour une absorption optimale.

L'évaluation in vivo de l'activité anti-inflammatoire et analgésique, réalisée sur des souris suite à l'administration des nanoparticules encapsulant l'huile de romarin par voie orale, a révélé des résultats intrigant voir même impressionnant.

En ce qui concerne l'activité anti-inflammatoire, il a été démontré que les nanoparticules encapsulant l'huile essentielle présentaient une activité supérieure à celle de l'huile essentielle pure, même à des doses plus faibles. Cette constatation met en évidence le rôle protecteur des nanoparticules dans la préservation et la libération contrôlée de l'huile, en évitant sa dégradation prématurée et en favorisant son efficacité thérapeutique. Ces résultats soulignent l'importance de l'encapsulation des composés actifs dans des systèmes de délivrance appropriés tels que les nanoparticules pour améliorer leurs performances pharmacologiques. Alors que l'évaluation de l'activité analgésique avait mit en évidence une relation dose-réponse, avec d'excellents résultats pour les différents échantillons.

L'observation des nanoparticules formulées à l'échelle microscopique élevée a été rendue possible grâce au MEB. Cette technique nous a permis de visualiser les nanoparticules, confirmant ainsi leur présence dans les échantillons. nous avons pu obtenir des informations importantes sur la morphologie et la distribution des nanoparticules, ce qui renforce notre confiance dans la formulation réussie des nanoparticules encapsulant l'huile de romarin.

Cette étude n'est qu'un premier pas vers l'exploration plus approfondie des applications potentielles de ces nanoparticules. Il reste encore beaucoup de travail à faire pour optimiser les formulations, étudier d'avantage leur stabilité, leur biodisponibilité et leur activité pharmacologique in vivo ainsi que in vitro. Nous espérons donc poursuivre nos recherches dans ce domaine passionnant et continuer à avancer vers de nouvelles avancées scientifiques. Ces nanoparticules offrent des perspectives intéressantes pour le développement de médicaments plus efficaces et mieux ciblés, ouvrant ainsi de nouvelles opportunités dans le domaine de la pharmacie et de la médecine.

Références

1. **Malshe A.** Nanotechnology. In: Chatti S, Laperrière L, Reinhart G, Tolio T, editors. CIRP Encyclopedia of Production Engineering. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 1260-7.
2. **ten Have H, Patrão Neves MdC.** Nanotechnology. Dictionary of Global Bioethics. Cham: Springer International Publishing; 2021. p. 757-.
3. The challenge of defining nanotechnology to a broad audience. **Omni nano**; 2017. Contents. Available from: <https://omninano.org/the-challenge-of-defining-nanotechnology-to-a/>.
4. **Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MdP, Acosta-Torres LS, et al.** Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. Journal of Nanobiotechnology. 2018;16(1):71.
5. **Healthline.** The Health Potential of Rosemary: **Healthline**; [December 19, 2016]. Available from: <https://www.healthline.com/health/rosemary-health-potential#cooking>
6. **Tolochko N.** History of nanotechnology. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS). 2009.
7. **Initiative NN.** What Is Nanotechnology? 2014 [Available from: <https://www.nano.gov/about-nanotechnology>].
8. **BC C.** Nanotechnology: molecular speculations on global abundance. Cambridge, MA: MIT Press; 1999.
9. **Institute F.** Frequently asked questions – Nanotechnology 2014 [Available from: <http://www.foresight.org/nano/whatisnano.html>].
10. **al LWe.** Eighth nanoforum report: nanometrology. 2006.
11. **EA M.** Nanotechnology. In: ed, editor. Concise medical dictionary. 8th ed ed. Oxford/ New York: Oxford University Press; 2010.
12. **Badillo P-Y.** Les nanotechnologies: un nouveau paradigme. Les Cahiers de l'ANR l'Agence nationale de la recherche (ANR) Paris, France Available at: <https://anr.fr/fileadmin/documents/2012/Cahier-ANR-5-nanotechnologies.pdf>. 2012.
13. **Feynman R.** There's plenty of room at the bottom. Feynman and computation: CRC Press; 2018. p. 63-76.
14. **Taniguchi N.** On the basic concept of nanotechnology. Proceeding of the ICPE. 1974.
15. **Drexler KE.** Engines of creation: Anchor books; 1986.
16. **Lok C.** Nanotechnology: small wonders. Nature. 2010;467(7311):18-21.
17. **gov n.** Applications of Nanotechnology: **National Nanotechnology Initiative**; [Available from: <https://www.nano.gov/about-nanotechnology/applications-nanotechnology>].
18. **Kuhn R, Bryant IM, Jensch R, Böllmann J.** Applications of Environmental Nanotechnologies in Remediation, Wastewater Treatment, Drinking Water Treatment, and Agriculture. Applied Nano. 2022;3(1):54-90.
19. **Kim BY, Rutka JT, Chan WC.** Nanomedicine. N Engl J Med. 2010;363(25):2434-43.
20. **(ESF) ESF.** Nanomedicine.
21. **Kenneth A. Howard TV-J, Dan Peer.** Nanomedicine: Springer New York, NY.
22. **Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, Alves F, Andrews AM, Ashraf S, et al.** Diverse Applications of Nanomedicine. ACS Nano. 2017;11(3):2313-81.
23. **Gregory A, Williamson D, Titball R.** Vaccine delivery using nanoparticles. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2013;3.

24. **Couvreur P, Kante B, Grislain L, Roland M, Speiser P.** Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *Journal of pharmaceutical sciences.* 1982;71(7):790-2.
25. **Kohane DS.** Microparticles and nanoparticles for drug delivery. *Biotechnology and bioengineering.* 2007;96(2):203-9.
26. **Kanwar R, Rathee J, Salunke DB, Mehta SK.** Green Nanotechnology-Driven Drug Delivery Assemblies. *ACS Omega.* 2019;4(5):8804-15.
27. **Pant A, Mackraj I, Govender T.** Advances in sepsis diagnosis and management: a paradigm shift towards nanotechnology. *Journal of Biomedical Science.* 2021;28(1):1-30.
28. **Papafilippou L, Claxton A, Dark P, Kostarelos K, Hadjidemetriou M.** Nanotools for sepsis diagnosis and treatment. *Advanced Healthcare Materials.* 2021;10(1):2001378.
29. **Li X, Robinson SM, Gupta A, Saha K, Jiang Z, Moyano DF, et al.** Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS nano.* 2014;8(10):10682-6.
30. What are Nanoparticles? Definition, Size, Uses and Properties: **TWI**; [Available from: <https://www.twi-global.com/technical-knowledge/faqs/what-are-nanoparticles>].
31. Size-comparison-Bio-nanoparticles nanometer scale comparison nanoparticle size comparison nanotechnology chart ruler. 2017. Contents. Available from: <https://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/>.
32. **Ijaz I, Gilani E, Nazir A, Bukhari A.** Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews.* 2020;13(3):223-45.
33. Ealia SAM, Saravanakumar M, editors. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP conference series: materials science and engineering*; 2017: IOP Publishing.
34. **Patravale V, Dandekar P, Jain R.** 2 - Nanoparticles as drug carriers. In: Patravale V, Dandekar P, Jain R, editors. *Nanoparticulate Drug Delivery*: Woodhead Publishing; 2012. p. 29-85.
35. **Rai M, Ingle AP, Bansod S, Kon K.** Chapter 9 - Tackling the Problem of Tuberculosis by Nanotechnology: Disease Diagnosis and Drug Delivery. In: Rai M, Kon K, editors. *Nanotechnology in Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Infectious Diseases*. Boston: Academic Press; 2015. p. 133-49.
36. **Gagliardi A, Giuliano E, Venkateswararao E, Fresta M, Bulotta S, Awasthi V, et al.** Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Front Pharmacol.* 2021;12:601626.
37. **Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, et al.** Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules.* 2020;25(16).
38. **Goyal RK.** *Nanomaterials and nanocomposites: synthesis, properties, characterization techniques, and applications*: CRC Press; 2017.
39. **Baig N, Kammakam I, Falath W.** Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances.* 2021;2(6):1821-71.
40. **Khan I, Saeed K, Khan I.** Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry.* 2019;12(7):908-31.
41. **Huang YW, Cambre M, Lee HJ.** The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).

42. **Wu Q, Miao W-s, Gao H-j, Hui D.** Mechanical properties of nanomaterials: A review. *Nanotechnology Reviews*. 2020;9(1):259-73.
43. **Keesom W.** On the deduction of the equation of state from Boltzmann's entropy principle'. *KNAW Proc.* 1912;15:240-56.
44. **Guo D, Xie G, Luo J.** Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *Journal of physics D: applied physics*. 2013;47(1):013001.
45. **Kaur P, Aliru ML, Chadha AS, Asea A, Krishnan S.** Hyperthermia using nanoparticles--Promises and pitfalls. *Int J Hyperthermia*. 2016;32(1):76-88.
46. **Alharbi R, Irannejad M, Yavuz M.** A short review on the role of the metal-graphene hybrid nanostructure in promoting the localized surface plasmon resonance sensor performance. *Sensors*. 2019;19(4):862.
47. **Mainard M, Jacob D.** Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. *Photoniques*. 2016(83):40-4.
48. **Stefaniak AB.** Principal metrics and instrumentation for characterization of engineered nanomaterials. *Metrology and Standardization of Nanotechnology: Protocols and Industrial Innovations*. 2017:151-74.
49. **Malatesta M.** Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23).
50. transmission electron microscope. **Encyclopædia Britannica**. Contents. Available from: <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope#/media/1/602949/110686>.
51. **Vladár AE, Hodoroaba V-D.** Chapter 2.1.1 - Characterization of nanoparticles by scanning electron microscopy. In: Hodoroaba V-D, Unger WES, Shard AG, editors. *Characterization of Nanoparticles*: Elsevier; 2020. p. 7-27.
52. **Kumar A, Dixit CK.** 3 - Methods for characterization of nanoparticles. In: Nimesh S, Chandra R, Gupta N, editors. *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*: Woodhead Publishing; 2017. p. 43-58.
53. Diagram of zeta potential and slipping plane. Contents. Available from: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18238739>.
54. **Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh NTK.** Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*. 2018;10(27):12871-934.
55. UV-Vis Spectroscopy: Principle [Available from: <https://www.smacgigworld.com/blog/principle-uv-vis-spectroscopy-.php>].
56. **Torres-Rivero K, Bastos-Arrieta J, Fiol N, Florido A.** Metal and metal oxide nanoparticles: an integrated perspective of the green synthesis methods by natural products and waste valorization: applications and challenges. *Comprehensive analytical chemistry*. 2021;94:433-69.
57. **Foulkes R, Man E, Thind J, Yeung S, Joy A, Hoskins C.** The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: current and future perspectives. *Biomaterials Science*. 2020;8(17):4653-64.
58. **Goel H, Saini K, Razdan K, Khurana RK, Elkordy AA, Singh KK.** Chapter 3 - In vitro physicochemical characterization of nanocarriers: a road to optimization. In: Kesharwani P, Singh KK, editors. *Nanoparticle Therapeutics*: Academic Press; 2022. p. 133-79.

59. **Letchford K, Burt H.** A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2007;65(3):259-69.
60. **Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A.** Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;385(1):113-42.
61. New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging **Scientific Figure on ResearchGate**. Contents. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-structure-of-a-nanocapsule-and-a-nanosphere-This_fig3_236089851.
62. **Young RJ, Lovell PA.** Introduction to polymers: CRC press; 2011.
63. **Britannica E.** polymer: **Britannica**; [Available from: <https://www.britannica.com/science/polymer>].
64. **Angelova N, Hunkeler D.** Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends in biotechnology*. 1999;17(10):409-21.
65. **Pillai O, Panchagnula R.** Polymers in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*. 2001;5(4):447-51.
66. **Arun A, Malrautu P, Laha A, Luo H, Ramakrishna S.** Collagen Nanoparticles in Drug Delivery Systems and Tissue Engineering. *Applied Sciences*. 2021;11(23):11369.
67. **Severino P, da Silva CF, Andrade LN, de Lima Oliveira D, Campos J, Souto EB.** Alginate nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current pharmaceutical design*. 2019;25(11):1312-34.
68. **Ritthidej GC.** Chapter 3 - Nasal Delivery of Peptides and Proteins with Chitosan and Related Mucoadhesive Polymers. In: Van Der Walle C, editor. *Peptide and Protein Delivery*. Boston: Academic Press; 2011. p. 47-68.
69. Structure of Alginate. Contents. Available from: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Alginat.svg>.
70. **Cheung RC, Ng TB, Wong JH, Chan WY.** Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs*. 2015;13(8):5156-86.
71. **Benjah-bmm27 E.** Chitosan chair: **Wikimedia Commons**; 2010 [Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chitosan_chair.png].
72. **Ramanujam R, Sundaram B, Janarthanan G, Devendran E, Venkadasalam M, Milton MJ.** Biodegradable polycaprolactone nanoparticles based drug delivery systems: a short review. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2018;15(3):679-85.
73. **da Luz CM, Boyles MSP, Falagan-Lotsch P, Pereira MR, Tutumi HR, de Oliveira Santos E, et al.** Polylactic acid nanoparticles (PLA-NP) promote physiological modifications in lung epithelial cells and are internalized by clathrin-coated pits and lipid rafts. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017;15(1):11.
74. **Cheaburu-Yilmaz CN, Karasulu HY, Yilmaz O.** Chapter 13 - Nanoscaled Dispersed Systems Used in Drug-Delivery Applications. In: Vasile C, editor. *Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics*: Elsevier; 2019. p. 437-68.
75. **Wang Y, Li P, Tran T, Zhang J, Kong L.** Manufacturing Techniques and Surface Engineering of Polymer Based Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Cancer. *Nanomaterials*. 2016;6:26.
76. **Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ.** Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*. 1997;63(1):125-32.
77. **Pedroso-Santana S, Fleitas-Salazar N.** Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polymer International*. 2020;69(5):443-7.

78. **Saini RK, Bagri LP, Bajpai AK, Mishra A.** 11 - Responsive polymer nanoparticles for drug delivery applications. In: Makhlof ASH, Abu-Thabit NY, editors. Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Volume 1: Woodhead Publishing; 2018. p. 289-320.
79. **Bruschi ML.** Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems: Woodhead Publishing; 2015.
80. **Kumari A, Yadav SK, Yadav SC.** Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and surfaces B: biointerfaces. 2010;75(1):1-18.
81. **Sahana D, Mittal G, Bhardwaj V, Kumar MR.** PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. Journal of pharmaceutical sciences. 2008;97(4):1530-42.
82. **Sheng Y, Yuan Y, Liu C, Tao X, Shan X, Xu F.** In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: effect of PEG content. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2009;20:1881-91.
83. **Damgé C, Maincent P, Ubrich N.** Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. Journal of controlled release. 2007;117(2):163-70.
84. **Bajpai A, Choubey J.** Release study of sulphamethoxazole controlled by swelling of gelatin nanoparticles and drug-biopolymer interaction. Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry. 2005;42(3):253-75.
85. **Arias J, Gallardo V, Ruiz M, Delgado A.** Ftorafur loading and controlled release from poly (ethyl-2-cyanoacrylate) and poly (butylcyanoacrylate) nanospheres. International journal of pharmaceutics. 2007;337(1-2):282-90.
86. **Sapavatu SN, Chinthala R, Jadi RK.** An overview on pharmacokinetics of polymeric nanoparticles intended for oral delivery. Journal of Young Pharmacists. 2020;12(3):Journal of Young Pharmacists.
87. **Ensign LM, Cone R, Hanes J.** Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. Advanced drug delivery reviews. 2012;64(6):557-70.
88. **Yao M, McClements DJ, Xiao H.** Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems. Current opinion in food science. 2015;2:14-9.
89. **Kadam RS, Bourne DW, Kompella UB.** Nano-advantage in enhanced drug delivery with biodegradable nanoparticles: contribution of reduced clearance. Drug Metabolism and Disposition. 2012;40(7):1380-8.
90. The four stages of Pharmacokinetics are represented by the acronym ADME. . Contents. Available from: <https://www.laxxonmedical.com/post/what-is-pharmacokinetics-four-stages-in-a-drug-traveling-within-the-body>.
91. **Gershenson J, Ullah C.** Plants protect themselves from herbivores by optimizing the distribution of chemical defenses. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2022;119(4):e2120277119.
92. **Ahmad M, Khan MA, Marwat SK, Zafar M, Khan MA, Hassan TU, et al.** Useful medicinal flora enlisted in Holy Quran and Ahadith. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2009;5(1):126-40.
93. **Falzon CC, Balabanova A.** Phytotherapy: an introduction to herbal medicine. Primary Care: Clinics in Office Practice. 2017;44(2):217-27.
94. **Heinrich M.** phytotherapy: **Encyclopedia Britannica**; 2017 [Available from: <https://www.britannica.com/science/phytotherapy>].
95. **Fisher P.** What is homeopathy? An introduction. Frontiers in Bioscience-Elite. 2012;4(5):1669-82.
96. **National Association for Holistic Aromatherapy.** What Is Aromatherapy? [Available from: <http://www.naha.org/explore-aromatherapy/about-aromatherapy/what-is-aromatherapy>].

97. Aromatherapy Recipes Using Essential Oils. Contents. Available from: <https://www.aromaweb.com/recipes/default.asp>.
98. **Ríos J-L**. Chapter 1 - Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In: Preedy VR, editor. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. San Diego: Academic Press; 2016. p. 3-10.
99. **Mekem Sonwa M**. Isolation and structure elucidation of essential oil constituents: comparative study of the oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus*, and *Cyperus rotundus*: Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky; 2000.
100. **Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W**. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*. 2016;3(4):25.
101. **Sunil Kumar Y**. Physiochemical Properties of Essential Oils and Applications. In: Mozaniel Santana de O, Eloisa Helena de Aguiar A, editors. Essential Oils. Rijeka: IntechOpen; 2022. p. Ch. 2.
102. **Aziz ZA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, et al**. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current drug metabolism*. 2018;19(13):1100-10.
103. **Mofijur M, Rasul MG, Hassan N, Nabi M**. Recent development in the production of third generation biodiesel from microalgae. *Energy Procedia*. 2019;156:53-8.
104. Le Romarin 2021 [Available from: <https://www.vivaces.be/romarin-rosmarinus-officinalis/>].
105. Rosmarinus essential oil. Contents. Available from: https://lamiewellness.com/cdn/shop/products/ScreenShot2020-08-29at10.52.24AM_2048x.png?v=1604809337.
106. **Hudaib MM, Tawaha KA, Hudaib HS, Battah AH**. Chemical Composition of Volatile Oil from the Aerial Parts of *Rosmarinus officinalis* L. Grown in Jordan. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2015;18(5):1282-6.
107. **Andrade JM, Faustino C, Garcia C, Ladeiras D, Reis CP, Rijo P**. *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future science OA*. 2018;4(4):FSO283.
108. *Rosmarinus officinalis* figure. Contents. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rosmarinus_officinalis_-_Köhler-s_Medizinal-Pflanzen-258.jpg.
109. *Rosmarinus officinalis* figure. **UF/IFAS**. Contents. Available from: <https://hort.ifas.ufl.edu/plantid/library/static/families/LAMIACEAE/Rosmarinus%20officinalis/04.jpg>.
110. Image de la plante de romarin. **unjardissouslesetoiles**. Contents. Available from: <https://www.unjardinsouslesetoiles.net/plantes/romarin>.
111. **González-Minero FJ, Bravo-Díaz L, Ayala-Gómez A**. *Rosmarinus officinalis* L. (Rosemary): An ancient plant with uses in personal healthcare and cosmetics. *Cosmetics*. 2020;7(4):77.
112. **Rahbardar MG, Hosseinzadeh H**. Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2020;23(9):1100.
113. **Hussain AI, Anwar F, Chatha SA, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS**. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Braz J Microbiol*. 2010;41(4):1070-8.
114. Registration Dossier: **ECHA**; [Available from: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered->

dossier/5479/4/1#:~:text=Rosemary%20oil%20is%20a%20clear,range%20of%200.892%20to%200.920.

115. **Panahi Y, Taghizadeh M, Marzony ET, Sahebkar A.** Rosemary oil vs minoxidil 2% for the treatment of androgenetic alopecia: a randomized comparative trial. *Skinmed.* 2015;13(1):15-21.
116. **Gillij YG, Gleiser RM, Zygodlo JA.** Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresour Technol.* 2008;99(7):2507-15.
117. **Rand PW, Lacombe EH, Elias SP, Lubelczyk CB, St Amand T, Smith RP, Jr.** Trial of a minimal-risk botanical compound to control the vector tick of Lyme disease. *J Med Entomol.* 2010;47(4):695-8.
118. **McCaffrey R, Thomas DJ, Kinzelman AO.** The effects of lavender and rosemary essential oils on test-taking anxiety among graduate nursing students. *Holist Nurs Pract.* 2009;23(2):88-93.
119. **Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M.** Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC complementary and alternative medicine.* 2014;14(1):1-9.
120. **Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT.** *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of ethnopharmacology.* 2019;229:29-45.
121. **Burt S.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53.
122. Structure de l' α -pinène. Contents. Available from: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Alpha-Pin%C3%A8ne#/media/Fichier:Alpha-pinen.svg>.
123. Acétate de bornyle. Contents. Available from: https://fr.wikipedia.org/wiki/Ac%C3%A9tate_de_bornyle#/media/Fichier:Endo-Bornylacetate_Structural_Formula_V1.svg.
124. Camphre. Contents. Available from: https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Fichier:Camphor_structure.png.
125. 1,8-cineol. Contents. Available from: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1,8-Cineol.svg>.
126. **Raskovic A, Milanovic I, Pavlovic N, Milijasevic B, Ubavic M, Mikov M.** Analgesic effects of rosemary essential oil and its interactions with codeine and paracetamol in mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(1):165-72.
127. **Moore J, Yousef M, Tsiani E.** Anticancer effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract and rosemary extract polyphenols. *Nutrients.* 2016;8(11):731.
128. **Happy AA, Jahan F, Momen MA.** Essential oils: Magical ingredients for skin care. *J. Plant Sci.* 2021;9(2):54.
129. **CULTIVATED ROLEO.** Chemical composition of *Lavandula angustifolia* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils cultivated in West Romania. *Research Journal of Agricultural Science.* 2015;47:3.
130. **Sandeep A, Sangameshwar K, Mukesh G, Chandrakant R, Avinash D.** A brief overview on chitosan applications. *Indo Am J Pharmaceutical Res.* 2013;13(2):1564-74.
131. What's the Difference Between Tween 20 and Tween 80?: G-Biosciences: **G-Biosciences**; [Available from: <https://info.gbiosciences.com/blog/whats-the-difference-between-tween-20-and-tween-80>.
132. chemical structure of polysorbate 80. Contents. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polysorbate_80.png.
133. What is Sodium Tripolyphosphate? : **All the Science**; [Available from: <https://www.allthescience.org/what-is-sodium-tripolyphosphate.htm>.

134. Skeletal model of sodium tripolyphosphate. Contents. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sodium_tripolyphosphate.svg.
135. **Al Omari MMH, Rashid IS, Qinna NA, Jaber AM, Badwan AA.** Chapter Two - Calcium Carbonate. In: Brittain HG, editor. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. 41: Academic Press; 2016. p. 31-132.
136. Calcium carbonate chemical structure. Contents; Edition:[Calcium carbonate is a chemical compound with the formula CaCO₃. It is a common substance found in rocks in all parts of the world, and is the main component of shells of marine organisms, snails, coal balls, pearls, and eggshells. Calcium carbonate is the active ingredient in agricultural lime, and is created when Ca ions in hard water react with carbonate ions creating limescale. It is commonly used medicinally as a calcium supplement or as an antacid, but excessive consumption can be hazardous.]. Available from: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Calcium_carbonate_structure.svg.
137. **Singh M, Patra S, Singh RK.** 15 - Common techniques and methods for screening of natural products for developing of anticancer drugs. In: Srivastava AK, Kannaujiya VK, Singh RK, Singh D, editors. Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules: Academic Press; 2021. p. 323-53.
138. **Borsani B, De Santis R, Perico V, Penagini F, Pendezza E, Dilillo D, et al.** The role of carrageenan in inflammatory bowel diseases and allergic reactions: where do we stand? *Nutrients*. 2021;13(10):3402.
139. **Solov'eva T, Davydova V, Krasikova I, Yermak I.** Marine compounds with therapeutic potential in gram-negative sepsis. *Marine drugs*. 2013;11(6):2216-29.
140. Structural formula of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. Contents. Available from: <https://fr.wikipedia.org/wiki/Diph%C3%A9nylpicrylhydrazyle#/media/Fichier:DPPH.svg>.
141. About Staphylococcus aureus: **MN Dept. of Health**; [Available from: <https://www.health.state.mn.us/diseases/staph/basics.html>.
142. Enterococcus Faecalis: Causes, Symptoms, and Treatments : **Healthline**; [September 29, 2018]. Available from: <https://www.healthline.com/health/enterococcus-faecalis>
- .
143. E. coli: **Mayo Clinic**; [October 01, 2022]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058>.
144. Salmonella: **Encyclopædia Britannica**; [Available from: <https://www.britannica.com/science/Salmonella>.
145. **Wilson MG, Pandey S.** Pseudomonas aeruginosa. StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing; 2022.
146. **Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D.** Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. *Future microbiology*. 2014;9(9):1071-81.
147. **Hejazi A, Falkiner FR.** Serratia marcescens. *Journal of medical microbiology*. 1997;46(11):903-12.
148. **Berman J.** Candida albicans. *Current biology*. 2012;22(16):R620-R2.
149. **Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E, Staab JF, Karp JE, Lu K, et al.** Epidemiology of Candida kefyr in patients with hematologic malignancies. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(6):1830-7.
150. **Fidel Jr PL, Vazquez JA, Sobel JD.** Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(1):80-96.
151. **Schroeder M, Messing A.** Methods for comparing the antibacterial activity of essential oils and other aqueous insoluble compounds. *Bull Nat Formulary Comm*. 1949;17:213-8.
152. Difference Between Agar Well and Disc Diffusion Method

- : **differencebetween**; [Available from: <https://www.differencebetween.com/difference-between-agar-well-and-disc-diffusion-method/#:~:text=The%20key%20difference%20between%20agar,placed%20on%20the%20agar%20surface.>]
153. **Nathan P, Law EJ, Murphy DF, MacMillan BG.** A laboratory method for selection of topical antimicrobial agents to treat infected burn wounds. *Burns*. 1978;4(3):177-87.
 154. **Hudzicki J.** Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*. 2009;15:55-63.
 155. **Horváth G, Bencsik T, Ács K, Kocsis B.** Sensitivity of ESBL-producing gram-negative bacteria to essential oils, plant extracts, and their isolated compounds. *Antibiotic resistance*. 2016;1:239-69.
 156. **Djeddi S, Bouchenah N, Settar I, Skaltsa HD.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*. 2007;43:487-90.
 157. **Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R.** The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*. 2021;10(2):165.
 158. **Aouni M, Pelen F, Soulimani R.** Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*. 2013;11(4):225-36.
 159. **Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TIE, Cortez DAG.** Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L.(Asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008;39:61-3.
 160. **Blois MS.** Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199-200.
 161. **Kedare SB, Singh R.** Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of food science and technology*. 2011;48:412-22.
 162. **Mfotie Njoya E.** Chapter 31 - Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. In: Preedy VR, Patel VB, editors. *Cancer (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2021. p. 349-57.
 163. **Molyneux P.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J sci technol*. 2004;26(2):211-9.
 164. **Natrajan D, Srinivasan S, Sundar K, Ravindran A.** Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. *Journal of food and drug analysis*. 2015;23(3):560-8.
 165. **Ahmadi Z, Saber M, Bagheri M, Mahdavinia GR.** *Achillea millefolium* essential oil and chitosan nanocapsules with enhanced activity against *Tetranychus urticae*. *Journal of pest science*. 2018;91:837-48.
 166. **Raval N, Maheshwari R, Kalyane D, Youngren-Ortiz SR, Chougule MB, Tekade RK.** Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development. *Basic fundamentals of drug delivery*: Elsevier; 2019. p. 369-400.
 167. **Das P, Das MK.** Production and physicochemical characterization of nanocosmeceuticals. *Nanocosmeceuticals*: Elsevier; 2022. p. 95-138.
 168. **Raval N, Maheshwari R, Kalyane D, Youngren-Ortiz SR, Chougule MB, Tekade RK.** Chapter 10 - Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. In: Tekade RK, editor. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*: Academic Press; 2019. p. 369-400.
 169. **UV-Vis Spectroscopy: Principle, Strengths and Limitations and Applications**

- : **Analysis & Separations from Technology Networks;** [Available from: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/uv-vis-spectroscopy-principle-strengths-and-limitations-and-applications-349865>.
170. **Stomach Acid Test: ucsfhealth**
; 2020
[Available from: [https://www.ucsfhealth.org/medical-tests/stomach-acid-test#:~:text=Normal%20Results,acidic%20\(1.5%20to%203.5\)](https://www.ucsfhealth.org/medical-tests/stomach-acid-test#:~:text=Normal%20Results,acidic%20(1.5%20to%203.5))].
171. **Fallingborg J.** Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish medical bulletin.* 1999;46(3):183-96.
172. **Esmaeili A, Asgari A.** In vitro release and biological activities of *Carum copticum* essential oil (CEO) loaded chitosan nanoparticles. *Int J Biol Macromol.* 2015;81:283-90.
173. What is FTIR Spectroscopy? [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/DZ/fr/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ftir-spectroscopy>].
174. **Smith K, Oatley C.** The scanning electron microscope and its fields of application. *British Journal of Applied Physics.* 1955;6(11):391.
175. **Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS.** *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2010;41:1070-8.
176. **Stojiljkovic J, Trajchev M, Nakov D, Petrovska M.** Antibacterial activities of rosemary essential oils and their components against pathogenic bacteria. *Advances in Cytology & Pathology.* 2018.
177. **Bajalan I, Rouzbahani R, Pirbalouti AG, Maggi F.** Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Industrial Crops and Products.* 2017;107:305-11.
178. **JAFARI-SALES A, Pashazadeh M.** Study of chemical composition and antimicrobial properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in vitro. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology.* 2020;3(1):62-9.
179. **Gauch LMR, Pedrosa SS, Esteves RA, Silveira-Gomes F, Gurgel ESC, Arruda AC, et al.** Atividade antifúngica de *Rosmarinus officinalis* Linn. óleo essencial contra *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. *Revista Pan-Amazônica de Saúde.* 2014;5(1):61-6.
180. **JEMAA MB, SNOUSSI M, FALLEH H, BEJI RS, KSOURI R.** Composés bioactifs.
181. **Özcan MM, Chalchat J-C.** Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *International journal of food sciences and nutrition.* 2008;59(7-8):691-8.
182. **Badiee P, Alborzi A.** Susceptibility of clinical *Candida* species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: A five year study. *Iranian journal of microbiology.* 2011;3(4):183.
183. **Ghannoum MA, Rice LB.** Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews.* 1999;12(4):501-17.
184. **Neves JS, Lopes-da-Silva Z, Neta MdSB, Chaves SB, de Medeiros Nóbrega YK, de Lira Machado AH, et al.** Preparation of terpolymer capsules containing *Rosmarinus officinalis* essential oil and evaluation of its antifungal activity. *RSC advances.* 2019;9(39):22586-96.

185. **Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ.** Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry*. 2008;108(3):1019-22.
186. **Santos F, Rao V.** Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2000;14(4):240-4.
187. **Juergens UR, Engelen T, Racké K, Stöber M, Gillissen A, Vetter H.** Inhibitory activity of 1, 8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2004;17(5):281-7.
188. **Guinebretière S, Briançon S, Fessi H, Teodorescu VS, Blanchin MG.** Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. *Materials Science and Engineering: C*. 2002;21(1):137-42.
189. **Keawchaon L, Yoksan R.** Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2011;84(1):163-71.
190. **Matshetshe KI, Parani S, Manki SM, Oluwafemi OS.** Preparation, characterization and in vitro release study of β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles loaded *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Int J Biol Macromol*. 2018;118(Pt A):676-82.
191. **Cai M, Wang Y, Wang R, Li M, Zhang W, Yu J, et al.** Antibacterial and antibiofilm activities of chitosan nanoparticles loaded with *Ocimum basilicum* L. essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;202:122-9.
192. **Hosseini SF, Zandi M, Rezaei M, Farahmandghavi F.** Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. *Carbohydrate Polymers*. 2013;95(1):50-6.
193. **Anitha A, Deepagan V, Rani VD, Menon D, Nair S, Jayakumar R.** Preparation, characterization, in vitro drug release and biological studies of curcumin loaded dextran sulphate–chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*. 2011;84(3):1158-64.
194. **Bagheri R, Ariaii P, Motamedzadegan A.** Characterization, antioxidant and antibacterial activities of chitosan nanoparticles loaded with nettle essential oil. *Journal of Food measurement and characterization*. 2021;15:1395-402.
195. **Liu Q, Li Q, Xu S, Zheng Q, Cao X.** Preparation and Properties of 3D Printed Alginate–Chitosan Polyion Complex Hydrogels for Tissue Engineering. *Polymers*. 2018;10:664.

ANNEXE



ANNEXE 1

AGITATEUR VORTEX

ANNEXE 2



DENSIMETRE



ANNEXE 3

DIFFUSION DYNAMIQUE DE LA LUMIÈRE (DLS)



ANNEXE 4

SPECTROPHOTOMETRE UV-VIS

Presse de laboratoire Spectromètre FTIR Matrice pour pastilles KBr



ANNEXE 5

ANNEXE 6



MICROSCOPE ELECTRONIQUE À BALAYAGE (MEB)

Résumé

Cette étude se concentre sur l'encapsulation de l'huile essentielle de romarin dans des nanoparticules en se basant sur des polymères de chitosane et d'alginate. L'objectif était d'évaluer les avantages potentiels de cette nanoencapsulation en termes d'activités pharmacologiques et de propriétés de libération contrôlée. Ce travail a été réalisé au niveau du département de pharmacie, faculté de médecine de l'université de Saad Dahleb Blida. Les résultats ont montré que l'huile de romarin avait une efficacité notable en tant qu'agent antibactérien, antifongique et antioxydant. Les nanoparticules encapsulant l'huile essentielle ont été formulées avec succès, présentant des tailles inférieures à 100 nm et une très bonne stabilité. L'encapsulation a été évaluée en utilisant la spectroscopie UV-vis, confirmant un taux d'encapsulation supérieur à 98% pour les quatre formulations. Le profil de libération in vitro des nanoparticules a démontré une libération contrôlée de l'huile essentielle. L'analyse par le FTIR a permis d'élucider les différentes interactions au sein des nanoparticules. De plus, les tests in vivo ont révélé une activité anti-inflammatoire et analgésique prometteuse des nanoparticules. L'observation microscopique a confirmé la présence et la distribution des nanoparticules. Ces résultats ouvrent de nouvelles opportunités pour le développement de médicaments plus efficaces et mieux ciblés.

Les mots clés : Huile essentielle de romarin, Activités pharmacologiques, Activités biologiques, Nanoparticules, Nanoencapsulation, Caractérisation physico chimiques

Abstract

This study focuses on the encapsulation of rosemary essential oil in nanoparticles based on chitosan and alginate polymers. The aim was to evaluate the potential advantages of this nanoencapsulation in terms of pharmacological activities and controlled release properties. This work was carried out at the level of the Pharmacy Department, Faculty of Medicine at the University of Saad Dahleb Blida. The results showed that rosemary oil exhibited notable effectiveness as an antibacterial, antifungal, and antioxidant agent. The oil-encapsulating nanoparticles were successfully formulated, with sizes below 100 nm and excellent stability. Encapsulation was assessed using UV-vis spectroscopy, confirming an encapsulation rate of over 98%. The *in vitro* release profile of the nanoparticles demonstrated controlled release of the essential oil. FTIR analysis elucidated the various interactions within the nanoparticles. Furthermore, *in vivo* tests revealed promising anti-inflammatory and analgesic activity of the nanoparticles. Microscopic observation confirmed the presence and distribution of the nanoparticles. These findings open new opportunities for the development of more effective and targeted medications.

Key words: Rosemary essential oil, Pharmacological activities, Biological activities
Nanoparticles, Nanoencapsulation, Physico chemical characterization

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تغليف زيت إكليل الجبل الأساسي في الجسيمات النانوية عن طريق بوليمرات الشيتوزان والألجينات. كان الهدف هو تقييم المزايا المحتملة لهذه الكبسلة النانوية من حيث الفعالية الفارماكولوجية وخصائص التحرر المسيطر عليه. تم تنفيذ هذا العمل على مستوى قسم الصيدلة، كلية الطب بجامعة سعد دحلب بليدة. أظهرت النتائج أن زيت إكليل الجبل أظهر فعالية ملحوظة كعامل مضاد للبكتيريا والفطريات ومضاد للأكسدة. تمت صياغة الجسيمات النانوية المغلفة بالزيت بنجاح، بأحجام أقل من 100 نانومتر وثبات ممتاز. تم تقييم التغليف باستخدام التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية، مما يؤكد أن معدل التغليف يزيد عن 98%. أظهرت التجربة المخبرية للجسيمات النانوية إطلاقًا محكومًا للزيت العطري. أوضح تحليل FTIR التفاعلات المختلفة داخل الجسيمات النانوية. علاوة على ذلك، كشفت الاختبارات في الجسم الحي عن نشاط واعد للجسيمات النانوية كمضاد للالتهابات ومسكن للألم. أكدت المراقبة المجهرية وجود وتوزيع الجسيمات النانوية. تفتح هذه النتائج آفاقًا جديدة لتطوير أدوية أكثر فعالية واستهدافًا.

الكلمات المفتاحية: زيت إكليل الجبل العطري، الفعالية الفارماكولوجية، الفعالية البيولوجية، الجسيمات النانوية، الكبسلة

النانوية، التوصيف الفيزيائي الكيميائي